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

(21) PI 0821998-2 A2

(22) Data do Depósito: 16/01/2008

(43) Data da Publicação Nacional: 23/07/2009

(54) Título: COMPOSIÇÕES DE IMUNOMODULAÇÃO E USOS PARA A MESMA.

(51) Int. Cl.: A61K 35/76; A61K 39/21; A61P 37/00; A61P 37/02.

(71) Depositante(es): OPAL THERAPEUTICS PTY LTD.

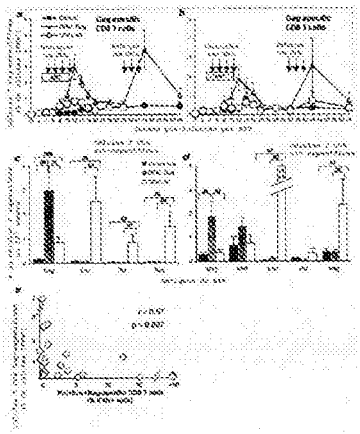
(72) Inventor(es): VIVIENNE PEUT; ROBERT DE ROSE; STEPHEN KENT.

(86) Pedido PCT: PCT AU2008000056 de 16/01/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/089568 de 23/07/2009

(85) Data da Fase Nacional: 16/07/2010

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES DE IMUNOMODULAÇÃO E USOS PARA A MESMA Esta invenção divulga as composições que consistem essencialmente em um polipeptídeo GAG ou pelo menos em uma parcela disso, e opcionalmente células apresentando antígeno ou seus precursores, para tratar ou impedir as infecções lentivirais que incluem o tratamento ou a prevenção de doenças adquiridas relacionadas da imunodeficiência. Em determinadas incorporações, as composições consistem essencialmente em uma pluralidade de sobreposição e/ou não - sobreposição de derivados peptídeos de um único polipeptídeo GAG ou de polipeptídeos diferentes GAG.



COMPOSIÇÕES IMUNOMODULADORAS E USOS DESTAS

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção está relacionada de forma geral à modulação de respostas imunes. Mais particularmente, a presente invenção está relacionada às composições que consistem basicamente em um polipeptídeo Gag ou pelo menos uma porção deste e, opcionalmente, células apresentadoras de antígeno ou seus precursores, para o tratamento ou a prevenção de infecções lentivirais, incluindo o tratamento ou prevenção de doenças de imunodeficiência adquirida relacionadas. Em certas modalidades, as composições consistem basicamente em diversos peptídeos superpostos e/ou não superpostos derivados de um único polipeptídeo Gag ou de polipeptídeos Gag diferentes.

Detalhes bibliográficos de várias publicações numericamente citadas neste pedido estão listados no final da descrição.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Imunoterapias eficazes para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) são necessárias. As terapias farmacológicas são para toda a vida com toxicidades significativas. Várias tentativas na imunoterapia do HIV com o uso de vacinas convencionais têm sido até agora pouco imunogênicas e pouco eficazes em experimentos humanos [1-4]. O uso de células apresentadoras de antígeno profissionais como, por exemplo, células dendríticas, para a produção de imunoterapias para o HIV demonstrou eficácia em macacos e estudos-piloto em humanos, mas se limita às instalações altamente especializadas [5,6]. Uma imunoterapia intermitente simples que reduz a necessidade de terapia antirretroviral

(ART) de longo prazo seria um avanço significativo no tratamento de HIV.

Recentemente, foi desenvolvida uma imunoterapia pelos presentes inventores, que envolve o tratamento de células mononucleares (PBMC) do sangue total não fracionado ou do sangue periférico com peptídeos superpostos derivados do vírus. Significativamente, essa imunoterapia simples, denominada OPAL ("Overlapping Peptide-pulsed Autologous Leukocytes" = Leucócitos Autólogos Pulsados com Peptídeos Superpostos), produziu respostas imunes mediadas por células robustas contra infecções virais, incluindo infecções pelo HIV, em populações endogâmicas [7,8]. A tecnologia OPAL possui várias vantagens, incluindo (1) não há necessidade de cultura prolongada *ex vivo* de células apresentadoras de antígeno, (2) indução de respostas de célula T $CD4^+$ e $CD8^+$ tanto às proteínas estruturais quanto reguladoras, e (3) fácil produção de antígenos peptídicos.

Os presentes inventores descobriram agora que, quando macacos rabo-de-porco são imunizados com células sangüíneas frescas expostas aos peptídeos superpostos do vírus da imunodeficiência símia (SIV), não há diferença no resultado viral final entre animais imunizados contra Gag isoladamente ("animais OPAL-Gag") e aqueles imunizados contra todo o proteoma do SIV ("animais OPAL-All"), o que sugere que Gag isoladamente é um antígeno eficaz para imunoterapias com células T. Adicionalmente, foi verificado inesperadamente que as respostas Gag-específicas de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ em animais OPAL-Gag eram significativamente maiores do que aquelas nos animais OPAL-All, apesar de uma dose idêntica de peptídeos Gag superpostos. Isso sugere que

há uma competição antigênica entre peptídeos Gag e as outras proteínas do SIV e que a indução de respostas de células T não-Gag imunodominantes por vacinas de multiproteínas de HIV pode limitar o desenvolvimento de respostas de células T Gag-específicas terapêuticas ou profiláticas. Essas descobertas foram praticadas em novas composições e métodos para o tratamento ou a prevenção de infecções lentivirais, incluindo o tratamento e prevenção de doenças associadas àquelas infecções.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Conseqüentemente, um aspecto da presente invenção fornece métodos para o tratamento ou a prevenção de uma infecção por lentivírus em um indivíduo, em que os métodos consistem basicamente no aumento no indivíduo do número de células apresentadoras de antígeno ou precursores de células apresentadoras de antígeno, que apresentam em sua superfície pelo menos um peptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma porção de um polipeptídeo Gag. Essas células apresentadoras de antígeno e seus precursores também são aqui denominadas "células apresentadoras de antígeno Gag-específicas" e "precursores da célula apresentadora de antígeno Gag-específica", respectivamente. Células apresentadoras de antígeno não limitantes incluem células dendríticas, macrófagos e células de Langerhans.

Qualquer método adequado de aumento do número de células apresentadoras de antígeno Gag-específicas ou precursores no indivíduo é contemplado pela presente invenção. Em algumas modalidades, o indivíduo recebe a administração de um estimulador imune que aumenta o número

de células apresentadoras de antígeno ou precursores de células apresentadoras de antígeno, que apresentam em sua superfície pelo menos um peptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma porção de um polipeptídeo Gag. Em exemplos ilustrativos desse tipo, o estimulador imune está na forma de células apresentadoras de antígeno ou precursores, que foram colocadas em contato com uma composição que consiste basicamente em um polipeptídeo Gag ou pelo menos um peptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a um polipeptídeo Gag por um período e sob condições suficientes para que o polipeptídeo Gag ou o(s) peptídeo(s), ou formas processadas do polipeptídeo Gag ou do(s) peptídeo(s), sejam apresentadas pelas células apresentadoras de antígeno ou por seus precursores. Em outros exemplos ilustrativos, o estimulador imune está na forma de células apresentadoras de antígeno ou precursores da célula apresentadora de antígeno que contêm uma construção de ácido nucléico que compreende uma seqüência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo Gag ou pelo menos um peptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma porção de um polipeptídeo Gag, em que a seqüência de nucleotídeos está conectada operacionalmente a um elemento regulador que é operável nas células apresentadoras de antígeno ou em seus precursores. Essas construções de ácido nucléico também são aqui denominadas "construções de ácido nucléico que expressam *Gag*". Ainda em outros exemplos ilustrativos, o estimulador imune está na forma de uma composição que consiste basicamente em pelo menos uma molécula de Gag selecionada de um polipeptídeo Gag, um peptídeo que

compreende uma seqüência que corresponde a uma porção de um polipeptídeo Gag e uma construção de ácido nucléico que expressa Gag. Em exemplos ilustrativos desse tipo, uma respectiva molécula de Gag está em uma forma que é adequada à introdução (por exemplo, por transformação, internalização, endocitose ou fagocitose) nas células apresentadoras de antígeno ou em seus precursores, o que inclui formas solúveis e particuladas da molécula de Gag. Em algumas modalidades, a(s) molécula(s) de Gag está contida ou de algum outro modo associada a uma partícula, cujos exemplos ilustrativos incluem lipossomos, micelas, partículas lipídicas, partículas cerâmicas/inorgânicas e partículas poliméricas. Em algumas modalidades, os métodos excluem a administração ao indivíduo das células apresentadoras de antígeno que apresentam em sua superfície peptídeos que compreendem seqüências de aminoácidos que correspondem às porções de outros polipeptídeos de lentivírus. Em algumas modalidades, os métodos excluem a administração ao indivíduo de outras moléculas de lentivírus ou células apresentadoras de antígeno que foram colocadas em contato com outras moléculas de lentivírus, em que as outras moléculas de lentivírus são selecionadas de polipeptídeos não-Gag do lentivírus, porções de polipeptídeos não-Gag do lentivírus e construções de ácido nucléico das quais os polipeptídeos não-Gag ou as porções do polipeptídeo não-Gag são expressáveis. Em algumas modalidades, as composições compreendem um componente proteináceo que consiste em pelo menos uma molécula de Gag selecionada de um polipeptídeo Gag, um peptídeo que compreende uma seqüência que corresponde a uma porção de um

polipeptídeo Gag e uma construção de ácido nucléico que expressa Gag.

Em certas modalidades, o estimulador imune é administrado com um veículo e/ou diluente farmaceuticamente aceitável. Alternativamente, ou em adição, o estimulador imune é administrado com um adjuvante ou com um composto que estabiliza uma molécula de Gag como descrito de forma ampla acima contra a degradação por enzimas do hospedeiro. Adequadamente, o lentivírus é selecionado entre o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o vírus da imunodeficiência símia (SIV).

Em algumas modalidades, o estimulador imune consiste basicamente em diversos peptídeos, em que os peptídeos individuais compreendem porções diferentes de uma seqüência de aminoácidos que correspondem a um polipeptídeo Gag e, opcionalmente, exibem identidade ou similaridade de seqüência parcial para pelo menos outro peptídeo dos diversos peptídeos. Em exemplos ilustrativos desse tipo, a identidade ou similaridade de seqüência parcial está contida em uma ou em ambas as extremidades de um peptídeo individual. Adequadamente, em uma ou em ambas essas extremidades há pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 resíduos de aminoácidos contíguos cuja seqüência é idêntica ou similar a uma seqüência de aminoácidos contida dentro de pelo menos outro dos peptídeos. Em certas modalidades, o peptídeo possui pelo menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 resíduos de aminoácidos de comprimento e adequadamente no máximo cerca de 500, 200, 100, 80, 60, 50, 40 resíduos de aminoácidos de comprimento.

Adequadamente, o comprimento dos peptídeos é selecionado para aumentar a produção de uma resposta de linfócitos T citolíticos (por exemplo, peptídeos com cerca de 8 a cerca de 10 aminoácidos de comprimento), ou uma resposta de linfócitos T auxiliares (*helper*) (por exemplo, peptídeos com cerca de 12 a cerca de 20 aminoácidos de comprimento). Em algumas modalidades, as seqüências peptídicas são derivadas de pelo menos cerca de 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% da seqüência que corresponde ao polipeptídeo Gag. Em modalidades específicas, os diversos peptídeos compreendem peptídeos de dois ou mais polipeptídeos Gag diferentes.

Conseqüentemente, em um aspecto relacionado, a presente invenção contempla métodos para o tratamento ou a prevenção de uma infecção por lentivírus em um indivíduo, em que os métodos compreendem o aumento no indivíduo do número de células apresentadoras de antígeno Gag-específicas ou de precursores da célula apresentadora de antígeno Gag-específica, que apresentam em sua superfície pelo menos um peptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma porção de um polipeptídeo Gag, em que as células apresentadoras de antígeno Gag-específicas ou os precursores da célula apresentadora de antígeno Gag-específica são produzidos por contato das células apresentadoras de antígeno ou de precursores da célula apresentadora de antígeno com uma composição que

consiste basicamente em diversos peptídeos por um período e sob condições suficientes para que os peptídeos, ou as formas processadas dos peptídeos, sejam apresentados pelas células apresentadoras de antígeno ou pelos precursores em sua superfície, em que os peptídeos individuais da composição compreendem porções diferentes de uma seqüência de aminoácidos que correspondem a um polipeptídeo Gag e, opcionalmente, exibem identidade ou similaridade de seqüência parcial para pelo menos outro peptídeo dos diversos peptídeos. Em algumas modalidades, o indivíduo recebe a administração das células apresentadoras de antígeno Gag-específicas ou dos precursores da célula apresentadora de antígeno Gag-específica. Em outras modalidades, o indivíduo recebe a administração da composição.

Outro aspecto da presente invenção fornece composições para o tratamento ou a prevenção de uma infecção por lentivírus, em que as composições consistem basicamente em células apresentadoras de antígeno Gag-específicas ou precursores da célula apresentadora de antígeno Gag-específica, como descrito de forma ampla acima, ou de pelo menos uma molécula de Gag selecionada de um polipeptídeo Gag, um peptídeo que compreende uma seqüência que corresponde a uma porção de um polipeptídeo Gag e uma construção de ácido nucléico que expressa Gag, como descrito de forma ampla acima. Em algumas modalidades, cada molécula de Gag está em forma particulada.

Em um aspecto relacionado, a invenção fornece processos para a produção de células apresentadoras de antígeno para o tratamento ou a prevenção de uma infecção

por lentivírus. Esses processos geralmente compreendem o contato de células apresentadoras de antígeno ou de precursores da célula apresentadora de antígeno com uma composição que consiste basicamente em pelo menos uma molécula de Gag selecionada de um polipeptídeo Gag, um peptídeo que compreende uma seqüência que corresponde a uma porção de um polipeptídeo Gag e uma construção de ácido nucléico que expressa Gag, como descrito de forma ampla acima, por um período e sob condições suficientes para que pelo menos um peptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma porção de um polipeptídeo Gag seja apresentado pelas células apresentadoras de antígeno ou por seus precursores em sua superfície. Adequadamente, quando são usados precursores, os precursores são cultivados por um período e sob condições suficientes para diferenciar as células apresentadoras de antígeno dos precursores.

Em algumas modalidades, cada molécula de Gag é colocada em contato com uma população substancialmente purificada de células apresentadoras de antígeno ou seus precursores. Em outras modalidades, moléculas individuais de Gag são colocadas em contato com uma população heterogênea de células apresentadoras de antígeno ou seus precursores. Nessas modalidades, a população heterogênea de células pode ser sangue ou células mononucleares do sangue periférico. Tipicamente, as células apresentadoras de antígeno ou seus precursores são selecionados de monócitos, macrófagos, células da linhagem mielóide, células B, células dendríticas ou células de Langerhans. Ainda em outras modalidades, a(s) molécula(s) de Gag é colocada em

contato com uma população não cultivada de células apresentadoras de antígeno ou seus precursores. Conseqüentemente, a população não cultivada pode ser homogênea ou heterogênea, cujos exemplos ilustrativos incluem sangue total, sangue fresco ou frações deste como, por exemplo, sem limitação, células mononucleares do sangue periférico, frações de células brancas do sangue total, concentrado de hemácias, sangue irradiado, células dendríticas, monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos, células *natural killer* e células T *natural killer*. Em algumas modalidades, a população não cultivada que é colocada em contato com a(s) molécula(s) de Gag não foi submetida às condições de ativação.

As células apresentadoras de antígeno Gag-específicas descritas de forma ampla acima também são úteis para a produção de linfócitos, incluindo linfócitos T e linfócitos B, para a modulação de uma resposta imune a um polipeptídeo Gag. Conseqüentemente, ainda em outro aspecto, a invenção fornece métodos para a produção de linfócitos sensibilizados por Gag, em que os métodos geralmente compreendem o contato de uma população de linfócitos, ou de seus precursores, com uma célula apresentadora de antígeno Gag-específica, como descrito de forma ampla acima, por um período e sob condições suficientes para sensibilizar os linfócitos para que respondam ao polipeptídeo Gag.

Ainda em outro aspecto, a presente invenção engloba métodos para o tratamento ou a prevenção de uma infecção por lentivírus em um indivíduo. Esses métodos geralmente compreendem a administração ao indivíduo de um estimulador imune, como descrito de forma ampla acima, ou de linfócitos

sensibilizados por Gag, como descrito de forma ampla acima, em uma quantidade que é eficaz para tratar ou evitar a infecção por lentivírus. Em algumas modalidades, o estimulador imune ou os linfócitos sensibilizados por Gag são administrados sistemicamente, tipicamente por injeção.

Em um aspecto relacionado, a invenção fornece métodos para o tratamento ou a prevenção de uma doença de imunodeficiência adquirida em um indivíduo. Esses métodos geralmente compreendem a administração ao indivíduo de um estimulador imune, como descrito de forma ampla acima, ou de linfócitos sensibilizados por Gag, como descrito de forma ampla acima, em uma quantidade que é eficaz para tratar ou evitar a doença.

Ainda em outro aspecto, a invenção contempla o uso de um estimulador imune, como descrito de forma ampla acima, ou de linfócitos sensibilizados por Gag, como descrito de forma ampla acima, para o tratamento ou a prevenção de uma condição selecionada de uma infecção por lentivírus e uma doença de imunodeficiência adquirida. Em algumas modalidades, o uso compreende preparação de um medicamento que é adequado ao tratamento ou à prevenção daquela condição.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma representação gráfica que ilustra a imunogenicidade de células T da vacinação com OPAL. Células T CD4 (a) e CD8 (b) específicas para Gag do SIV que expressam IFN-γ foram estudadas ao longo do tempo por coloração de citocina intracelular. É mostrada a média ± erro padrão de grupos de vacina comparados com animais não vacinados de controle (círculos). As vacinações primárias

com OPAL de macacos (setas, 4ª, 6ª, 8ª e 10ª semanas após infecção por SIV_{mac251}) consistiram em PBMC autólogas pulsadas com peptídeos superpostos de 15mer de Gag de SIV (OPAL-Gag, triângulos) ou peptídeos que englobam todas as 9 proteínas do SIV (OPAL-All, quadrados). As vacinações iniciais foram dadas sob a cobertura de tratamento antirretroviral (ART). Os animais receberam reforço com imunoterapia com OPAL nos mesmos grupos randomizados, sem ART, nas 39ª, 42ª e 42ª semanas. Na 12ª semana, duas semanas após a última vacinação, células T CD4 (c) e CD8 (d) para pools de peptídeos superpostos que englobam Gag de SIV, Env, Pol ou proteínas reguladoras/acessórias combinadas (Nef, Tat, Rev, Vif, Vpx, Vpr [Reg]) foram testadas em todos os animais por coloração de citocina intracelular. Além disso, as respostas para um epitopo de célula T CD8 para Gag de SIV KP9 foram avaliadas por um tetrâmero Mane-A*10/KP9. É mostrada a média ± erro padrão de grupos de vacina, juntamente com os valores p do teste t *2-sided* < 0,10. (e) respostas de células T CD8 específicas para Gag de SIV estavam relacionadas inversamente com as respostas de células T CD8 à soma de respostas a não-Gag (Env + Pol + proteína reguladora) ao longo de todos os 21 animais vivos imunizados com OPAL. Os animais com >50% de respostas de células T CD8 ao pool combinado tiveram respostas totais de 50,4% e 54,5%, primariamente ao Env (50,1% e 54,2%, respectivamente). É mostrada a correlação da classificação de Spearman.

A Figura 2 é uma representação gráfica que mostra a eficácia da imunoterapia com OPAL. A terapia antirretroviral (ART) foi retirada na 10ª semana, após a

última vacinação, e (a) RNA do SIV no plasma acompanhado. Os 26 animais que controlaram a viremia com ART estão ilustrados com média ± erro padrão de grupos de vacina. (b) É mostrada a sobrevida dos animais vacinados e de controle.

A Figura 3 é uma representação gráfica que ilustra imunogenicidade de células T não-Gag da vacinação com OPAL. Células T CD4⁺ e CD8⁺ SIV-específicas que expressam IFN-γ foram estudadas ao longo do tempo por coloração de citocina intracelular ao Env (**a**, **b**), Pol (**c**, **d**) e a um pool de peptídeos superpostos que englobam proteínas reguladoras/acessórias combinadas (RTNVVV, **e**, **f**). É mostrada a média ± erro padrão de grupos de vacina comparados com animais não vacinados de controle (círculos). Quatro vacinações iniciais foram dadas nas 4ª-10ª semanas e um segundo conjunto de 3 imunizações dado nas 36ª-42ª semanas.

A Figura 4 é uma representação gráfica que mostra uma comparação entre animais com respostas de células T CD8⁺ ao Env e ao Gag. Seis responsivos apenas ao Env, 3 responsivos apenas ao Gag, 3 animais com respostas de células T CD8 específicas tanto ao Env quanto ao Gag e 7 controles não vacinados foram estudados quanto: **A**. À carga viral. **B**. Aos níveis de células T CD4 periféricas. **C**. Gráfico de sobrevida que mostra 2 de 6 animais responsivos apenas ao Env submetidos à eutanásia por volta da 44ª semana, 0 de 3 responsivos ao Gag submetidos à eutanásia por volta da 64ª semana, 2 de 3 animais com respostas específicas tanto ao Env quanto ao Gag submetidos à eutanásia por volta da 44ª semana e 7 de 11 animais de controle submetidos à eutanásia por volta da 64ª semana pós-infecção. Nenhum animal

*ManeA*10* positivo incluído. Uma última observação efetuada para análise foi usada para contagens de células T VL e CD4* em que os animais foram submetidos à eutanásia antes da 64ª semana.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

1. Definições

A menos que definido de forma diferente, todos os termos técnicos e científicos aqui usados possuem o mesmo significado comumente compreendido por aqueles habilitados na técnica à qual a invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, são descritos métodos e materiais preferidos. Para os objetivos da presente invenção, os termos seguintes serão definidos abaixo.

Os artigos "o", "a", "um" e "uma" são aqui usados para se referirem a um ou mais de um (ou seja, a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. Como exemplo, "um elemento" significa um elemento ou mais de um elemento.

O termo "cerca de" significa uma quantidade, nível, valor, número, freqüência, percentagem, dimensão, tamanho, quantidade, peso ou comprimento que varia em até 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1% para uma quantidade, nível, valor, número, freqüência, percentagem, dimensão, tamanho, quantidade, peso ou comprimento de referência.

O termo "condições de ativação" refere-se às condições de tratamento que levam à expressão de cada um de CD2, CD83, CD14, MHC classe I, MHC classe II e TNF-α em um nível ou atividade funcional que resulta de uma condição de

tratamento de ativação selecionada de: incubação das células apresentadoras de antígeno ou de seus precursores na presença de um agente selecionado de citocinas (por exemplo, IL-4, GM-CSF ou um interferon do tipo I), quimiocinas, mitógenos, lipopolissacarídeo, ou agentes que induzem a síntese de interferon nas células apresentadoras de antígeno ou em seus precursores; ou exposição das células apresentadoras de antígeno ou de seus precursores ao estresse físico. No entanto, deve ser entendido que o termo "condições de ativação" exclui condições de tratamento que resultam em ativação desprezível das células, por exemplo, quando menos do que cerca de 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% ou 0,1% das células são ativadas, ou quando cada um de CD2, CD83, CD14, MHC classe I, MHC classe II e TNF-α é expresso em um nível ou atividade funcional que seja de até cerca de 10% (1/10), 20% (1/5), 30% (3/10), 40% (2/5), 50% (1/2), 60% (3-5), 70% (7/10), 80% (4/5) ou 90% (9/10) de seu nível ou atividade funcional em células apresentadoras de antígeno ou em seus precursores submetidos a uma condição de tratamento de ativação mencionada acima.

O termo "antígeno" significa toda, ou parte de, uma proteína, um peptídeo ou outra molécula ou macromolécula capaz de despertar uma resposta imune em um animal vertebrado, preferivelmente um mamífero. Esses antígenos também são reativos com anticorpos de animais imunizados com a referida proteína, peptídeo ou outra molécula ou macromolécula.

O termo "molécula de ligação de antígeno" significa uma molécula que possui afinidade de ligação por um

antígeno-alvo. Será subentendido que esse termo se estende às imunoglobulinas, fragmentos de imunoglobulina e arcabouços de proteína não derivada de imunoglobulina que exibem atividade de ligação de antígeno.

O termo "autólogo" significa algo (por exemplo, células, tecidos etc.) derivado do mesmo organismo.

O termo "alogênico", como aqui usado, refere-se às células, tecidos, organismos etc. que são de constituição genética diferente.

O termo "aloantígeno" significa um antígeno encontrado apenas em alguns membros de uma espécie, por exemplo, antígenos do grupo sangüíneo. Em contraste, um "xenoantígeno" refere-se a um antígeno que está presente em membros de uma espécie, mas não em membros de outra. De forma correspondente, um "aloenxerto" é um enxerto entre membros da mesma espécie, e um "xenoenxerto" é um enxerto entre membros de uma espécie diferente.

Ao longo desta especificação, a menos que o contexto exija de forma diferente, será subentendido que as palavras "compreendem", "compreende" e "que compreende" implicam na inclusão de uma etapa ou elemento ou grupo de etapas ou elementos definidos, mas não a exclusão de qualquer outra etapa ou elemento ou grupo de etapas ou elementos. Dessa forma, o uso do termo "que compreende" e semelhantes indica que os elementos listados são necessários ou mandatórios, mas que outros elementos são opcionais e podem ou não estar presentes. O termo "que consiste em" significa "que inclui", e "limita-se a", sempre que seguir a frase "que consiste em". Dessa forma, a frase "que consiste em" indica que os elementos listados são necessários ou mandatórios, e

que nenhum outro elemento pode estar presente. O termo "que consiste basicamente em" significa "que inclui" quaisquer elementos listados após a frase, e limitado aos outros elementos que não interferem com ou contribuem para a atividade ou ação especificada na revelação para os elementos listados. Dessa forma, a frase "que consiste basicamente em" indica que os elementos listados são necessários ou mandatórios, mas que outros elementos são opcionais e podem ou não estar presentes, dependendo de se afetam ou não a atividade ou ação dos elementos listados.

Como aqui usados, os termos "cultivo", "cultura" e semelhantes referem-se ao conjunto de procedimentos usados *in vitro* em que uma população de células (ou uma única célula) é incubada sob condições que comprovadamente apóiam o crescimento ou manutenção das células *in vitro*. A técnica reconhece um grande número de formatos, meios, faixas de temperatura, concentrações de gás etc. que precisam ser definidos em um sistema de cultura. Os parâmetros irão variar com no formato selecionado e nas necessidades específicas do indivíduo que pratica os métodos aqui revelados. No entanto, é reconhecido que a determinação dos parâmetros de cultura é de natureza rotineira.

O termo "corresponde a" ou "que corresponde a" significa um antígeno que codifica uma seqüência de aminoácidos que exibe similaridade substancial para uma seqüência de aminoácidos em um antígeno-alvo. Em geral o antígeno exibirá pelo menos cerca de 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79,

80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% de similaridade ou identidade para pelo menos uma porção do antígeno-alvo.

O termo "quantidade eficaz", no contexto de modulação de uma resposta imune ou de tratamento ou prevenção de uma doença ou condição, significa a administração daquela quantidade de composição a um indivíduo necessitado, em uma dose única ou como parte de uma série, que seja eficaz para aquela modulação, tratamento ou prevenção. A quantidade eficaz irá variar, dependendo da saúde e da condição física do indivíduo a ser tratado, do grupo taxonômico de indivíduo a ser tratado, da formulação da composição, da avaliação da situação médica e de outros fatores relevantes. Espera-se que a quantidade caia em uma faixa relativamente ampla que pode ser determinada por meio de experimentos de rotina.

O termo "vetor de expressão" significa qualquer elemento genético autônomo capaz de dirigir a síntese de uma proteína codificada pelo vetor. Esses vetores de expressão são conhecidos por profissionais na técnica.

O termo "gene", como aqui usado, refere-se a qualquer e todas as regiões codificadoras distintas do genoma da célula, bem como regiões não codificadoras e reguladoras associadas. O termo "gene" também significa os polipeptídeos específicos que codificam o quadro de leitura aberta, íntrons, e seqüências de nucleotídeos não codificadoras 5' e 3' adjacentes envolvidas na regulação da expressão. A esse respeito, o gene pode ainda compreender sinais como, por exemplo, promotores, intensificadores, sinais de terminação e/ou poliadenilação que estão

naturalmente associados a certo gene, ou sinais de controle heterólogos. As seqüências de DNA podem ser cDNA ou DNA genômico ou um fragmento deste. O gene pode ser introduzido em um vetor apropriado para manutenção extracromossômica ou para integração no hospedeiro.

Um composto ou composição é "imunogênico" se for capaz de: a) geração de uma resposta imune contra um antígeno (por exemplo, um antígeno viral) em um indivíduo virgem; ou b) reconstituição, reforço ou manutenção de uma resposta imune em um indivíduo além daquela que ocorreria se o composto ou a composição não fosse administrado. Um composto ou composição é imunogênico se for capaz de atender a esses critérios quando administrado em dose única ou em doses múltiplas.

As referências aqui feitas a "imunointerativo" incluem referência a qualquer interação, reação ou outra forma de associação entre moléculas e em particular quando uma das moléculas é, ou mimetiza, um componente do sistema imunológico.

O termo "isolado" significa material que é substancial ou basicamente livre de componentes que normalmente o acompanham em seu estado nativo.

O termo "lentivírus" inclui e engloba: lentivírus de primatas, por exemplo, vírus da imunodeficiência humana dos tipos 1 e 2 (HIV-1/HIV-2); vírus da imunodeficiência símia (SIV) de chimpanzé (SIV_{cpz}), *Sooty mangabey* (SIV_{smm}), macaco verde africano (SIV_{agm}), macaco de Syke (SIV_{syk}), mandril (SIV_{mnd}) e macaco (SIV_{mac}). Os lentivírus também incluem lentivírus felinos, por exemplo, vírus da imunodeficiência felina (FIV); lentivírus bovinos, por exemplo, vírus da

imunodeficiência bovina (BIV); lentivírus ovinos, por exemplo, vírus de Maedi/Visna (MVV) e vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV); e lentivírus eqüinos, por exemplo, vírus da anemia infecciosa eqüina (EIAV). Todos os lentivírus expressam pelo menos duas proteínas reguladoras adicionais (Tat, Rev), além de proteínas Gag, Pol e Env. Os lentivírus de primatas produzem outras proteínas acessórias que incluem Nef, Vpr, Vpu, Vpx e Vif. Geralmente, os lentivírus são os agentes causadores de várias doenças, incluindo, além da imunodeficiência, degeneração neurológica e artrite. Seqüências de nucleotídeos dos vários lentivírus podem ser encontradas no GenBank sob os seguintes números de acesso: (de J.M. Coffin, S.H. Hughes, e H.E. Varmus, "Retroviruses" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 199,7 página 804): 1) HIV-1: K03455, M19921, K02013, M38431, M38429, K02007 e M17449; 2) HIV-2: M30502, J04542, M30895, J04498, M15390, M31113 e L07625; 3) SIV: M29975, M30931, M58410, M66437, L06042, M33262, M19499, M32741, M31345 e L03295; 4) FIV: M25381, M36968 e U11820; 5) BIV: M32690; 6) EIAV: M16575, M87581 e U01866; 6) Visna: M10608, M51543, L06906, M60609 e M60610; 7) CAEV: M33677; e 8) Lentivírus ovinos: M31646 e M34193. Seqüências de aminoácido para os vários polipeptídeos lentivirais também são fornecidas nesses acessos no GenBank. O DNA lentiviral também pode ser obtido na "American Type Culture Collection" (ATCC). Por exemplo, o vírus da imunodeficiência felina está disponível sob a Designação ATCC N° VR-2333 e VR-3112. O vírus da anemia infecciosa eqüina A está disponível sob a Designação ATCC N° VR-778. O vírus da artrite-encefalite caprina está disponível sob a

Designação ATCC Nº VR-905. O vírus Visna está disponível sob a Designação ATCC Nº VR-779.

O termo "modulação" significa aumento ou diminuição, direta ou indiretamente, da resposta imune de um indivíduo. Em certas modalidades, "modulação" significa que uma resposta desejada/selecionada é mais eficiente (por exemplo, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais), mais rápida (por exemplo, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais), maior em magnitude (por exemplo, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais) e/ou mais facilmente induzida (por exemplo, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais) do que na ausência de um antígeno ou se o antígeno fosse usado isoladamente.

O termo "operacionalmente conectado" ou "operacionalmente ligado", como aqui usado, significa a colocação de um gene estrutural sob o controle regulatório de um elemento regulador, incluindo, sem limitação, um promotor, que então controla a transcrição e, opcionalmente, tradução do gene. Na construção de combinações de promotor heterólogo/gene estrutural, prefere-se geralmente posicionar a seqüência genética ou o promotor em uma distância do sítio de início da transcrição gênica que é aproximadamente igual à distância entre aquela seqüência genética ou promotor e o gene que controla em seu ambiente natural; ou seja, o gene do qual a seqüência genética ou o promotor é derivado. Como é conhecido na técnica, pode ser acomodada alguma variação nessa distância sem perda de função. Similarmente, o posicionamento preferido de um elemento da seqüência reguladora com relação a um gene heterólogo que pode ser colocado sob seu

controle é definido pelo posicionamento do elemento em seu ambiente natural; ou seja, os genes dos quais é derivado.

Os termos "paciente", "indivíduo", "hospedeiro" ou "indivíduo", aqui usados de forma intercambiável, referem-se a qualquer indivíduo, particularmente um indivíduo vertebrado, e ainda mais particularmente a um indivíduo mamífero, para o qual se deseja a terapia ou profilaxia. Animais vertebrados adequados que estão incluídos no escopo da invenção incluem, sem limitação, qualquer membro do subfilo Chordata, incluindo primatas, roedores (por exemplo, camundongos, ratos, porquinhos-da-índia), lagomorfos (por exemplo, coelhos, lebres), bovinos (por exemplo, gado), ovinos (por exemplo, carneiros), caprinos (por exemplo, cabras), suínos (por exemplo, porcos), eqüinos (por exemplo, cavalos), caninos (por exemplo, cães), felinos (por exemplo, gatos), aves (por exemplo, galinhas, perus, patos, gansos, pássaros de estimação como, por exemplo, canários, periquitos etc.), mamíferos marinhos (por exemplo, golfinhos, baleias), répteis (por exemplo, cobras, sapos, lagartos etc.) e peixes. Um indivíduo preferido é um primata (por exemplo, um ser humano, macaco, chimpanzé) que necessite de tratamento ou profilaxia para uma condição ou doença. No entanto, será subentendido que os termos mencionados anteriormente não implicam na presença de sintomas.

O termo "veículo farmaceuticamente aceitável" significa um enchimento, diluente ou substância de encapsulação sólida ou líquida que pode ser usado com segurança na administração tópica ou sistêmica.

"Polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são aqui

usados de forma intercambiável para se referirem a um polímero de resíduos de aminoácidos e às variantes e análogos sintéticos do mesmo. Dessa forma, esses termos se aplicam aos polímeros de aminoácidos nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos são um aminoácido sintético de ocorrência não natural, por exemplo, um análogo químico de um aminoácido de ocorrência natural correspondente, além de polímeros de aminoácidos de ocorrência natural.

As referências aqui feitas a um "promotor" devem ser consideradas em seu contexto mais amplo e incluem as seqüências reguladoras da transcrição de um gene genômico clássico, incluindo a *TATA box* que é necessária para iniciação precisa da transcrição, com ou sem uma seqüência CCAAT box e elementos reguladores adicionais (ou seja, seqüências de ativação, intensificadores e silenciadores acima) que alteram a expressão gênica em resposta aos estímulos do desenvolvimento e/ou ambientais, ou de uma forma tecido-específica ou tipo de célula-específica. Um promotor é normalmente, mas não necessariamente, posicionado acima ou 5', de um gene estrutural, cuja expressão ele regula. Além disso, os elementos reguladores que compreendem um promotor estão normalmente posicionados em até 2 kb do sítio de início da transcrição do gene. Promotores preferidos de acordo com a invenção podem conter cópias adicionais de um ou mais elementos reguladores específicos para aumentar ainda mais a expressão em uma célula, e/ou para alterar o momento da expressão de um gene estrutural ao qual está operacionalmente conectado.

Os termos "polipeptídeo purificado" ou "peptídeo purificado" significam que o polipeptídeo ou peptídeo é

substancialmente livre de material celular ou de outras proteínas contaminantes da fonte da célula ou do tecido da qual o polipeptídeo ou peptídeo é derivado, ou substancialmente livre de precursores químicos ou de outras substâncias químicas quando sintetizado quimicamente. "Substancialmente livre" significa que uma preparação de um polipeptídeo ou peptídeo Gag da invenção é pelo menos 10% pura. Em certas modalidades, a preparação de polipeptídeo ou peptídeo Gag possui menos do que cerca de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% e, desejavelmente, 5% (por peso seco) de proteína não peptídeo (aqui também denominada uma "proteína contaminante"), ou de precursores químicos ou substâncias químicas não peptídicas. A invenção inclui preparações isoladas ou purificadas de pelo menos 0,01, 0,1, 1,0 e 10 miligramas em peso seco.

O termo "polinucleotídeo recombinante", como aqui usado, refere-se a um polinucleotídeo formado *in vitro* pela manipulação de ácido nucléico em uma forma não encontrada normalmente na natureza. Por exemplo, o polinucleotídeo recombinante pode estar na forma de um vetor de expressão. Geralmente, esses vetores de expressão incluem ácido nucléico regulador da transcrição e tradução ligado operacionalmente à seqüência de nucleotídeos.

O termo "polipeptídeo recombinante" significa um polipeptídeo feito com o uso de técnicas recombinantes, ou seja, por meio da expressão de um polinucleotídeo recombinante.

O termo "elemento regulador" ou "seqüência reguladora" significa seqüências de ácidos nucléicos (por exemplo, DNA) necessárias à expressão de uma seqüência codificadora

ligada operacionalmente em uma célula hospedeira em particular. As seqüências reguladoras que são adequadas às células procarióticas, por exemplo, incluem um promotor e, opcionalmente, uma seqüência de atuação *cis* como, por exemplo, uma seqüência operadora e um sítio de ligação de ribossomo. Seqüências de controle que são adequadas às células eucarióticas incluem promotores, sinais de poliadenilação, intensificadores da transcrição, intensificadores da tradução, seqüências líderes ou de rastreamento que modulam a estabilidade do mRNA, bem como seqüências de direcionamento que direcionam um produto codificado por um polinucleotídeo transcrito a um compartimento intracelular dentro de uma célula ou ao ambiente extracelular.

Os termos "identidade de seqüência" e "identidade" são aqui usados de forma intercambiável para se referirem ao grau no qual seqüências são idênticas com base em nucleotídeo-por-nucleotídeo ou com base em aminoácido-por-aminoácido ao longo de uma janela de comparação. Dessa forma, uma "percentagem de identidade de seqüência" é calculada por comparação de duas seqüências otimamente alinhadas ao longo de uma janela de comparação, determinação do número de posições nas quais a base de ácido nucléico idêntica (por exemplo, A, T, C, G, I) ou o resíduo de aminoácido idêntico (por exemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys e Met) ocorre em ambas as seqüências para gerar o número de posições compatíveis, dividindo-se o número de posições compatíveis pelo número total de posições na janela de comparação (ou seja, o tamanho da

janela), e multiplicando-se o resultado por 100 para gerar a percentagem de identidade de seqüência. Para os objetivos da presente invenção, o termo "identidade de seqüência" será subentendido para significar "percentagem de compatibilidade" calculada pelo programa de computador DNASIS (Versão 2.5 para Windows; disponível por Hitachi Software Engineering Co., Ltd., South San Francisco, Califórnia, EUA) usando parâmetros-padrão usados no manual de referência que acompanha o software.

Os termos "similaridade de seqüência" e "similaridade" são aqui usados de forma intercambiável para se referirem à percentagem do número de aminoácidos que são idênticos ou constituem substituições conservadoras definidas na Tabela 1 *infra*. A similaridade pode ser determinada com o uso de programas de comparação de seqüências como, por exemplo, GAP (Deveraux e *cols.* 1984, *Nucleic Acids Research* 12, 387-395). Dessa forma, seqüências de um comprimento similar ou substancialmente diferente em relação àquelas aqui citadas podem ser comparadas por inserção de lacunas (*gaps*) no alinhamento, essas lacunas sendo determinadas, por exemplo, pelo algoritmo de comparação usado por GAP.

Os termos usados para descrever relacionamentos de seqüências entre dois ou mais polinucleotídeos ou polipeptídeos incluem "seqüência de referência", "janela de comparação", "identidade de seqüência", "percentagem de identidade de seqüência" e "identidade substancial". Uma "seqüência de referência" possui pelo menos 12, mas freqüentemente 15 a 18 e freqüentemente pelo menos 25 unidades monoméricas, inclusive de nucleotídeos e resíduos de aminoácidos, de comprimento. Como cada um de dois

polipeptídeos pode compreender (1) uma seqüência (ou seja, apenas uma porção da seqüência polipeptídica completa) que é similar entre os dois polipeptídeos, e (2) uma seqüência que é divergente entre os dois polipeptídeos, comparações de seqüências entre dois (ou mais) polipeptídeos são realizadas tipicamente por comparação de seqüências dos dois polipeptídeos ao longo de uma "janela de comparação" para identificar e comparar regiões locais de similaridade de seqüência. Uma "janela de comparação" refere-se a um segmento conceitual de pelo menos 6 posições contíguas, normalmente cerca de 50 a cerca de 100, mais normalmente cerca de 100 a cerca de 150 nas quais uma seqüência é comparada com uma seqüência de referência do mesmo número de posições contíguas após as duas seqüências serem otimamente alinhadas. A janela de comparação pode compreender adições ou eliminações (ou seja, lacunas) de cerca de 20% ou menos, quando comparada com a seqüência de referência (que não compreende adições ou eliminações) para alinhamento ótimo das duas seqüências. O alinhamento ótimo de seqüências para o alinhamento de uma janela de comparação pode ser feito por implementações computadorizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA na Suíte de Programas Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EUA) ou por inspeção, e o melhor alinhamento (ou seja, que resulta na maior percentagem de homologia sobre a janela de comparação) gerado por qualquer um dos vários métodos é selecionado. A referência também pode ser feita em relação à família de programas BLAST como, por exemplo, revelado por Altschul *e cols.*, 1997,

Nucl. Acids Res. 25: 3.389. Uma discussão detalhada de análise de seqüências pode ser encontrada na Unidade 19.3 de Ausubel *e cols.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15.

O termo "população substancialmente purificada" e semelhantes significa que mais do que cerca de 80%, normalmente mais do que cerca de 90%, normalmente mais do que cerca de 95%, tipicamente mais do que cerca de 98%, e mais tipicamente mais do que cerca de 99% das células na população são células apresentadoras de antígeno de um tipo escolhido.

O termo "tratamento" significa pelo menos uma melhora dos sintomas associados à condição patológica que aflige o hospedeiro, em que a melhora é usada em um sentido amplo para se referir pelo menos a uma redução na magnitude de um parâmetro, por exemplo, sintoma, associado à condição patológica que está sendo tratada, por exemplo, o número de partículas virais per sangue unitário. Dessa forma, tratamento também inclui situações nas quais a condição patológica, ou pelo menos sintomas a ela associados, são completamente inibidos, por exemplo, têm a sua ocorrência evitada, ou interrompidos, por exemplo, terminados, de tal forma que o hospedeiro não sofra mais da condição patológica, ou pelo menos dos sintomas que caracterizam a condição patológica.

O termo "não cultivada", como aqui usado, refere-se a uma população de células (ou uma única célula) que foi removida de um animal e incubada ou processada sob condições que não resultam no crescimento ou expansão das células *in vitro*, ou que resulta em crescimento ou expansão

desprezível das células (por exemplo, um aumento de menos do que cerca de 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% ou 0,1% o número de células, quando comparado com o número de células no começo da incubação ou processamento). Em certas modalidades desejáveis, a população de células (ou a única célula) é incubada ou processada sob condições que apóiam a manutenção das células *in vitro*.

O termo "vetor" significa uma molécula de ácido nucléico, adequadamente uma molécula de DNA derivada, por exemplo, de um plasmídeo, bacteriófago ou vírus de planta, na qual uma seqüência de ácido nucléico pode ser inserida ou clonada. Um vetor preferivelmente contém um ou mais sítios de restrição únicos, e pode ser capaz de replicação autônoma em uma célula hospedeira definida, incluindo uma célula ou tecido-alvo ou uma célula progenitora ou tecido desta, ou ser integrável com o genoma do hospedeiro definido, de tal forma que a seqüência clonada seja reprodutível. Conseqüentemente, o vetor pode ser um vetor que se replica autonomamente, ou seja, um vetor que existe como uma entidade extracromossômica, cuja replicação é independente da replicação cromossômica, por exemplo, um plasmídeo linear ou circular fechado, um elemento extracromossômico, um minicromossomo ou um cromossomo artificial. O vetor pode conter qualquer meio para assegurar a auto-replicação. Alternativamente, o vetor pode ser aquele que, quando introduzido na célula hospedeira, é integrado no genoma e replicado junto com o(s) cromossomo(s) no qual foi integrado. Um sistema de vetores pode compreender um único vetor ou plasmídeo, dois ou mais

vetores ou plasmídeos, que, em conjunto, contêm o DNA total a ser introduzido no genoma da célula hospedeira, ou um transposon. A escolha do vetor tipicamente dependerá da compatibilidade do vetor com a célula hospedeira na qual o vetor será introduzido. O vetor pode também incluir um marcador de seleção como, por exemplo, um gene de resistência antibiótica, que pode ser usado para seleção de transformantes adequados.

2. Abreviações

As seguintes abreviações são usadas ao longo de todo o pedido:

AIDS = doença de imunodeficiência adquirida
APC = célula apresentadora de antígeno
ART = terapia antirretroviral
BIV = vírus da imunodeficiência bovina
CAEV = vírus da artrite-encefalite caprina
cm = centímetros
CTL = linfócito T citotóxico
EIAV = vírus da anemia infecciosa eqüina
FIV = vírus da imunodeficiência felina
g = gramas
G-CSF = fator estimulante de colônia de granulócitos
GM-CSF = fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos
h = hora
HIV = vírus da imunodeficiência humana
IFN-γ = interferon gama
IFN-α = interferon alfa
IL = interleucina

IV = intravenosa

mAb = anticorpo monoclonal

ml = mililitros

mg = miligramas

µg = microgramas

µl = microlitros

µm = micrômetro

MVV = vírus de Maedi/Visna

nm = nanômetros

NF-κB = fator nuclear kappa B

OPAL = leucócitos autólogos pulsados com peptídeos superpostos

PMBC = células mononucleares do sangue periférico

pró-GP = progenipoietina

SIV = vírus da imunodeficiência símia

TGFβ = fator de transformação do crescimento beta

TNF = fator de necrose tumoral

VL = carga viral

VLP = partículas vírus-*like*

3. Composições imunomoduladoras baseadas em antígeno Gag lentiviral

A presente invenção se baseia, em parte, na descoberta surpreendente de que não há diferença no resultado viral final entre animais imunizados contra Gag de SIV isoladamente e animais imunizados contra todo o proteoma do SIV. Adicionalmente, foi verificado inesperadamente que a imunização contra Gag de SIV, bem como com outros antígenos de SIV, induz respostas imunodominantes de células T não-

Gag, o que pode limitar o desenvolvimento de respostas de células T Gag-específicas terapêuticas ou profiláticas. Com base nessas observações, os inventores propõem que a terapia ou profilaxia lentiviral em um indivíduo não precisa visar vacinas lentivirais multiproteínas maximamente amplas, mas, em vez disso, ser obtida basicamente por aumento do número de células apresentadoras de antígeno ou precursores da célula apresentadora de antígeno (também aqui denominadas, respectivamente, células apresentadoras de antígeno Gag-específicas ou precursores da célula apresentadora de antígeno Gag-específica) no indivíduo, que apresentam pelo menos um peptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma porção de um polipeptídeo Gag. Dessa forma, a presente invenção fornece métodos de tratamento ou prevenção de uma infecção por lentivírus em um indivíduo, em que os métodos consistem basicamente no aumento do número de células apresentadoras de antígeno Gag-específicas ou precursores no indivíduo.

Em algumas modalidades, os métodos compreendem a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um estimulador imune que aumenta o número de células apresentadoras de antígeno Gag-específicas ou precursores destas. Por exemplo, o estimulador imune pode consistir basicamente em um polipeptídeo Gag ou pelo menos um peptídeo (aqui também denominado um peptídeo Gag) que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma porção de um polipeptídeo Gag. Alternativamente, o estimulador imune pode consistir basicamente em uma construção de ácido nucléico que compreende uma seqüência

codificadora para um polipeptídeo Gag ou pelo menos um peptídeo Gag, ligada operacionalmente a uma seqüência reguladora. Em outros exemplos ilustrativos, o estimulador imune consiste basicamente em células apresentadoras de antígeno Gag-específicas autólogas ou alogênicas ou seus precursores. Células apresentadoras de antígeno não limitantes incluem células dendríticas, macrófagos e células de Langerhans.

Em exemplos ilustrativos, portanto, o número de células apresentadoras de antígeno Gag-específicas ou de precursores da célula apresentadora de antígeno Gag-específica pode ser aumentado por:

(1) administração ao indivíduo das células apresentadoras de antígeno ou de seus precursores (por exemplo, células apresentadoras de antígeno autólogas ou precursores do indivíduo ou de células apresentadoras de antígeno alogênicas ou de seus precursores de um doador histocompatível), que foram colocadas em contato (por exemplo, *ex vivo* ou *in vivo*) com uma composição que consiste basicamente em um polipeptídeo Gag ou pelo menos um peptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a um polipeptídeo Gag, por um período e sob condições suficientes para que o polipeptídeo Gag ou o(s) peptídeo(s), ou formas processadas do polipeptídeo Gag ou do(s) peptídeo(s), seja apresentado pelas células apresentadoras de antígeno ou por seus precursores;

(2) administração ao indivíduo das células apresentadoras de antígeno ou de seus precursores (por exemplo, células apresentadoras de antígeno autólogas ou precursores do indivíduo ou células apresentadoras de

antígeno alogênicas ou precursores de um doador histocompatível), que contêm uma construção de ácido nucléico (aqui também denominada uma construção de ácido nucléico que expressa Gag) que compreende uma seqüência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo Gag ou pelo menos um peptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma porção de um polipeptídeo Gag, em que a seqüência de nucleotídeos está conectada operacionalmente a um promotor que é operável nas células apresentadoras de antígeno ou em seus precursores;

(3) administração ao indivíduo de uma composição que consiste basicamente em pelo menos uma molécula de Gag selecionada de um polipeptídeo Gag, um peptídeo que compreende uma seqüência que corresponde a uma porção de um polipeptídeo Gag e uma construção de ácido nucléico que expressa Gag. A molécula de Gag pode estar em forma solúvel ou particulada.

3.1 Polipeptídeos e peptídeos Gag

A presente invenção contempla o uso de polipeptídeos Gag de comprimento total, bem como de peptídeos (aqui também denominados peptídeos Gag) que compreendem seqüências de aminoácidos que correspondem às porções de polipeptídeos Gag de comprimento total, para a produção de célula apresentadora de antígeno Gag-específica ou seus precursores. Peptídeos ilustrativos compreendem pelo menos cerca de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 300, 400 ou 500 resíduos de aminoácidos contíguos, ou quase até o número total de aminoácidos presentes em um polipeptídeo Gag de comprimento total.

Tipicamente, os peptídeos Gag são de um tamanho adequado que possa ser processado e/ou apresentado por células apresentadoras de antígeno ou seus precursores. Diversos fatores podem influenciar a escolha do tamanho do peptídeo. Por exemplo, o tamanho de um peptídeo pode ser escolhido de tal modo que ele inclua, ou corresponda ao tamanho de, epitopos de célula T CD4+, epitopos de célula T CD8+ e/ou epitopos de célula B, e suas exigências de processamento. Os profissionais na técnica reconhecerão que epitopos de célula T CD8+ restritos à classe I possuem tipicamente entre 8 e 10 resíduos de aminoácidos de comprimento e, se colocados próximos a resíduos flanqueadores não naturais, esses epitopos podem geralmente exigir 2 a 3 resíduos de aminoácidos flanqueadores naturais para assegurar que sejam eficientemente processados e apresentados. Epitopos de célula T CD4+ restritos à classe II normalmente variam entre 12 e 25 resíduos de aminoácidos de comprimento e podem não precisar de resíduos flanqueadores naturais para um processamento proteolítico eficiente, embora se acredite que resíduos flanqueadores naturais possam participar. Outra característica importante de epitopos restritos à classe II é que eles geralmente contêm um núcleo de 9-10 resíduos de aminoácidos no meio que se ligam especificamente às moléculas MHC da classe II com seqüências flanqueadoras em um dos lados desse núcleo que estabilizam a ligação por associação com estruturas conservadas em um dos lados de antígenos de MHC da classe II de uma forma independente da seqüência. Dessa forma, a região funcional de epitopos restritos à classe II possui comprimento tipicamente de menos de cerca de 15 resíduos de

aminoácidos. O tamanho de epitopos lineares de célula B e dos fatores que efetuam seu processamento, como epitopos restritos à classe II, é bem variável, embora esses epitopos freqüentemente tenham tamanho menor do que 15 resíduos de aminoácidos. A partir do que foi apresentado anteriormente, é vantajoso, mas não essencial, que o tamanho do peptídeo seja de pelo menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 resíduos de aminoácidos. Adequadamente, o tamanho do peptídeo é de, no máximo, cerca de 500, 200, 100, 80, 60, 50, 40 resíduos de aminoácidos. Em algumas modalidades, o tamanho do peptídeo é suficientemente grande para minimizar a perda de epitopos de célula T e/ou de célula B. Em outras modalidades, o tamanho do peptídeo é suficiente para apresentação por uma célula apresentadora de antígeno de um epitopo de célula T e/ou de um epitopo de célula B contido dentro do peptídeo. Em um exemplo ilustrativo desse tipo, o tamanho do peptídeo é de cerca de 15 resíduos de aminoácidos.

Várias seqüências de polipeptídeos Gag e suas seqüências codificadoras correspondentes são conhecidas na técnica, que podem ser usadas para a preparação de polipeptídeos e peptídeos Gag purificados, sintéticos ou recombinantes ou sua seqüência codificadora. Seqüências de polipeptídeo Gag ilustrativas podem ser obtidas por quaisquer bases de dados disponíveis publicamente, incluindo GenBank, EMBL e SWISSPROT. Por exemplo, seqüências de polipeptídeo Gag de HIV-1 representativas são disponíveis no GenBank sob os seguintes números de acesso: AAB04036, AAB03744, AAB59875, AAA44853, AAB04036, AAB50258, AAA44987 e AAB59747. Seqüências não limitantes de

polipeptídeo Gag de HIV-2 estão disponíveis no GenBank sob os seguintes números de acesso: AAB00736, AAA76840, AAA43932, AAB00745, AAB00763, AAB01351 e AAA43941. Adicionalmente, seqüências de polipeptídeo Gag de SIV ilustrativas estão disponíveis no GenBank sob os seguintes números de acesso: AAA91905, AAA91913, AAA47588, AAA91922, AAA74706, AAA47632, AAB59905, AAA91930 e AAB59769. Seqüências de polipeptídeo Gag de FIV ilustrativas estão disponíveis no GenBank sob os seguintes números de acesso: AAB59936, AAA43075 e AAB09309. Um exemplo não limitante de seqüências de polipeptídeo Gag de BIV está disponível no GenBank sob número de acesso AAA91270. Seqüências de polipeptídeo Gag de E1AV ilustrativas estão disponíveis no GenBank sob os seguintes números de acesso: AAB59861 e AAA43003. Exemplos não limitantes de seqüências de polipeptídeo Gag de Visna estão disponíveis no GenBank sob os seguintes números de acesso: AAA17520, AAA48353, AAA48358, AAA17523 e AAA17528. Uma seqüência representativa do polipeptídeo Gag de CAEV está disponível no GenBank sob número de acesso AAA91825. Seqüências ilustrativas do polipeptídeo Gag de lentivírus ovino estão disponíveis no GenBank sob os seguintes números de acesso: AAA66811 e AAA46779. Deve-se entender, no entanto, que a presente invenção não se limita a qualquer aminoácido ou seqüências de ácidos nucléicos de Gag específicas e se estende amplamente a quaisquer polipeptídeos Gag nativos ou recombinantes ou suas seqüências codificadoras.

Em modalidades específicas, diversos peptídeos são usados para produzir as células apresentadoras de antígeno Gag-específicas ou seus precursores, em que os peptídeos

individuais compreendem porções diferentes de uma seqüência de aminoácidos que correspondem a um polipeptídeo Gag e, opcionalmente, exibem identidade ou similaridade de seqüência parcial para pelo menos outro peptídeo dos diversos peptídeos. A identidade ou similaridade de seqüência parcial está tipicamente contida em uma ou em ambas as extremidades de um peptídeo individual. Em uma modalidade, há pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 40, 50 resíduos de aminoácidos contíguos em uma ou em ambas as extremidades de um peptídeo individual, cuja seqüência é idêntica ou similar a uma seqüência de aminoácidos contida dentro de pelo menos outro dos peptídeos. Em modalidades alternativas, há menos de 500, 100, 50, 40, 30 resíduos de aminoácidos contíguos em uma ou em ambas as extremidades de um peptídeo individual, cuja seqüência é idêntica ou similar a uma seqüência de aminoácidos contida dentro de pelo menos outro dos peptídeos. Essa "superposição de seqüências" é vantajosa para evitar ou de algum modo reduzir a perda de quaisquer epitopos potenciais contidos dentro de um polipeptídeo Gag. Em exemplos específicos aqui revelados, a superposição de seqüências é de 11 resíduos de aminoácidos.

Em certas modalidades, o tamanho dos peptídeos individuais é de cerca de 14 ou 15 resíduos de aminoácidos e a superposição de seqüências em uma ou em ambas as extremidades de um peptídeo individual é de cerca de 11 resíduos de aminoácidos. No entanto, será subentendido que outros tamanhos de peptídeo adequados e tamanhos da superposição de seqüências são contemplados pela presente invenção, o que pode ser facilmente verificado por aqueles

habilitados na técnica.

Tipicamente, quando os peptídeos possuem similaridade de seqüência parcial, suas seqüências normalmente diferirão em uma ou mais substituições de aminoácidos conservadoras e/ou não conservadoras. Substituições conservadoras estão listadas na Tabela 1. Substituições conservadoras ou não conservadoras podem corresponder aos polimorfismos dentro de Gag. A esse respeito, é sabido que polipeptídeos Gag polimórficos são expressos por diferentes cepas ou clados virais. Dessa forma, quando houver regiões polimórficas em Gag, é geralmente desejável usar conjuntos adicionais de peptídeos que cubram a variação no resíduo de aminoácido no sítio polimórfico.

É vantajoso, mas não necessário, utilizar toda a seqüência de um polipeptídeo Gag para a produção de diversos peptídeos superpostos. Tipicamente, pelo menos 330, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42. 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% da seqüência que correspondem a um polipeptídeo Gag são usados para produzir os peptídeos superpostos. No entanto, será subentendido que, quanto mais informação de seqüência de um polipeptídeo Gag que é utilizada para produzir os peptídeos superpostos, maior será a cobertura da população de parentes dos peptídeos superpostos como um imunógeno. Adequadamente, nenhuma informação de seqüências do polipeptídeo Gag é excluída (por exemplo, por causa de uma ausência aparente de epitopos imunológicos, na medida em

que epitopos mais raros ou subdominantes podem ser inadvertidamente perdidos). Se necessário, seqüências hipervariáveis dentro de um polipeptídeo Gag podem ser excluídas da construção de um conjunto de peptídeos superpostos, ou conjuntos adicionais de peptídeos que cobrem as regiões polimórficas podem ser construídos e administrados. Seqüências peptídicas podem incluir seqüências adicionais que não são derivadas de um polipeptídeo Gag. Essas seqüências adicionais podem ter várias funções, incluindo aumento da solubilidade, estabilidade ou imunogenicidade ou facilitação da purificação. Tipicamente, essas seqüências adicionais estão contidas em uma ou em ambas as extremidades de um respectivo peptídeo.

Peptídeos superpostos podem ser projetados com base em qualquer seqüência de aminoácidos Gag adequado, cujos exemplos ilustrativos estão listados acima e nas Tabelas 4 e 5. Peptídeo superposto representativo para a modulação da resposta imune ao vírus da imunodeficiência símia (SIV) e/ou ao SIV-HIV-1 quimérico (SHIV), ambos sabidamente modelos adequados para o vírus HIV-1 patogênico em seres humanos, pode ser baseado em uma ou mais das seqüências de polipeptídeos Gag apresentadas nas Tabelas 2 e 3 *infra*.

Os polipeptídeos e peptídeos Gag podem ser preparados por qualquer procedimento conhecido por aqueles habilitados na técnica. Por exemplo, peptídeos Gag podem ser sintetizados convenientemente por utilização de síntese em solução ou síntese em fase sólida, como descrito, por exemplo, no Capítulo 9 de Atherton e Shephard (1989, "Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach". IRL Press,

Oxford) e em Roberge *e cols.* (1995, *Science* 269: 202). As sínteses podem empregar, por exemplo, químicas de t-butiloxicarbonil (t-Boc) ou 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc) (veja o Capítulo 9.1 de Coligan *e cols.*, "Current Protocols in Protein Science", John Wiley & Sons, Inc. 1995-1997; Stewart e Young, 1984, "Solid Phase Peptide Synthesis", 2ª Edição Pierce Chemical Co., Rockford, Ill; e Atherton e Shephard, *supra*). Em modalidades específicas, os peptídeos individuais são solubilizados em DMSO (por exemplo, DMSO 100% puro) em concentração elevada (1 mg de peptídeo/10-30 µl de DMSO), de tal forma que grandes pools de peptídeos não contenham quantidades excessivas de DMSO quando pulsados em células. Em certas modalidades vantajosas, um ou mais conjuntos de peptídeos, em forma solúvel, são colocados em um único recipiente para administração conveniente (por exemplo, um tubo ou frasco de sangue para pronta reinfusão) a um indivíduo, e esses recipientes também são contemplados pela presente invenção.

Alternativamente, um polipeptídeo ou peptídeo Gag pode ser preparado por um procedimento que inclui as etapas de: (a) preparação de uma construção de ácido nucléico que compreende uma seqüência de nucleotídeos que codifica o polipeptídeo ou peptídeo Gag, em que a seqüência de nucleotídeos está ligada operacionalmente a uma seqüência reguladora; (b) introdução da construção de ácido nucléico em uma célula hospedeira adequada; (c) cultivo da célula hospedeira para expressar a seqüência de nucleotídeos; e (d) isolamento do polipeptídeo ou peptídeo Gag. A construção de ácido nucléico está tipicamente na forma de um vetor de expressão. Por exemplo, o vetor de expressão

pode ser um vetor extracromossômico auto-replicante como, por exemplo, um plasmídeo, ou um vetor que se integra no genoma de um hospedeiro. Tipicamente, a seqüência reguladora inclui, sem limitação, seqüências promotoras, seqüências líderes ou sinalizadoras, sítios de ligação de ribossomo, seqüências de início e de parada da transcrição, seqüências de início e terminação da tradução, e seqüências intensificadoras ou ativadoras. Promotores constitutivos ou indutíveis, como conhecidos na técnica, são contemplados pela invenção. Os promotores podem ser promotores de ocorrência natural, ou promotores híbridos que combinam elementos de mais de um promotor. A seqüência reguladora geralmente será adequada à célula hospedeira usada para expressão. Vários tipos de vetores de expressão apropriados e polinucleotídeos reguladores adequados são conhecidos na técnica para diversas células hospedeiras. Em certas modalidades, o vetor de expressão contém um gene marcador selecionável para permitir a seleção de células hospedeiras transformadas. Genes de seleção são bem conhecidos na técnica e irão variar com a célula hospedeira usada. Em outras modalidades, o vetor de expressão também inclui uma seqüência de ácido nucléico que codifica um parceiro de fusão, de tal forma que o polipeptídeo ou peptídeo Gag seja expresso como um polipeptídeo de fusão com o parceiro de fusão. A principal vantagem de parceiros de fusão é que eles ajudam na identificação e/ou purificação do polipeptídeo de fusão. Parceiros de fusão exemplares incluem, sem limitação, glutationa-S-transferase (GST), porção Fc de IgG humana, proteína de ligação de maltose (MBP) e hexahistidina (HIS_6), que são particularmente úteis

para o isolamento do polipeptídeo de fusão por cromatografia por afinidade. A fim de purificar o polipeptídeo de fusão por cromatografia por afinidade, matrizes relevantes para cromatografia por afinidade são resinas conjugadas à glutationa, amilose e níquel ou cobalto, respectivamente. Muitas dessas matrizes estão disponíveis em forma de "kit", por exemplo, o sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil com parceiros de fusão (His_6), e o sistema de purificação Pharmacia GST. Em uma modalidade preferida, o polinucleotídeo recombinante é expresso no vetor comercial pFLAG™. Vantajosamente, os parceiros de fusão também possuem sítios de clivagem de protease, por exemplo, para o Fator X_a, Trombina e inteínas (íntrons de proteína), que permitem que a protease relevante efetue a digestão parcial do polipeptídeo de fusão da invenção e, dessa forma, libere o polipeptídeo ou peptídeo Gag recombinante deste. O polipeptídeo ou peptídeo Gag liberado pode então ser isolado do parceiro de fusão por separação cromatográfica subseqüente. Parceiros de fusão de acordo com a invenção também incluem em seu escopo "*tags* de epitopo", que são normalmente seqüências peptídicas curtas para as quais um anticorpo específico está disponível. Exemplos bem conhecidos de *tags* de epitopo para os quais anticorpos monoclonais específicos são facilmente disponíveis incluem *tags* de c-Myc, vírus da influenza, hemaglutinina e FLAG.

A etapa de introdução da construção de ácido nucléico na célula hospedeira pode ser obtida usando qualquer técnica adequada, incluindo transfecção e transformação, cuja escolha dependerá da célula hospedeira empregada.

Esses métodos são bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Os peptídeos da invenção podem ser produzidos por cultivo de uma célula hospedeira transformada com a construção sintética. As condições adequadas à expressão de proteína irão variar com a escolha do vetor de expressão e da célula hospedeira. Isso é facilmente constatado por aqueles habilitados na técnica por meio de experimentação de rotina. Células hospedeiras adequadas à expressão podem ser procarióticas ou eucarióticas. Uma célula hospedeira preferida para expressão de um polipeptídeo de acordo com a invenção é uma bactéria. A bactéria usada pode ser *Escherichia coli*. Alternativamente, a célula hospedeira pode ser uma célula de inseto como, por exemplo, células SF9, que podem ser utilizadas com um sistema de expressão de baculovírus.

Os aminoácidos dos polipeptídeos ou peptídeos Gag podem ser de ocorrência não natural ou de ocorrência natural. Exemplos de aminoácidos não naturais e derivados durante a síntese peptídica incluem, sem limitação, o uso de ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminohexanóico, ácido 4-amino-3-hidróxi-5-fenilpentanóico, ácido 4-amino-3-hidróxi-6-metilheptanóico, t-butilglicina, norleucina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina, 2-tienil alanina e/ou D-isômeros de aminoácidos. Uma lista dos aminoácidos não naturais contemplados pela presente invenção é mostrada na Tabela 6.

A invenção também contempla a modificação dos polipeptídeos e peptídeos Gag com o uso de técnicas comuns de biologia molecular, de modo a alterar sua resistência à degradação proteolítica ou para otimizar as propriedades de

solubilidade ou torná-los mais adequados como um agente imunogênico.

3.2 Construções de ácido nucléico que expressam *Gag* para terapia gênica

Em modalidades específicas, construções de ácido nucléico que compreendem seqüências codificadoras de Gag operacionalmente conectadas a um elemento regulador são usadas para produzir as células apresentadoras de antígeno Gag-específicas, como forma de terapia gênica. A terapia gênica refere-se à terapia realizada pela administração a um indivíduo de um ácido nucléico expressado ou passível de expressão. Nessas modalidades da invenção, as construções de ácido nucléico produzem seu(s) polipeptídeo(s) ou peptídeo(s) Gag codificado(s) em células apresentadoras de antígeno e, dessa forma, medeiam o efeito terapêutico ou profilático desejado.

Qualquer um dos métodos para terapia gênica disponíveis na técnica pode ser usado de acordo com a presente invenção. Métodos exemplares são descritos abaixo.

Para revisões gerais dos métodos de terapia gênica, veja Goldspiel *e cols.*, *Clinical Pharmacy* 12: 488-505 (1993); Wu e Wu, *Biotherapy* 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260: 926-932 (1993); e Morgan e Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217 (1993); *TIBTECH11* (5): 155-215 (maio de 1993). Métodos comumente conhecidos na técnica da tecnologia de DNA recombinante que podem ser usados são descritos em Ausubel *e cols.*, eds., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, NY (1993); e Kriegler, "Gene Transfer and Expression, A Laboratory

Manual", Stockton Press, NY (1990).

A liberação das construções de ácido nucléico em células apresentadoras de antígeno ou precursores pode ser obtida diretamente por exposição de um paciente à construção de ácido nucléico ou primeiro transformando-se as células apresentadoras de antígeno ou seus precursores com a construção de ácido nucléico *in vitro*, e depois transplantando as células apresentadoras de antígeno ou precursores transformados no paciente. Essas duas abordagens são conhecidas, respectivamente, como terapia gênica *in vivo* ou *ex vivo*.

Como descrito, por exemplo, na Patente U.S. N° 5.976.567 (Inex), a expressão de ácidos nucléicos naturais ou sintéticos é tipicamente obtida ligando-se operacionalmente um ácido nucléico de interesse a um promotor (que pode ser constitutivo ou indutível), normalmente incorporando-se a construção em um vetor de expressão e introduzindo-se o vetor em uma célula hospedeira adequada. Vetores típicos contêm terminadores da transcrição e tradução, seqüências de iniciação da transcrição e tradução, e promotores úteis para a regulação da expressão do ácido nucléico em particular. Os vetores opcionalmente compreendem cassetes de expressão genéricos que contêm pelo menos uma seqüência terminadora independente, seqüências que permitem a replicação do cassete em eucariotas ou procariotas, ou em ambos (por exemplo, vetores *shuttle*), e marcadores de seleção para sistemas procarióticos e eucarióticos. Os vetores podem ser adequados à replicação e integração em procariotas, eucariotas, ou preferivelmente em ambos. Veja Giliman e

Smith (1979), *Gene*, 8: 81-97; Roberts e *cols.* (1987), *Nature*, 328: 731-734; Berger e Kimmel, "Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology", Volume 152, Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Sambrook e *cols.* (1989), "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" (2ª Edição) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (Sambrook); e F.M. Ausubel e *cols.*, "Current Protocols in Molecular Biology", eds., "Current Protocols", um empreendimento conjunto entre Greene Publishing Associates, Inc. e John Wiley & Sons, Inc., (1994 Supplement) (Ausubel).

Vetores de expressão que contêm elementos reguladores de vírus eucarióticos como, por exemplo, retrovírus, são tipicamente usados para expressão de seqüências de ácidos nucléicos em células eucarióticas. Vetores de SV40 incluem pSVT7 e pMT2. Vetores derivados de vírus do papiloma bovino incluem pBV-1MTHA, e vetores derivados do vírus de Epstein-Barr incluem pHEBO e p205. Outros vetores exemplares incluem pMSG, pAV009/A+, pMT010/A+, pMAMneo-5, baculovírus pDSVE, e qualquer outro vetor que permita a expressão de proteínas sob a direção do promotor precoce de SV-40, promotor tardio de SV-40, promotor de metalotioneína, promotor do vírus de tumor mamário murídeo, promotor do vírus do sarcoma de Rous, promotor de polihedrina, ou outros promotores comprovadamente eficazes para expressão em células eucarióticas.

Embora diversos vetores possam ser usados, deve-se observar que vetores virais de expressão são úteis para modificação de células eucarióticas por causa da alta eficiência com a qual os vetores virais transfectam

células-alvo e se integram no genoma da célula-alvo. Vetores de expressão desse tipo ilustrativos podem ser derivados de seqüências de DNA viral, incluindo, sem limitação, adenovírus, vírus adenoassociados, vírus do herpes-simplex e retrovírus como, por exemplo, retrovírus B, C e D, além de espumavírus e lentivírus modificados. Vetores de expressão adequados à transfecção de células animais são descritos, por exemplo, por Wu e Ataai (2000, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11(2), 205-208), Vigna e Naldini (2000, *J. Gene Med.* 2(5), 308-316), Kay *e cols.* (2001, *Nat. Med.* 7(1), 33-40), Athanasopoulos, *e cols.* (2000, *Int. J. Mol. Med.* 6(4), 363-375) e Walther e Stein (2000, *Drugs* 60(2), 249-271).

A porção codificadora de Gag do vetor de expressão pode compreender uma seqüência de ocorrência natural ou uma variante desta, que foi criada geneticamente com o uso de técnicas recombinantes. Em um exemplo de uma variante, a composição de códons de um polinucleotídeo codificador de antígeno é modificada para permitir a expressão aumentada do antígeno em uma célula ou tecido-alvo de escolha com o uso de métodos como apresentados em detalhe nas Publicações Internacionais WO 99/02694 e WO 00/42215. Resumidamente, esses métodos se baseiam na observação de que as eficiências de tradução de diferentes códons variam entre células ou tecidos diferentes e que essas diferenças podem ser exploradas, junto com a composição de códons de um gene, para regular a expressão de uma proteína em um tipo de célula ou tecido em particular. Dessa forma, para a construção de polinucleotídeos com códons otimizados, pelo menos um códon existente de um polinucleotídeo parente é

substituído com um códon sinônimo que possui uma eficiência de tradução mais elevada em uma célula ou tecido-alvo do que o códon existente que ele substitui. Embora seja desejável substituir todos os códons existentes de uma molécula de ácido nucléico parente com códons sinônimos que possuam aquela eficiência de tradução mais elevada, isso não é necessário, pois a expressão aumentada pode ser obtida até mesmo com substituição parcial. Adequadamente, a etapa de substituição afeta 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, mais preferivelmente 35%, 40%, 50%, 60%, 70% ou mais dos códons existentes de um polinucleotídeo parente.

O vetor de expressão é compatível com a célula apresentadora de antígeno ou precursor na qual é introduzido, de tal forma que o polinucleotídeo codificador de antígeno seja passível de expressão naquela célula ou precursor. O vetor de expressão é introduzido na célula apresentadora de antígeno ou seu precursor por qualquer meio adequado, o que dependerá da escolha particular do vetor de expressão e da célula apresentadora de antígeno empregada. Esses meios de introdução são bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Por exemplo, a introdução pode ser efetuada pelo uso de contato (por exemplo, no caso de vetores virais), eletroporação, transformação, transdução, conjugação ou pareamento triparental, transfecção, fusão de membrana de infecção com lipídeos catiônicos, bombardeamento em alta velocidade com microprojéteis revestidos com DNA, incubação com precipitado de fosfato de cálcio-DNA, microinjeção direta em células únicas, e semelhantes. Outros métodos também estão disponíveis e são conhecidos por aqueles habilitados

na técnica. Alternativamente, os vetores são introduzidos por meio de lipídeos catiônicos, por exemplo, lipossomos. Esses lipossomos estão disponíveis comercialmente (por exemplo, Lipofectin®, Lipofectamine™, e semelhantes, fornecidos por Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg, Md.).

Em outras modalidades, a construção de ácido nucléico é introduzida em células apresentadoras de antígeno ou seus precursores por sua administração ligada a um ligante sujeito à endocitose mediada por receptor (veja, por exemplo, Wu e Wu, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432 (1987)) (que pode ser usada em tipos de célula-alvo que expressam especificamente os receptores) etc. Ainda em outras modalidades, podem ser formados complexos de ácido nucléico-ligante nos quais o ligante compreende um peptídeo fusogênico viral para a ruptura de endossomos, permitindo a construção de ácido nucléico para evitar a degradação lisossômica. Ainda em outras modalidades, a construção de ácido nucléico pode ser direcionada *in vivo* para captação e expressão célula-específicas, por direcionamento a um receptor específico (veja, por exemplo, Publicações PCT WO 92/06180 datada de 16 de abril de 1992 (Wu *e cols.*); WO 92/22635 datada de 23 de dezembro de 1992 (Wilson *e cols.*); WO 92/20316 datada de 26 de novembro de 1992 (Findeis e *cols.*); WO 093/14188 datada de 22 de julho de 1993 (Clarke *e cols.*); e WO 93/20221 datada de 14 de outubro de 1993 (Young)). Alternativamente, o ácido nucléico pode ser introduzido intracelularmente e incorporado dentro do DNA da célula hospedeira para expressão, por recombinação homóloga (Koller e Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:

8.932-8.935 (1989); Zijlstra *e cols.*, *Nature* 342: 435-438 (1989)).

Outra abordagem para a terapia gênica envolve a transferência da construção de ácido nucléico às células em cultura de tecido, o que normalmente inclui a transferência de um marcador selecionável para as células. As células são então colocadas sob seleção para isolar aquelas células que foram recolhidas e estão expressando o gene transferido. Essas células são então liberadas a um paciente. Nessa modalidade, a construção de ácido nucléico é introduzida em células apresentadoras de antígeno ou seus precursores antes da administração *in vivo* das células recombinantes resultantes. Essa introdução pode ser realizada por qualquer método conhecido na técnica, incluindo, sem limitação, transfecção, eletroporação, microinjeção, infecção com um vetor viral ou bacteriófago contendo as seqüências de ácidos nucléicos, fusão de células, transferência gênica mediada por cromossomo, transferência gênica mediada por microcélula, fusão de esferoplasto etc. Várias metodologias são conhecidas na técnica para a introdução de genes estranhos em células (veja, por exemplo, Loeffler e Behr, *Meth. Enzymol.* 217: 599-618 (1993); Cohen *e cols.*, *Meth. Enzymol.* 217: 618-644 (1993); Cline, *Pharmac. Ther.* 29: 69-92 (1985)) e podem ser usadas de acordo com a presente invenção, desde que as funções de desenvolvimento e fisiológicas das células receptoras não sejam rompidas. A técnica deve permitir a transferência estável do ácido nucléico à célula, de tal modo que o ácido nucléico seja passível de expressão pela célula e preferivelmente herdável e passível de expressão por sua

prole de células. As células recombinantes resultantes podem ser liberadas a um paciente por vários métodos conhecidos na técnica. Células apresentadoras de antígeno recombinantes são administradas tipicamente por via intravenosa.

3.3 Modalidades de partículas

Em algumas modalidades, o(s) polipeptídeo(s) ou peptídeo(s) Gag, como descrito de forma ampla na Seção 3.1, ou as construções de ácido nucléico que expressam Gag, como descritas de forma ampla na Seção 3.2 (aqui também denominadas "estimuladores imunes" ou "estimuladores imunes de Gag"), são fornecidos em forma particulada (aqui também denominadas "partículas de Gag"). Essas modalidades são particularmente vantajosas para liberação dos estimuladores imunes às células apresentadoras de antígeno ou aos seus precursores, *ex vivo* ou *in vivo*, já que as partículas são recolhidas preferencialmente (por exemplo, por endocitose ou fagocitose) por essas células. Diversas partículas podem ser usadas na invenção, incluindo, sem limitação, lipossomos, micelas, partículas lipídicas, partículas cerâmicas/inorgânicas e partículas poliméricas, e são tipicamente selecionadas de nanopartículas e micropartículas. As partículas são dimensionadas adequadamente para fagocitose ou endocitose por células apresentadoras de antígeno ou seus precursores.

Células apresentadoras de antígeno incluem tipos de células apresentadoras de antígeno tanto profissionais quanto facultativas. Células apresentadoras de antígeno profissionais incluem, sem limitação, macrófagos, monócitos, linfócitos B, células da linhagem mielóide,

incluindo precursores monocíticos-granulocíticos-DC, células de Kupffer da zona de marginal, microglia, células T, células de Langerhans e células dendríticas, incluindo células dendríticas de interdigitação e células dendríticas foliculares. Exemplos de células apresentadoras de antígeno facultativas incluem, sem limitação, células T ativadas, astrócitos, células foliculares, endotélio e fibroblastos. Em algumas modalidades, a célula apresentadora de antígeno é selecionada de monócitos, macrófagos, linfócitos B, células da linhagem mielóide, células dendríticas ou células de Langerhans. Em modalidades específicas, a célula apresentadora de antígeno expressa CD11c e inclui uma célula dendrítica. Em exemplos ilustrativos, as partículas possuem uma dimensão de menos do que cerca de 100 µm, mais adequadamente na faixa de menos ou igual a cerca de 500 nm, embora as partículas possam ser tão grande quanto cerca de 10 µm, e tão pequenas quanto poucos nm. Lipossomos consistem basicamente em uma bicamada de fosfolipídeo que forma uma pequena concha ao redor de um núcleo aquoso. Vantagens incluem a lipofilicidade das camadas externas que "mimetizam" as camadas externas da membrana de células e que são recolhidas de forma relativamente fácil por diversas células. Veículos poliméricos tipicamente consistem em micro/nanoesferas e micro/nanocápsulas formadas de polímeros biocompatíveis, que são biodegradáveis (por exemplo, ácido polilático) ou não biodegradáveis (por exemplo, acetato de etilenovinila). Algumas das vantagens dos dispositivos poliméricos são a facilidade de fabricação e a alta capacidade de carga, a variação de tamanhos, de um diâmetro de nanômetro a mícron,

bem como a liberação controlada e o perfil de degradação.

Em algumas modalidades, as partículas compreendem uma molécula de ligação de antígeno em sua superfície, que é imunointerativa com um marcador que é expresso em níveis mais elevados em células apresentadoras de antígeno (por exemplo, células dendríticas) do que em células não apresentadoras de antígeno. Marcadores ilustrativos desse tipo incluem MGL, DCL-1, DEC-205, macrófago manose R, DC-SIGN ou outros receptores específicos para DC ou mielóide (lectina) como, por exemplo, revelado por Hawiger e *cols.* (2001, *J. Exp. Med.* 194, 769), Kato e *cols.* 2003, *J. Biol. Chem.* 278, 34.035), Benito e *cols.* (2004, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 10.355), Schjetne, e *cols.* (2002, *Int. Immunol.* 14, 1.423) e van Vliet e *cols.*, 2006, *Nat. Immunol.* Sep 24; [Epub anterior â impressão])(van Vliet e *cols.*, *Immunobiology* 2006, 211: 577-585).

As partículas podem ser preparadas a partir de uma combinação do(s) estimulador(es) imune(s), e um tensoativo, excipiente ou material polimérico. Em algumas modalidades, as partículas são biodegradáveis e biocompatíveis e, opcionalmente, são capazes de se biodegradar em uma taxa controlada para a liberação de um agente terapêutico ou diagnóstico. As partículas podem ser feitas de diversos materiais. Podem ser usados materiais tanto inorgânicos quanto orgânicos. Materiais poliméricos e não poliméricos, por exemplo, ácidos graxos, podem ser usados. Outros materiais adequados incluem, sem limitação, gelatina, polietileno glicol, trealulose, dextrana e quitosana. Partículas com tempos de degradação e de liberação que variam de segundos a meses podem ser projetadas e

fabricadas, com base em fatores como, por exemplo, o material da partícula.

3.3.1 Partículas poliméricas

Partículas poliméricas podem ser formadas a partir de qualquer polímero, copolímero ou mistura biocompatível e desejavelmente biodegradável. Os polímeros podem ser adaptados para otimizar diferentes características da partícula, incluindo: i) interações entre os estimuladores imunes a serem liberados e o polímero para fornecer estabilização dos estimuladores imunes e retenção da atividade após liberação; ii) taxa de degradação do polímero e, dessa forma, taxa de perfis de liberação do agente; iii) características da superfície e capacidades de direcionamento por meio de modificação química; e iv) porosidade da partícula.

Polímeros de erosão de superfície como, por exemplo, polianidridos, podem ser usados para formar as partículas. Por exemplo, polianidridos como, por exemplo, poli[(p-carboxifenoxi)-hexano anidrido], (PCPH) podem ser usados. Polianidridos biodegradáveis são descritos na Patente U.S. Nº 4.857.311.

Em outras modalidades, polímeros de erosão em massa, tais como aqueles baseados em poliésteres, incluindo poli(hidróxi ácidos) ou poli(ésteres), podem ser usados. Por exemplo, ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA), ou copolímeros destes, podem ser usados para formar as partículas. O poliéster também pode ter um grupo com carga ou funcionalizável, por exemplo, um aminoácido. Em exemplos ilustrativos, partículas com propriedades de liberação controlada podem ser formadas de poli(ácido D,L-

lático) e/ou poli(ácido D,L-lático-co-glicólico) ("PLGA") que incorporam um tensoativo como, por exemplo, DPPC.

Outros polímeros incluem poli(alquilcianoacrilatos), poliamidas, policarbonatos, polialquilenos como, por exemplo, polietileno, polipropileno, poli(etileno glicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), compostos de polivinila como, por exemplo, álcoois polivinílicos, éteres de polivinila e ésteres de polivinila, polímeros de ácidos acrílico e metacrílico, celuloses e outros polissacarídeos, e peptídeos ou proteínas, ou copolímeros ou misturas destes. Polímeros podem ser selecionados ou modificados para terem as taxas apropriadas de estabilidade e degradação *in vivo* para diferentes aplicações de liberação controlada de fármaco.

Em algumas modalidades, as partículas são formadas por copolímeros de enxerto de poliéster funcionalizado, como descrito em Hrkach e *cols.* (1995, *Macromolecules*, 28: 4.736-4.739; e "Poly(L-Lactic acid-co-amino acid) Graft Copolimers: A Class of Functional Biodegradable Biomaterials" em "Hydrogels and Biodegradable Polymers for Bioapplications", *ACS Symposium Series* N° 627, Raphael M. Ottenbrite e *cols.*, Eds., American Chemical Society, Capítulo 8, pp. 93-101, 1996).

Materiais diferentes de polímeros biodegradáveis podem ser usados para formar as partículas. Materiais adequados incluem vários polímeros não biodegradáveis e vários excipientes. As partículas também podem ser formadas somente pelo estimulador imune (ou estimuladores imunes) e tensoativo.

Partículas poliméricas podem ser preparadas com o uso

de evaporação de solvente de emulsão simples e dupla, atomização, extração de solvente, evaporação de solvente, separação de fase, coacervação simples e complexa, polimerização interfacial, e outros métodos bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Partículas podem ser feitas com o uso de métodos para a produção de microesferas ou microcápsulas conhecidas na técnica, desde que as condições sejam otimizadas para a formação de partículas com o diâmetro desejado.

Métodos desenvolvidos para a produção de microesferas para liberação de agentes encapsulados são descritos na literatura, por exemplo, como descrito em Doubrow, M., Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy", CRC Press, Boca Raton, 1992. Métodos também são descritos em Mathiowitz e Langer (1987, *J. Controlled Release* 5, 13-22); Mathiowitz *e cols.* (1987, *Reactive Polymers* 6, 275-283); e Mathiowitz *e cols.* (1988, *J. Appl. Polymer Sci.* 35, 755-774), bem como na Patente U.S. N° 5.213.812, Patente U.S. N° 5.417.986, Patente U.S. N° 5.360.610 e Patente U.S. N° 5.384.133. A seleção do método depende da seleção, do tamanho, da morfologia externa e da cristalinidade do polímero desejada, como descrito, por exemplo, por Mathiowitz *e cols.* (1990, *Scanning Microscopy* 4: 329-340; 1992, *J. Appl. Polymer Sci.* 45, 125-134); e Benita e *cols.* (1984, *J. Pharm. Sci.* 73, 1.721-1.724).

Na evaporação de solvente, descrita, por exemplo, em Mathiowitz *e cols.*, (1990), Benita; e na Patente U.S. N° 4.272.398 para Jaffe, o polímero é dissolvido em um solvente orgânico volátil, por exemplo, cloreto de metileno. Várias concentrações de polímero diferentes podem

ser usadas, por exemplo, entre 0,05 e 2,0 g/ml. O estimulador imune (estimuladores imunes), seja em forma solúvel ou disperso como partículas finas, é adicionado à solução de polímero, e a mistura é suspensa em uma fase aquosa que contém um agente tensoativo como, por exemplo, poli(álcool vinílico). A fase aquosa pode ser, por exemplo, uma concentração de poli(álcool vinílico) 1% p/v em água destilada. A emulsão resultante é agitada até que a maior parte do solvente orgânico evapore, deixando microesferas sólidas, que podem ser lavadas com água e secas de um dia para o outro em um liofilizador. Microesferas com tamanhos (entre 1 e 1.000 µm) e morfologias diferentes podem ser obtidas por esse método.

A remoção do solvente foi projetada primariamente para ser usada com polímeros menos estáveis, por exemplo, os polianidridos. Nesse método, o agente é disperso ou dissolvido em uma solução de um polímero selecionado em um solvente orgânico volátil como cloreto de metileno. A mistura é então suspensa em óleo, por exemplo, óleo de silicone, por agitação, para formar uma emulsão. Dentro de 24 horas, o solvente se difunde na fase oleosa e as gotículas da emulsão endurecem em microesferas sólidas de polímero. Diferentemente do método de microencapsulação por derretimento a quente descrito, por exemplo, em Mathiowitz *e cols.* (1987, *Reactive Polymers*, 6: 275), esse método pode ser usado para a produção de microesferas a partir de polímeros com pontos de fusão elevados e uma ampla gama de pesos moleculares. Microesferas que possuem um diâmetro, por exemplo, entre um e 300 µm, podem ser obtidas com esse procedimento.

Com alguns sistemas poliméricos, partículas poliméricas preparadas com o uso de uma técnica de emulsão simples ou dupla variam em tamanho, dependendo do tamanho das gotículas. Se as gotículas em emulsões água-em-óleo não são de um tamanho adequadamente pequeno para formar partículas com a faixa de tamanho desejada, gotículas menores podem ser preparadas, por exemplo, por sonificação ou homogeneização da emulsão, ou pela adição de tensoativos.

Se as partículas preparadas por qualquer um dos métodos acima possuem uma faixa de tamanho fora da faixa desejada, as partículas podem ser dimensionadas, por exemplo, com o uso de uma peneira, e posteriormente separadas de acordo com a densidade com o uso de técnicas conhecidas por aqueles habilitados na técnica.

As partículas poliméricas podem ser preparadas por atomização. Métodos de atomização como, por exemplo, aquele revelado em PCT WO 96/09814 por Sutton e Johnson, revelam a preparação de micropartículas esféricas lisas de um material hidrossolúvel com pelo menos 90% das partículas possuindo um tamanho médio entre 1 e 10 µm.

3.3.2 Partículas cerâmicas

Partículas cerâmicas também podem ser usadas para liberar os estimuladores imunes da invenção. Essas partículas são tipicamente preparadas com o uso de processos similares ao processo bem conhecido de sol-gel e normalmente exigem condições simples e temperatura ambiente, como descrito, por exemplo, em Brinker e cols. ("Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing"; Academic Press: San Diego, 1990, p-60), e

Avnir *e cols.* (1994, *Chem. Mater.* 6, 1605). Partículas cerâmicas podem ser preparadas com tamanho, formato e porosidade desejados, e são extremamente estáveis. Essas partículas também protegem eficazmente moléculas inativadas (polipeptídeos, fármacos etc.) contra desnaturação induzida por pH e temperatura extremos (Jain *e cols.*, 1998, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 11.092-11.095). Além disso, suas superfícies podem ser facilmente funcionalizadas com diferentes grupos (Lal *e cols.*, 2000, *Chem. Mater.* 12, 2.632-2.639; Badley *e cols.*, 1990, *Langmuir*, 6, 792-801) e, portanto, podem ser anexadas a diversos anticorpos monoclonais e a outros ligantes a fim de direcioná-los aos locais desejados *in vivo*.

Várias partículas cerâmicas foram descritas para a liberação *in vivo* de cargas contendo agente ativo. Por exemplo, a Patente Britânica 1.590.574 revela a incorporação de componentes biologicamente ativos em uma matriz de sol-gel. A Publicação Internacional WO 97/45367 revela xerogéis de sílica dissolvíveis de forma controlável preparados por meio de um processo de sol-gel, no qual um agente biologicamente ativo é incorporado por impregnação em partículas pré-sinterizadas (1 a 500 μm) ou discos. A Publicação Internacional WO 0050349 revela fibras de sílica biodegradáveis de forma controlável preparadas por meio de um processo de sol-gel, no qual um agente biologicamente ativo é incorporado durante a síntese da fibra. A Publicação do Pedido de Patente U.S. 20040180096 descreve nanopartículas cerâmicas nas quais uma substância bioativa é capturada. As nanopartículas cerâmicas são feitas por formação de uma composição micelar do corante. O material

cerâmico é adicionado à composição micelar e as nanopartículas cerâmicas são precipitadas por hidrólise alcalina. A Publicação do Pedido de Patente U.S. 20050123611 revela partículas cerâmicas de liberação controlada que compreendem um material ativo disperso de forma substancialmente homogênea por todas as partículas. Essas partículas são preparadas por mistura de um tensoativo com um solvente apolar para preparar uma solução de micela reversa; (b) dissolução de um precursor de gel, um catalisador, um agente de condensação e um material ativo solúvel em um solvente polar para preparar uma solução precursora; (c) combinação da solução de micela reversa e da solução precursora para fornecer uma emulsão; e (d) condensação do precursor na emulsão. A Publicação do Pedido de Patente U.S. 20060210634 revela substâncias bioativas de adsorção em partículas cerâmicas que compreendem um óxido metálico (por exemplo, óxido de titânio, óxido de zircônio, óxido de escândio, óxido de cério e óxido de ítrio) por evaporação. Kortesuo *e cols.* (2000, *Int. J. Pharm.* Maio 10; 200(2): 223-229) revelam um método de atomização para produzir partículas esféricas de sílica gel com uma faixa de tamanho de partícula estreita para liberação controlada de fármacos como, por exemplo, citrato de toremifeno e HCl de dexmedetomidina . Wang *e cols.* (2006, *Int. J. Pharm.* 308(1-2): 160-167) descrevem a combinação de adsorção por micropartículas porosas de $CaCO_3$ e encapsulação por películas multicamadas de polieletrólito para liberação de substâncias bioativas.

3.3.3 Lipossomos

Lipossomos podem ser produzidos por métodos

padronizados, tais como aqueles relatados por y Kim *e cols.* (1983, *Biochim. Biophys. Acta* 728, 339-348); Liu *e cols.* (1992, *Biochim. Biophys. Acta* 1.104, 95-101); Lee *e cols.* (1992, *Biochim. Biophys. Acta.* 1.103, 185-197), Brey *e cols.* (Publicação do Pedido de Patente U.S. 20020041861), Hass *e cols.* (Publicação do Pedido de Patente U.S. 20050232984), Kisak *e cols.* (Publicação do Pedido de Patente U.S. 20050260260) e Smyth-Templeton *e cols.* (Publicação do Pedido de Patente U.S. 20060204566). Adicionalmente, pode ser feita referência a Copeland *e cols.* (2005, *Immunol. Cell. Biol.* 83: 95-105), que fizeram uma revisão sobre formulações particuladas à base de lipídeos para a liberação de antígeno, e a Bramwell *e cols.* (2005, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 22(2): 151-214; 2006, *J. Pharm. Pharmacol.* 58(6): 717-728), que revisaram sistemas de liberação particulados para vacinas, incluindo métodos para a preparação de lipossomos carregados com proteína. Muitas formulações lipossômicas que utilizam diversos componentes lipídicos diferentes foram usadas em vários experimentos de cultura de células *in vitro* e em animais. Foram identificados parâmetros que determinam as propriedades lipossômicas e eles são relatados na literatura, por exemplo, por Lee *e cols.* (1992, *Biochim. Biophys. Acta.* 1.103, 185-197); Liu *e cols.* (1992, *Biochim. Biophys. Acta*, 1.104, 95-101); e Wang *e cols.* (1989, *Biochem.* 28, 9.508-951).

Resumidamente, os lipídeos de escolha (e qualquer bioativo orgânico-solúvel), dissolvidos em um solvente orgânico, são misturados e secos no fundo de um tubo de vidro sob vácuo. A película de lipídeo é reidratada com o

uso de uma solução aquosa tamponada contendo quaisquer bioativos hidrossolúveis a serem encapsulados por turbilhonamento suave. As vesículas hidratadas de lipídeo podem então ser ainda processadas por extrusão, submetidas a uma série de ciclos de congelamento-descongelamento ou desidratadas e depois reidratadas para promover a encapsulação dos bioativos. Os lipossomos podem então ser lavados por centrifugação ou carregados em uma coluna de exclusão de tamanho para remover bioativos não capturados da formulação de lipossomo e armazenados a 4°C. O método básico para a preparação de lipossomos está descrito em mais detalhes em Thierry *e cols.* (1992, *Nuc. Acids Res.* 20: 5.691-5.698).

Uma partícula que carrega uma carga de estimulador imune (estimuladores imunes) pode ser feita usando o procedimento descrito em: Pautot *e cols.* (2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(19): 10.718-21). Usando a técnica de Pautot *e cols.*, lipídeos revestidos com estreptavidina (DPPC, DSPC e lipídeos similares) podem ser usados para a fabricação de lipossomos. A técnica de encapsulação de fármacos descrita por Needham *e cols.* (2001, "Advanced Drug Delivery Reviews", 53(3): 285-305) pode ser usada para carregar essas vesículas com um ou mais agentes ativos.

Os liposeomos podem ser preparados por exposição de solução clorofórmica de várias misturas de lipídeos ao alto vácuo e subseqüentemente hidratando-se as películas de lipídeo (DSPC/CHOL) resultantes com tampões de pH 4, e efetuando-se sua extrusão através de filtros de policarbonato, após um procedimento de congelamento e descongelamento. É possível usar DPPC suplementado com DSPC

ou colesterol para aumentar a eficiência da encapsulação ou para aumentar a estabilidade etc. Um gradiente de pH transmembrana é criado por ajuste do pH do meio extravesicular até 7,5 por adição de um agente de alcalinização. Um estimulador imune de Gag pode ser subseqüentemente capturado por adição de uma solução do estimulador imune em pequenas alíquotas à solução de vesículas, em uma temperatura elevada, para permitir o acúmulo do estimulador imune dentro dos lipossomos.

Outras partículas à base de lipídeos adequadas à liberação dos estimuladores imunes da presente invenção como, por exemplo, niossomos, são descritas por Copeland e *cols.* (2005, *Immunol. Cell. Biol.* 83: 95-105).

3.3.4 Partículas balísticas

Os estimuladores imunes da presente invenção podem ser anexados (por exemplo, por revestimento ou conjugação) ou de algum outro modo associados a partículas adequadas ao uso em liberação sem agulha ou "balística" (biolística). Partículas ilustrativas para liberação balística são descritas, por exemplo, em: Publicações Internacionais WO 02/101412; WO 02/100380; WO 02/43774; WO 02/19989; WO 01/93829; WO 01/83528; WO 00/63385; WO 00/26385; WO 00/19982; WO 99/01168; WO 98/10750; e WO 97/48485. Deve-se entender, no entanto, que essas partículas têm seu uso limitado a um dispositivo de liberação balística e podem ser administradas de algum outro modo por qualquer técnica alternativa (por exemplo, liberação por injeção ou por microagulha) por meio da qual as partículas sejam liberáveis às células imunes.

Os estimuladores imunes podem ser revestidos ou

quimicamente acoplados a partículas transportadoras (por exemplo, transportadores centrais) com o uso de diversas metodologias conhecidas na técnica. Partículas transportadoras são selecionadas de materiais que possuem uma densidade adequada na faixa de tamanhos de partícula tipicamente usados para liberação intracelular. O tamanho ótimo da partícula transportadora, evidentemente, dependerá do diâmetro das células-alvo. Partículas ilustrativas possuem um tamanho que varia de cerca de 0,01 a cerca de 250 µm, de cerca de 10 a cerca de 150 µm, e de cerca de 20 a cerca de 60 µm; e uma densidade de partícula que varia de cerca de 0,1 a cerca de 25 g/cm^3, e uma densidade de massa de cerca de 0,5 a cerca de 3,0 g/cm^3, ou maior. Partículas não limitantes desse tipo incluem partículas metálicas como, por exemplo, partículas transportadoras de tungstênio, ouro, platina e irídio. Partículas de tungstênio são facilmente disponíveis em tamanhos médios de 0,5 a 2,0 µm de diâmetro. Partículas de ouro ou ouro microcristalino (por exemplo, pó de ouro A1570, disponível por Engelhard Corp., East Newark, N.J.) também podem ser usadas. Partículas de ouro fornecem uniformidade no tamanho (disponível por Alpha Chemicals em tamanhos de partícula de 1-3 µm, ou disponível por Degussa, South Plainfield, N.J. em uma gama de tamanhos de partícula que inclui 0,95 µm) e baixa toxicidade. Ouro microcristalino fornece uma distribuição de tamanho de partícula diversa, tipicamente na faixa de 0,1-5 µm. A área de superfície irregular do ouro microcristalino permite um revestimento altamente eficiente com os agentes ativos da presente invenção.

São conhecidos e foram descritos muitos métodos para

adsorção, acoplamento ou alguma outra forma de anexação de moléculas bioativas (por exemplo, moléculas hidrofílicas como, por exemplo, proteínas e ácidos nucléicos) em partículas como, por exemplo, partículas de ouro ou tungstênio. Em exemplos ilustrativos, esses métodos combinam uma quantidade predeterminada de ouro ou tungstênio com as moléculas bioativas, $CaCl_2$ e espermidina. Em outros exemplos, etanol é usado para precipitar as moléculas bioativas em partículas de ouro ou tungstênio (veja, por exemplo, Jumar e *cols.*, 2004, *Phys. Med. Biol.* 49: 3.603-3.612). A solução resultante é adequadamente turbilhonada continuamente durante o procedimento de revestimento para assegurar a uniformidade da mistura de reação. Após adesão das moléculas bioativas, as partículas podem ser transferidas, por exemplo, para membranas adequadas, deixando-se que sequem antes do uso, revestidas sobre superfícies de um módulo ou cassete de amostra, ou carregadas em um cassete de liberação para uso em instrumentos específicos de liberação mediada por partículas.

As composições formuladas podem ser adequadamente preparadas como partículas usando técnicas padronizadas, por exemplo, por evaporação simples (secagem ao ar), secagem a vácuo, atomização, secagem por congelamento (liofilização), secagem por atomização-congelamento, revestimento por pulverização, precipitação, formação de partículas por fluido supercrítico, e semelhantes. Se desejado, as partículas resultantes podem ser aprimoradas com o uso das técnicas descritas na Publicação Internacional WO 97/48485.

3.3.5 Tensoativos

Tensoativos que podem ser incorporados em partículas incluem fosfoglicerídeos. Fosfoglicerídeos exemplares incluem fosfatidilcolinas, por exemplo, o tensoativo de ocorrência natural, L-α-fosfatidilcolina dipalmitoil ("DPPC"). Os tensoativos vantajosamente melhoram as propriedades da superfície, por exemplo, por redução de interações partícula-partícula, e podem tornar a superfície das partículas menos adesivas. O uso de tensoativos endógenos ao pulmão pode evitar a necessidade do uso de tensoativos não fisiológicos.

O fornecimento de tensoativo nas superfícies das partículas pode reduzir a tendência das partículas para se aglomerarem em função de interações como, por exemplo, interações eletrostáticas, forças de Van der Waals e ação capilar. A presença do tensoativo na superfície da partícula pode fornecer rugosidade aumentada da superfície (aspereza), aumentando, dessa forma, a aerossolização por redução da área de superfície disponível para interação íntima partícula-partícula.

Os tensoativos conhecidos na técnica podem ser usados, incluindo qualquer tensoativo de ocorrência natural. Outros tensoativos exemplares incluem difosfatidil glicerol (DPPG); hexadecanol; álcoois graxos como, por exemplo, polietileno glicol (PEG); polioxietileno-9-lauril éter; um ácido graxo tensoativo, por exemplo, ácido palmítico ou ácido oléico; trioleato de sorbitano (Span 85); glicocolato; surfactina; um poloxâmero; um éster de ácido graxo de sorbitano, por exemplo, trioleato de sorbitano; tiloxapol e um fosfolipídeo.

3.4 Modalidades de células apresentadoras de antígeno

Em algumas modalidades, o estimulador imune que é usado par aumentar o número de células apresentadoras de antígeno Gag-específicas no indivíduo é uma célula apresentadora de antígeno ou seu precursor, que é obtida do indivíduo a ser tratado (ou seja, uma célula apresentadora de antígeno autóloga ou precursor) ou de um doador que seja MHC-compatível ou não compatível com o indivíduo (ou seja, uma célula apresentadora de antígeno alogênica). Desejavelmente, o doador é histocompatível com o indivíduo. Nessas modalidades, uma célula apresentadora de antígeno Gag-específica ou precursor é produzida por contato da célula apresentadora de antígeno ou precursor com (i) um polipeptídeo Gag ou um peptídeo Gag, como descrito, por exemplo, na Seção 3.1, que está adequadamente em forma solúvel ou em forma particulada, como descrito, por exemplo, na Seção 3.3, ou com (ii) uma construção de ácido nucléico que expressa Gag, como descrito, por exemplo, na Seção 3.2, que está adequadamente em forma solúvel ou em forma particulada, como descrito, por exemplo, na Seção 3.3, em uma quantidade e por um período suficiente para que um peptídeo Gag seja apresentado pela célula apresentadora de antígeno ou precursor em sua superfície.

3.4.1 Fontes de células apresentadoras de antígeno e seus precursores

As células apresentadoras de antígeno ou seus precursores podem ser isoladas por métodos conhecidos por aqueles habilitados na técnica. A fonte dessas células irá deferir, dependendo da célula apresentadora de antígeno necessária para a modulação de uma resposta imune

especificada. Nesse contexto, a célula apresentadora de antígeno pode ser selecionada de células dendríticas, macrófagos, monócitos e outras células da linhagem mielóide.

Tipicamente, precursores de células apresentadoras de antígeno podem ser isolados de qualquer tecido, mas são mais facilmente isolados do sangue, sangue umbilical ou medula óssea (Sorg *e cols.*, 2001, *Exp. Hematol.* 29, 1.289-1.294; Zheng *e cols.*, 2000, *J. Hematother. Stem Cell Res.* 9, 453-464). Também é possível obter precursores adequados de tecidos doentes como, por exemplo, tecido ou fluido sinovial reumatóide após biópsia ou punção articular (Thomas *e cols.*, 1994a, *J. Immunol.* 153, 4.016-4.028; Thomas *e cols.*, 1994b, *Arthritis Rheum.* 37(4)). Outros exemplos incluem, sem limitação, fígado, baço, coração, rim, intestino e amídala (Lu *e cols.*, 1994, *J. Exp. Med.* 179, 1.823-1.834; McIlroy *e cols.*, 2001, *Blood* 97, 3.470-3.477; Vremec *e cols.*, 2000, *J. Immunol.* 159, 565-573; Hart e Fabre, 1981, *J. Exp. Med.* 154(2), 347-361; Hart e McKenzie, 1988, *J. Exp. Med.* 168(1), 157-170; Pavli *e cols.*, 1990, *Immunology* 70(1), 40-47).

Leucócitos isolados diretamente de tecido constituem uma fonte importante de precursores da célula apresentadora de antígeno. Tipicamente, essee precursores só podem se diferenciar em células apresentadoras de antígeno por cultivo na presença ou ausência de vários fatores de crescimento. De acordo com a prática da presente invenção, as células apresentadoras de antígeno também podem assim se diferenciar de misturas brutas ou de preparações parcial ou substancialmente purificadas de precursores. Leucócitos

podem ser convenientemente purificados do sangue ou da medula óssea por centrifugação por gradiente de densidade usando, por exemplo, Ficoll Hypaque, o que elimina neutrófilos e células vermelhas (células mononucleares do sangue periférico ou PBMCs), ou por lise em cloreto de amônio de células vermelhas (leucócitos ou células sangüíneas brancas). Muitos precursores de células apresentadoras de antígeno estão presentes no sangue periférico como monócitos não-proliferantes, que podem ser diferenciados em células apresentadoras de antígeno específicas, incluindo macrófagos e células dendríticas, por cultivo na presença de citocinas específicas.

Precursores derivados de tecidos como, por exemplo, precursores de células dendríticas teciduais ou de células de Langerhans, são tipicamente obtidos por trituração de tecido (por exemplo, camada basal da epiderme) e sua digestão com colagenase ou dispase, seguida por separação por gradiente de densidade, ou seleção de precursores com base em sua expressão de marcadores da superfície celular. Por exemplo, precursores de célula de Langerhans expressam moléculas CD1, bem como HLA-DR, e podem ser purificados desse modo.

Em algumas modalidades, o precursor da célula apresentadora de antígeno é um precursor de macrófagos. Geralmente, esses precursores podem ser obtidos de monócitos de qualquer fonte e podem ser diferenciados em macrófagos por incubação prolongada na presença de meio e fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) (Erickson-Miller e *cols.*, 1990, *Int. J. Cell Cloning* 8, 346-356; Metcalf e Burgess, 1982, *J. Cell. Physiol.*, 111,

275-283).

Em outras modalidades, o precursor da célula apresentadora de antígeno é um precursor de células de Langerhans. Normalmente, células de Langerhans podem ser geradas a partir de monócitos humanos ou precursores de medula óssea $CD34^+$ na presença de fator estimulante de colônia de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), IL-4/TNFα e TGFβ (Geissmann *e cols.*, 1998, *J. Exp. Med.*, 187, 961-966; Strobl *e cols.*, 1997a, *Blood* 90, 1.425-1.434; Strobl *e cols.*, 1997b, dv *Exp. Med. Biol.* 417, 161-165; Strobl *e cols.*, 1996, *J. Immunol.* 157, 1.499-1.507).

Ainda em outras modalidades, o precursor da célula apresentadora de antígeno é um precursor de células dendríticas. Vários precursores de células dendríticas potenciais podem ser obtidos do sangue periférico, sangue umbilical ou medula óssea. Esses incluem monócitos, células-tronco $CD34^+$, granulócitos, precursores DC $CD33^+CD11c^+$ e progenitores mielóides comprometidos - descritos abaixo.

Monócitos:

Monócitos podem ser purificados por aderência ao plástico por 1-2 h na presença de meio de cultura de tecido (por exemplo, RPMI) e soro (por exemplo, soro humano ou fetal de bezerro), ou em meio sem soro (Anton *e cols.*, 1998, *Scand J. Immunol.* 47, 116-121; Araki *e cols.*, 2001, *Br. J. Haematol.* 114, 681-689; Mackensen *e cols.*, 2000, *Int. J. Cancer* 86, 385-392; Nestle *e cols.*, 1998, *Nat. Med.* 4, 328-332; Romani *e cols.*, 1996, *J. Immunol. Meth.* 196, 137-151; Thurner *e cols.*, 1999, *J. Immunol. Methods* 223, 1-15). Monócitos também podem ser purificados do sangue

periférico (Garderet *e cols.*, 2001, *J. Hematother. Stem Cell Res.* 10, 553-567). Monócitos também podem ser purificados por técnicas de imunoafinidade, incluindo seleção imunomagnética, separação por citometria de fluxo ou *panning* (Araki *e cols.*, 2001, *supra*; Battye e Shortman, 1991, *Curr. Opin. Immunol.* 3, 238-241), com anticorpos anti-CD14 para obter células CD14hi. Os números (e, portanto, o rendimento) de monócitos circulantes podem ser aumentados pelo uso *in vivo* de várias citocinas, incluindo GM-CSF (Groopman *e cols.*, 1987, *N. Engl. J. Med.* 317, 593-598; Hill *e cols.*, 1995, *J. Leukoc. Biol.* 58, 634-642). Monócitos podem ser diferenciados em células dendríticas por incubação prolongada na presença de GM-CSF e IL-4 (Romani *e cols.*, 1994, *J. Exp. Med.* 180, 83-93; Romani *e cols.*, 1996, *supra*). Uma combinação de GM-CSF e IL-4 em uma concentração de cada um entre cerca de 200 a cerca de 2.000 U/ml, mais preferivelmente entre cerca de 500 a cerca de 1.000 U/ml e, ainda mais preferivelmente, entre cerca de 800 U/ml (GM-CSF) e 1.000 U/ml (IL-4), produz quantidades significativas de células dendríticas imaturas, ou seja, células dendríticas fagocíticas de captura de antígeno. Outras citocinas que promovem a diferenciação de monócitos em células dendríticas fagocíticas de captura de antígeno incluem, por exemplo, IL-13.

Células-tronco CD34$^+$:

Células dendríticas também podem ser geradas a partir de precursores CD34$^+$ derivados da medula óssea na presença de GM-CSF, fator TNFα ± célula-tronco (SCF, c-kitL), ou GM-CSF, IL-4 ± flt3L (Bai *e cols.*, 2002, *Int. J. Oncol.* 20, 247-53; Chen *e cols.*, 2001, *Clin. Immunol.* 98, 280-292;

Loudovaris *e cols.*, 2001, *J. Hematother. Stem Cell Res.* 10, 569-578). Células CD34$^+$ podem ser derivadas de um aspirado da medula óssea ou do sangue, e podem ser enriquecidas como para monócitos usando, por exemplo, seleção imunomagnética ou imunocolunas (Davis *e cols.*, 1994, *J. Immunol. Meth.* 175, 247-257). A proporção de células CD34$^+$ no sangue pode ser aumentada pelo uso *in vivo* de várias citocinas, incluindo (mais comumente) G-CSF, mas também flt3L e progenipoietina (Fleming *e cols.*, 2001, *Exp. Hematol.* 29, 943-951; Pulendran *e cols.*, 2000, *J. Immunol.* 165, 566-572; Robinson *e cols.*, 2000, *J. Hematother. Stem Cell Res.* 9, 711-720).

Outros progenitores mielóides:

Células dendríticas podem ser geradas a partir de progenitores mielóides precoces comprometidos de uma forma similar às células-tronco CD34$^+$, na presença de GM-CSF e IL-4/TNF. Esses precursores mielóides infiltram muitos tecidos na inflamação, incluindo o fluido sinovial da artrite reumatóide (Santiago-Schwarz *e cols.*, 2001, *J. Immunol.* 167, 1.758-1.768). A expansão das células mielóides totais do corpo, incluindo precursores circulantes de células dendríticas e monócitos, pode ser obtida com certas citocinas, incluindo ligante de flt-3, fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF) ou progenipoietina (pró-GP) (Fleming *e cols.*, 2001, *supra*; Pulendran *e cols.*, 2000, *supra*; Robinson *e cols.*, 2000, *supra*). A administração dessas citocinas por vários dias a seres humanos ou a outros mamíferos permitiria que números bem maiores de precursores fossem derivados do sangue periférico ou da medula óssea para manipulação *in vitro*.

Células dendríticas também podem ser geradas a partir de precursores de neutrófilos do sangue periférico na presença de GM-CSF, IL-4 e TNFα (Kelly e *cols.*, 2001, *Cell. Mol. Biol.* (*Noisy-le-grand*) 47, 43-54; Oehler e *cols.*, 1998, *J. Exp. Med.* 187, 1.019-1.028). Deve-se observar que células dendríticas também podem ser geradas, com o uso de métodos similares, de células de leucemia mielóide aguda (Oehler e *cols.*, 2000, *Ann. Hematol.* 79, 355-62).

Precursores de DC tecidual e outras fontes de precursores de APC:

Outros métodos para a geração de DC existem a partir de, por exemplo, precursores tímicos na presença de IL-3 +/- GM-CSF, e precursores hepáticos de DC na presença de GM-CSF e uma matriz de colágeno. Linhagens de células dendríticas transformadas ou imortalizadas podem ser produzidas com o uso de oncogenes como, por exemplo, v-myc, por exemplo, como descrito por (Paglia e *cols.*, 1993) ou por myb (Banyer e Hapel, 1999; Gonda e *cols.*, 1993).

Precursores circulantes de DC:

Esses foram descritos no sangue periférico de seres humanos e camundongo. Pode-se também se beneficiar de marcadores da superfície celular específicos para a identificação de precursores de células dendríticas adequados. Especificamente, várias populações de precursores de células dendríticas podem ser identificadas no sangue pela expressão de CD11c e pela ausência ou expressão baixa de CD14, CD19, CD56 e CD3 (O'Doherty e *cols.*, 1994, *Immunology* 82, 487-493; O'Doherty e *cols.*, 1993, *J. Exp. Med.* 178, 1.067-1.078). Essas células também podem ser identificadas por marcadores da superfície

celular CD13 e CD33 (Thomas e *cols.*, 1993b, *J. Immunol.* 151(12), 6.840-6.852). Um segundo subconjunto, desprovido de CD14, CD19, CD56 e CD3, conhecido como precursores plasmocitóides de células dendríticas, não expressa CD11c, mas expressa CD123 (cadeia de IL-3R) e HLA-DR (Farkas e *cols.*, 2001, *Am. J. Pathol.* 159, 237-243; Grouard e *cols.*, 1997, *J. Exp. Med.* 185, 1.101-1.111; Rissoan e *cols.*, 1999, *Science* 283, 1.183-1.186). A maioria dos precursores circulantes $CD11c^+$ de células dendríticas é $HLA\text{-}DR^+$; no entanto, alguns precursores podem ser $HLA\text{-}DR^-$. A ausência de expressão de MHC da classe II foi claramente demonstrada para precursores de células dendríticas do sangue periférico (del Hoyo e *cols.*, 2002, *Nature* 415, 1.043-1.047).

Opcionalmente, precursores de células dendríticas $CD33^+CD14^{-/lo}$ ou $CD11c^+HLA\text{-}DR^+$, marcador de linhagem-negativos, descritos acima podem ser diferenciados em células apresentadoras de antígeno mais maduras por incubação por 18-36 h em meio de cultura ou em meio condicionado de monócitos (Thomas *e cols.*, 1993b, *supra*; Thomas e Lipsky, 1994, *J. Immunol.* 153, 4016-4028) (O'Doherty e *cols.*, 1993, *supra*). Alternativamente, após incubação de células não T do sangue periférico ou de PBMCs não purificadas, as células dendríticas maduras do sangue periférico são caracterizadas por baixa densidade e, portanto, podem ser purificadas em gradientes de densidade, incluindo metrizamida e Nycodenz (Freudenthal e Steinman, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7.698-7.702; Vremec e Shortman, 1997, *J. Immunol.* 159, 565-573), ou por anticorpos monoclonais específicos como, por exemplo, sem

limitação, o mAb CMRF-44 (Fearnley *e cols.*, 1999, *Blood* 93, 728-736; Vuckovic *e cols.*, 1998, *Exp. Hematol.* 26, 1.255-1.264). Células dendríticas plasmocitóides podem ser purificadas diretamente do sangue periférico com base em marcadores da superfície celular, e depois incubadas na presença de IL-3 (Grouard *e cols.*, 1997, *supra*; Rissoan *e cols.*, 1999, *supra*). Alternativamente, DCs plasmocitóides podem ser derivadas de gradientes de densidade ou seleção por CMRF-44 de células incubadas do sangue periférico, como descrito acima.

Em geral, para células dendríticas geradas a partir de qualquer precursor, quando incubadas na presença de fatores de ativação como, por exemplo, citocinas derivadas de monócitos, lipopolissacarídeo e repetições CpG contendo DNA, citocinas como, por exemplo, TNF-α, IL-6, IFN-α, IL-β, células necróticas, readerência, bactérias inteiras, componentes da membrana, RNA ou poliIC, células dendríticas imaturas, se tornarão ativadas (Clark, 2002, *J. Leukoc. Biol.*, 71, 388-400; Hacker *e cols.*, 2002, *Immunology* 105, 245-251; Kaisho e Akira, 2002, *Biochim. Biophys. Acta* 1.589, 1-13; Koski *e cols.*, 2001, *Crit. Rev. Immunol.* 21, 179-189). Esse processo de ativação de células dendríticas está inibido na presença de inibidores de NF-KB (O'Sullivan e Thomas, 2002, *J. Immunol.* 168, 5.491-5.498).

Em algumas modalidades, populações não cultivadas de células apresentadoras de antígeno ou de seus precursores podem ser introduzidas no indivíduo, que não foram submetidas às condições de ativação. Exemplos ilustrativos da população não cultivada de células apresentadoras de antígeno ou de seus precursores incluem sangue total,

sangue fresco ou frações deste como, por exemplo, sem limitação, células mononucleares do sangue periférico (PMBC), frações de células brancas do sangue total, concentrado de hemácias, sangue irradiado, células dendríticas, monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos, células *natural killer* e células T *natural killer*. Em modalidades específicas, a população não cultivada de células apresentadoras de antígeno é selecionada de sangue ou PMBCs recém-isolados. Em outras modalidades, a população não cultivada de células apresentadoras de antígeno é uma população necrótica ou apoptótica. Dessa forma, a população não cultivada de células pode ser colocada em contato com antígeno e subseqüentemente submetida às condições necróticas, que levam a um trauma irreversível das células (por exemplo, choque osmótico ou exposição a um veneno químico como, por exemplo, glutaraldeído), em que as células são caracterizadas por edema acentuado das mitocôndrias e citoplasma, seguido por destruição da célula e autólise. Alternativamente, a população não cultivada de células pode ser colocada em contato com uma molécula bicativa da invenção e subseqüentemente submetida às condições apoptóticas. Células que expressam ou apresentam antígeno podem ser induzidas a passar por apoptose *in vitro* ou *in vivo* usando vários métodos conhecidos na técnica, incluindo, sem limitação, infecção viral, irradiação com luz ultravioleta, radiação gama, esteróides, fixação (por exemplo, com glutaraldeído), citocinas ou por privação das células do doador de nutrientes no meio de cultura de células. Estudos de evolução com o tempo podem estabelecer

períodos de incubação suficientes para indução ótima de apoptose em uma população de células. Por exemplo, monócitos infectados com vírus influenza começam a expressar marcadores precoces para apoptose por volta de 6 horas após infecção. Exemplos de marcadores específicos para apoptose incluem Anexina V, células TUNEL', *laddering* de DNA e captação de iodeto de propídio.

3.4.2 Liberação *ex vivo* de polipeptídeo ou ácido nucléico

Estimuladores imunes de Gag da invenção podem ser liberados em células apresentadoras de antígeno em várias formas, incluindo ácidos nucléicos e polipeptídeos, que podem ser solúveis ou particulados. A quantidade de estimulador imune de Gag a ser colocada em contato com células apresentadoras de antígeno pode ser determinada empiricamente por aqueles habilitados na técnica. As células apresentadoras de antígeno devem ser expostas ao estimulador imune de Gag por um período de tempo suficiente para que essas células apresentem peptídeos Gag em sua superfície para a modulação de células T. Em algumas modalidades vantajosas, as células apresentadoras de antígeno são incubadas na presença de polipeptídeo Gag ou peptídeo Gag por menos do que cerca de 48, 36, 24, 12, 8, 7, 6, 5, 4, 3 ou 2 horas ou até mesmo por menos de cerca de 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 ou 2 minutos. O tempo e a dose de polipeptídeo ou peptídeos necessários para que as células opcionalmente processem e apresentem peptídeos Gag podem ser determinados usando protocolos *pulse-chase* nos quais a exposição ao antígeno Gag é seguida por um período de lavagem e exposição a um

sistema de leitura, por exemplo, células T reativas ao antígeno. Após a determinação do tempo e da dose ótimos necessários para que as células expressem os peptídeos Gag em sua superfície, pode ser usado um protocolo para preparar as células e antígeno Gag para indução de respostas imunogênicas. Aqueles habilitados na técnica reconhecerão, a esse respeito, que a duração de tempo necessária para que uma célula apresentadora de antígeno apresente um antígeno em sua superfície pode variar, dependendo do antígeno ou da forma de antígeno empregada, sua dose, e da célula apresentadora de antígeno empregada, bem como das condições sob as quais a carga de antígeno é efetuada. Esses parâmetros podem ser determinados por aqueles habilitados na técnica com o uso de procedimentos de rotina. A eficiência da sensibilização das células apresentadoras de antígeno pode ser determinada testando-se a atividade citotóxica da célula T *in vitro* ou com o uso de células apresentadoras de antígeno como alvos de CTLs. Outros métodos conhecidos pelos profissionais na técnica que podem detectar a presença de peptídeo Gag na superfície de células apresentadoras de antígeno após exposição a um antígeno Gag também são contemplados pela invenção apresentada.

Normalmente, cerca de 0,1 a 20 µg/ml de antígeno Gag (por exemplo, antígeno peptídico Gag) a cerca de 1-10 milhões de células apresentadoras de antígeno são adequados à produção de células apresentadoras de antígeno sensibilizadas antígeno-específicas. Tipicamente, as células apresentadoras de antígeno são incubadas com antígeno por cerca de 1 a 6 h a 37°C, embora também seja

possível expor as células apresentadoras de antígeno ao antígeno Gag pela duração da incubação com um ou mais fatores de crescimento. Como determinado previamente pelos presentes inventores, a apresentação bem sucedida de antígeno peptídico pode ser obtida com o uso de períodos de incubação bem mais curtos (por exemplo, cerca de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 minutos) com o uso de antígeno em uma concentração de cerca de 10-20 µg/ml.

Se desejado, todas ou uma porção das células apresentadoras de antígeno podem ser congeladas em uma solução criopreservante apropriada, até elas serem necessárias. Por exemplo, as células podem ser diluídas em um meio apropriado, por exemplo, um que contenha 10% de soro autólogo + 10% de dimetilsulfóxido em uma solução salina tamponada com fosfato. Em certas modalidades, as células são conservadas em uma forma desidratada.

Em algumas modalidades, a liberação de antígeno Gag exógeno a uma célula apresentadora de antígeno pode ser aumentada por métodos conhecidos pelos profissionais na técnica. Por exemplo, foram desenvolvidas várias estratégias diferentes para liberação de antígeno exógeno à via de processamento endógena de células apresentadoras de antígeno, especialmente células dendríticas. Esses métodos incluem a inserção de antígeno em lipossomos sensíveis ao pH (Zhou e Huang, 1994, *Immunomethods* 4, 229-235), lise osmótica de pinossomos após captação pinocítica de antígeno solúvel (Moore *e cols.*, 1988, *Cell* 54, 777-785), acoplamento de antígenos a adjuvantes potentes (Aichele *e cols.*, 1990, *J. Exp. Med.*, 171, 1.815-1.820; Gao *e cols.*, 1991, *J. Immunol.*, 147, 3.268-3.273; Schulz *e cols.*, 1991,

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88, 991-993; Kuzu e *cols.*, 1993, *Euro. J. Immunol.* 23, 1.397-1.400; e Jondal e *cols.*, 1996, *Immunity* 5, 295-302), exossomos (Zitvogel e *cols.*, 1998 *Nat. Med.* 4, 594-600; 2002, *Nat. Rev. Immunol.* 2, 569-79), e liberação de antígeno por células apoptóticas (Albert e *cols.*, 1998, *Nature* 392, 86-89; Albert e *cols.*, 1998, *Nature Med.* 4, 1.321-1.324; e nas Publicações Internacionais WO 99/42564 e WO 01/85207). Bactérias recombinantes (por exemplo, *E. coli*) ou células hospedeiras mamíferas transfectadas podem ser pulsadas em células dendríticas (como antígeno particulado ou corpos apoptóticos, respectivamente) para liberação de antígeno. Um sistema de liberação desse tipo pode ser combinado logicamente com uma substância para a inibição de NF-κB, por exemplo, um plasmídeo que codifica IκBα dominante negativo (Pai e *cols.*, 2002, *J. Virol.* 76, 1.914-1.921). Partículas vírus-*like* (VLPs) quiméricas recombinantes também foram usadas como veículos para liberação de antígeno heterólogo exógeno à via de processamento de MHC da classe I de uma linhagem de células dendríticas (Bachmann e *cols.*, 1996, *Eur. J. Immunol.*, 26(11), 2.595-2.600).

Alternativamente, ou em adição, um antígeno pode ser ligado, ou de algum outro modo associado, a uma citolisina para aumentar a transferência do antígeno no citosol de uma célula apresentadora de antígeno da invenção para liberação à via de MHC da classe I. Citolisinas exemplares incluem compostos de saponina como, por exemplo, Complexos de Estimulação Imune contendo saponina (ISCOMs) (veja, por exemplo, Cox e Coulter, 1997, *Vaccine* 15(3), 248-256 e

Patente U.S. N° 6.352.697), fosfolipases (veja, por exemplo, Camilli *e cols.*, 1991, *J. Exp. Med.* 173, 751, 754), toxinas formadoras de poros (por exemplo, uma alfa-toxina), citolisinas naturais de bactérias gram-positivas, por exemplo, listeriolisina O (LLO, por exemplo, Mengaud e *cols.*, 1988, *Infect. Immun.* 56, 766-772 e Portnoy e *cols.*, 1992, *Infect. Immun.* 60, 2.710-2.717), estreptolisina O (SLO, por exemplo, Palmer *e cols.*, 1998, *Biochemistry* 37(8), 2.378-2.383) e perfringolisina O (PFO, por exemplo, Rossjohn *e cols.*, *Cell* 89(5), 685-692). Quando a célula apresentadora de antígeno é fagossômica, citolisinas ativadas por ácido podem ser vantajosamente usadas. Por exemplo, listeriolisina exibe maior habilidade para formação de poros em pH levemente ácido (as condições de pH dentro do fagossomo), facilitando, dessa forma, a liberação do conteúdo do vacúolo (incluindo fagossomo e endossomo) ao citoplasma (veja, por exemplo, Portnoy *e cols.*, 1992, *Infect. Immun.* 60, 2.710-2.717).

A citolisina pode ser fornecida junto com um polipeptídeo ou peptídeo Gag na forma de uma composição única ou pode ser fornecida como uma composição separada, para contato das células apresentadoras de antígeno. Em uma modalidade, a citolisina é fundida ou de algum outro modo ligada ao polipeptídeo ou peptídeo Gag, em que a fusão ou ligação permite a liberação do polipeptídeo ou peptídeo Gag ao citosol da célula apresentadora de antígeno. Em outra modalidade, a citolisina e o polipeptídeo ou peptídeo Gag são fornecidos na forma de um veículo de liberação como, por exemplo, sem limitação, um lipossomo ou um veículo de liberação microbiano selecionado de vírus, bactéria ou

levedura. Adequadamente, quando o veículo de liberação é um veículo de liberação microbiano, o veículo de liberação é não virulento. Em uma modalidade preferida desse tipo, o veículo de liberação é uma bactéria não virulenta como, por exemplo, descrito por Portnoy *e cols.* na Patente U.S. N° 6.287.556, que compreende um primeiro polinucleotídeo que codifica uma citolisina funcional não secretada ligada operacionalmente a uma seqüência reguladora que expressa a citolisina na bactéria, e um segundo polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo ou peptídeo Gag. Citolisinas não secretadas podem ser fornecidas por vários mecanismos, por exemplo, ausência de uma seqüência sinalizadora funcional, um micróbio com secreção incompetente, por exemplo, micróbios que possuem lesões genéticas (por exemplo, uma mutação da seqüência sinalizadora funcional), ou micróbios envenenados etc. Uma ampla variedade de bactérias não patogênicas não virulentas pode ser usada; micróbios preferidos são cepas relativamente bem caracterizadas, particularmente cepas laboratoriais de *E. coli*, por exemplo, MC4100, MC1061, DH5α etc. Outras bactérias que podem ser criadas geneticamente para a invenção incluem cepas não patogênicas, não virulentas, bem caracterizadas, de *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, micobactérias, *Salmonella*, *Bacillus subtilis* etc. Em uma modalidade particular, as bactérias são atenuadas para serem não replicantes, não integrativas no genoma da célula hospedeira e/ou não móveis inter- ou intracelularmente.

Os veículos de liberação descritos acima, bem como os veículos particulados descritos, por exemplo, na Seção 3.3, podem ser usados para liberar um ou mais polipeptídeos e/ou

peptídeos Gag a praticamente qualquer célula apresentadora de antígeno capaz de endocitose do veículo em questão, incluindo células apresentadoras de antígeno fagocíticas e não fagocíticas. Em modalidades nas quais o veículo de liberação é um micróbio, os métodos em questão geralmente exigem a captação microbiana pela célula-alvo e subseqüente lise dentro do vacúolo da célula apresentadora de antígeno (incluindo fagossomos e endossomos).

4. Modalidades de linfócitos

As células apresentadoras de antígeno da invenção podem ser obtidas ou preparadas para conter e/ou expressar antígenos Gag por vários meios, de tal forma que o(s) antígeno(s) ou forma(s) processada(s) deste(s) seja apresentado por aquelas células para modulação potencial de outras células imunes, incluindo linfócitos T e linfócitos B e, particularmente, para a produção de linfócitos T e linfócitos B que são sensibilizados para responderem aos antígenos Gag. Linfócitos que são sensibilizados para responder ao antígeno Gag também são aqui denominados linfócitos sensibilizados por Gag.

Em algumas modalidades, as células apresentadoras de antígeno Gag-específicas são úteis para a produção de linfócitos T sensibilizados a um antígeno Gag. A eficiência da indução de linfócitos, especialmente linfócitos T, para exibirem uma resposta imune a um antígeno Gag pode ser determinada por qualquer método adequado, incluindo, sem limitação, teste da atividade citolítica de linfócitos T *in vitro* usando, por exemplo, células apresentadoras de antígeno antígeno-específicas como alvos de linfócitos T citolíticos antígeno-específicos (CTL); teste da

proliferação de linfócitos T antígeno-específicos (veja, por exemplo, Vollenweider e Groseurth, 1992, *J. Immunol. Meth.* 149: 133-135), medida da resposta de células B ao antígeno usando, por exemplo, ensaios ELISPOT e ensaios ELISA; interrogação dos perfis de citocina; ou medida de respostas de hipersensibilidade do tipo retardada (DTH) por teste de reatividade cutânea a um antígeno especificado (veja, por exemplo, Chang *e cols.* (1993), *Cancer Res.* 53: 1.043-1.050). Outros métodos conhecidos pelos profissionais na técnica, que podem detectar a presença de peptídeos Gag na superfície de células apresentadoras de antígeno após exposição ao antígeno Gag, também são contemplados pela presente invenção.

Conseqüentemente, a presente invenção também fornece linfócitos B ou T antígeno-específicos, especialmente linfócitos T, que respondem de uma forma antígeno-específica à reapresentação de um antígeno Gag. Em algumas modalidades, linfócitos T antígeno-específicos são produzidos por contato de uma célula apresentadora de antígeno Gag-específica, como definida acima, com uma população de linfócitos T, que pode ser obtida a partir de qualquer fonte adequada como, por exemplo, baço ou amídala/linfonodos, mas é obtida preferivelmente do sangue periférico. Os linfócitos T podem ser usados como preparações brutas ou como preparações parcialmente purificadas ou substancialmente purificadas, que são adequadamente obtidas com o uso de técnicas padronizadas como, por exemplo, descrito em "Immunochemical Techniques, Part G: Separation and Characterization of Lymphoid Cells" ("Meth. in Enzymol". 108, Editado por Di Sabato *e cols.*,

1984, Academic Press). Isso inclui *rosetting* com células sangüíneas vermelhas de carneiro, passagem através de colunas de lã de náilon ou aderência plástica para eliminar células aderentes, seleção imunomagnética ou por citometria de fluxo usando anticorpos monoclonais apropriados conhecidos na técnica.

A preparação de linfócitos T é colocada em contato com as células apresentadoras de antígeno Gag-específicas da invenção por um período de tempo adequado para sensibilização dos linfócitos T ao antígeno ou antígenos Gag apresentados por aquelas células apresentadoras de antígeno. Esse período será preferivelmente de pelo menos cerca de 1 dia, e até cerca de 5 dias.

Em algumas modalidades, uma população de células apresentadoras de antígeno Gag-específicas é cultivada na presença de uma população heterogênea de linfócitos T, que é obtida adequadamente do sangue periférico, junto com diversos peptídeos Gag da invenção. Essas células são cultivadas por um período de tempo e sob condições suficientes para que os peptídeos, ou suas formas processadas, sejam apresentados pelas células apresentadoras de antígeno; e para que as células apresentadoras de antígeno sensibilizem uma subpopulação dos linfócitos T para que respondam ao antígeno Gag.

5. Terapia ou profilaxia à base de células

As células apresentadoras de antígeno Gag-específicas descritas na Seção 3.4 e os linfócitos sensibilizados por Gag descritos na Seção 4 podem ser administrados a um paciente, isoladamente ou em combinação, para a modulação de uma resposta imune, especialmente para a modulação de

uma resposta imune a um polipeptídeo Gag. Essas composições à base de células são úteis, portanto, para o tratamento ou a prevenção de uma infecção por lentivírus ou condição associada. As células da invenção podem ser introduzidas em um paciente por qualquer meio (por exemplo, injeção) que produza a resposta imune desejada a um antígeno ou grupo de antígenos. As células podem ser derivadas do paciente (ou seja, células autólogas) ou de um indivíduo ou indivíduos que sejam ou não MHC-compatíveis (ou seja, alogênicas) com o paciente. Tipicamente, células autólogas são injetadas de volta no paciente do qual as células-fonte foram obtidas. O local da injeção pode ser subcutâneo, intraperitoneal, intramuscular, intradérmico, intravenoso ou intralinfóide. As células podem ser administradas a um paciente que já sofre de uma doença ou condição ou que esteja predisposto a uma doença ou condição em número suficiente para tratar ou evitar ou aliviar os sintomas da doença ou condição. O número de células injetadas no paciente que necessita do tratamento ou profilaxia pode variar, dependendo, entre outros, do antígeno ou antígenos e do tamanho do indivíduo. Esse número pode variar, por exemplo, entre cerca de 10^3 e 10^{11}, e normalmente entre cerca de 10^5 e 10^7 células (por exemplo, na forma de sangue, PMBC ou células dendríticas ou linfócitos T purificados). Podem ser feitas administrações únicas ou múltiplas (2, 3, 4 ou 5) das células com números de células e padrão sendo selecionados pelo médico responsável pelo tratamento. As células devem ser administradas em um veículo farmaceuticamente aceitável, que seja atóxico para as células e para o indivíduo. Esse veículo pode ser o meio de crescimento no qual as células

cresceram, ou qualquer meio de tamponamento adequado como, por exemplo, solução salina tamponada com fosfato. As células podem ser administradas isoladamente ou como uma terapia auxiliar em conjunto com outras substâncias terapêuticas conhecidas na técnica para o tratamento ou prevenção de respostas imunes indesejadas, por exemplo, sem limitação, glicocorticóides, metotrexato, D-penicilamina, hidroxicloroquina, sais de ouro, sulfasalazina, inibidores de TNF-alfa ou interleucina-1, e/ou outras formas de imunoterapia específica.

6. Terapia e profilaxia

Os polipeptídeos e peptídeos Gag descritos nas Seções 3.1, e as construções de ácido nucléico que expressam Gag descritas na Seção 3.2, bem como as partículas de Gag descritas na Seção 3.3 e as células apresentadoras de antígeno Gag-específicas descritas na Seção 3.4 e os linfócitos sensibilizados por Gag descritos na Seção 4 ("estimuladores imunes" ou "estimuladores imunes de Gag"), podem ser usados isoladamente ou juntos com ingredientes ativos para o tratamento ou profilaxia de infecções lentivirais, incluindo o tratamento de doenças ou condições associadas ao lentivírus como, por exemplo, sem limitação, doenças de imunodeficiência adquirida. Esses estimuladores imunes podem ser administrados a um paciente isoladamente, ou em composições nas quais são misturados com um veículo e/ou diluente adequado farmaceuticamente aceitável, ou um adjuvante.

Portanto, a invenção engloba métodos para o tratamento ou a prevenção de uma infecção por lentivírus, que consistem basicamente na administração a um paciente que

necessita desse tratamento de uma quantidade eficaz de pelo menos um estimulador imune de Gag, como descrito de forma ampla acima. Em algumas modalidades, os métodos consistem basicamente na administração a um indivíduo que possui uma infecção por lentivírus, ou em risco de ter uma infecção por lentivírus, de um estimulador imune de Gag em uma quantidade eficaz para aumentar o número de células apresentadoras de antígeno Gag-específicas ou de seus precursores para, dessa forma, tratar ou evitar a infecção por lentivírus.

Conseqüentemente, os métodos da presente invenção são adequados ao tratamento de indivíduos que possuem uma infecção lentiviral; que estejam em risco de contrair uma infecção lentiviral; e que foram tratados para uma infecção lentiviral, mas que apresentaram recidiva. Esses indivíduos incluem, sem limitação, indivíduos com sistemas imunológicos saudáveis, intactos, mas que estão em risco para se tornarem infectados pelo HIV (indivíduos "em risco"). Indivíduos em risco incluem, sem limitação, indivíduos que têm uma probabilidade maior do que a população geral de se tornarem infectados pelo HIV. Indivíduos em risco para se tornarem infectados pelo HIV incluem, sem limitação, indivíduos em risco para infecção pelo HIV em função da atividade sexual com indivíduos infectados pelo HIV; usuários de fármacos intravenosos; indivíduos que podem ter sido expostos a sangue infectado pelo HIV, produtos sangüíneos, ou a outros fluidos corporais contaminados pelo HIV; e bebês que estão sendo amamentados por mães infectadas pelo HIV. Indivíduos adequados ao tratamento incluem indivíduos infectados com,

ou em risco de se tornarem infectados com, HIV-1 e/ou HIV-2 e/ou HIV-3, ou qualquer variante destes. Indivíduos adequados ao tratamento com os métodos da invenção também incluem indivíduos que possuem uma infecção lentiviral refratária ao tratamento com outras terapias antivirais.

Em modalidades específicas, os métodos são usados para tratar ou evitar uma doença associada ao lentivírus (por exemplo, uma doença de imunodeficiência adquirida como, por exemplo, AIDS) e, dessa forma, a presente invenção também se estende aos métodos de tratamento ou prevenção de uma doença associada ao lentivírus em um indivíduo, em que os métodos geralmente envolvem a administração ao indivíduo de um estimulador imune de Gag, como descrito de forma ampla acima, em uma quantidade que é eficaz para tratar ou evitar a doença.

Um estimulador imune de Gag é administrado a um indivíduo com o uso de qualquer método disponível e via adequada à liberação de fármacos, incluindo métodos *in vivo* e *ex vivo*, bem como vias de administração sistêmicas e localizadas. Técnicas para formulação e administração podem ser encontradas em "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., última edição. Vias adequadas podem incluir, por exemplo, administração via enteral (por exemplo, oral ou retal), transmucosa ou intestinal; liberação parenteral, incluindo injeções intramusculares, subcutâneas, intramedulares, bem como injeção intratecal, intraventricular direta, intravenosa, intraperitoneal, intranasal ou intra-ocular. Para injeção, que constitui uma modalidade desejável da presente invenção, os estimuladores imunes da presente invenção

podem ser formulados em soluções aquosas, tipicamente em tampões fisiologicamente compatíveis como, por exemplo, solução de Hanks, solução de Ringer ou tampão de soro fisiológico. Para administração transmucosa, são usados penetrantes apropriados à barreira a ser permeada na formulação. Esses penetrantes são geralmente conhecidos na técnica. A injeção intramuscular e subcutânea é adequada, por exemplo, para administração de composições imunogênicas, vacinas e vacinas de DNA. Em certas modalidades da presente invenção, os estimuladores imunes são administrados por via intravenosa.

Os estimuladores imunes de Gag podem ser formulados facilmente com o uso de veículos farmaceuticamente aceitáveis bem conhecidos na técnica em dosagens adequadas à administração oral. Esses veículos permitem que os compostos da invenção sejam formulados em formas de dosagem como, por exemplo, comprimidos, pílulas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, caldos, suspensões e semelhantes, para ingestão oral por um paciente a ser tratado. Esses veículos podem ser selecionados de açúcares, amidos, celulose e seus derivados, malte, gelatina, talco, sulfato de cálcio, óleos vegetais, óleos sintéticos, polióis, ácido algínico, soluções tamponadas com fosfato, emulsificantes, solução salina isotônica e água sem pirogênio.

As formulações farmacêuticas para administração parenteral incluem soluções aquosas dos compostos ativos em forma hidrossolúvel. Adicionalmente, suspensões dos compostos ativos podem ser preparadas como suspensões oleosas de injeção apropriadas. Solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos graxos como, por

exemplo, óleo de gergelim, ou ésteres sintéticos de ácido graxo, por exemplo, oleato de etila ou triglicerídeos, ou lipossomos. Suspensões aquosas de injeção podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, por exemplo, carboximetil celulose sódica, sorbitol ou dextrana. Opcionalmente, a suspensão também pode conter estabilizantes adequados ou agentes que aumentem a solubilidade dos compostos para permitir a preparação de soluções altamente concentradas.

As preparações farmacêuticas para uso oral podem ser obtidas por combinação dos compostos ativos com um excipiente sólido, opcionalmente trituração de mistura resultante, e processamento da mistura de grânulos, após a adição de auxiliares adequados, se desejado, para se obter comprimidos ou núcleos de drágeas. Excipientes adequados são, em particular, enchimentos como, por exemplo, açúcares, incluindo lactose, sacarose, manitol ou sorbitol; preparações de celulose como, por exemplo, amido de milho, amido de trigo, amido de arroz, amido de batata, gelatina, goma tragacanto, metil celulose, hidroxipropilmetil-celulose, carboximetilcelulose sódica e/ou polivinilpirrolidona (PVP). Se desejado, podem ser adicionados agentes de desintegração como, por exemplo, a polivinil pirrolidona entrecruzada, ágar ou ácido algínico ou um sal deste como, por exemplo, alginato de sódio. Essas composições podem ser preparadas por qualquer um dos métodos de farmácia, mas todos os métodos incluem a etapa de associar um ou mais agentes terapêuticos, como descritos acima, com o veículo que constitui um ou mais ingredientes necessários. Em geral, as composições farmacêuticas da

presente invenção podem ser fabricadas de uma forma conhecida, por exemplo, por meio de processos convencionais de mistura, dissolução, granulação, produção de drágeas, levigação, emulsificação, encapsulação, captura ou liofilização.

Núcleos de drágeas são fornecidos com revestimentos adequados. Para essa finalidade, podem ser usadas soluções concentradas de açúcar, que podem opcionalmente conter goma arábica, talco, polivinil pirrolidona, gel de carbopol, polietileno glicol e/ou dióxido de titânio, soluções de laca, e solventes orgânicos ou misturas solventes adequadas. Corantes ou pigmentos podem ser adicionados aos comprimidos ou revestimentos de drágeas para identificação ou para caracterização de diferentes combinações de doses do composto ativo.

Substâncias farmacêuticas que podem ser usadas oralmente incluem cápsulas *push-fit* feitas de gelatina, bem como cápsulas macias, lacradas, feitas de gelatina e um plastificante como, por exemplo, glicerol ou sorbitol. As cápsulas *push-fit* podem conter os ingredientes ativos misturados com enchimento como, por exemplo, lactose, ligantes como, por exemplo, amidos, e/ou lubrificantes como, por exemplo, talco ou estearato de magnésio e, opcionalmente, estabilizantes. Em cápsulas macias, os compostos ativos podem estar dissolvidos ou suspensos em líquidos adequados como, por exemplo, óleos graxos, parafina líquida ou polietileno glicóis líquidos. Além disso, podem ser adicionados estabilizantes.

As formas de dosagem dos estimuladores imunes de Gag da invenção também podem incluir a injeção ou implantação

de dispositivos de liberação controlada projetados especificamente para essa finalidade ou outras formas de implantes modificados para atuarem adicionalmente dessa forma. A liberação controlada de um agente da invenção pode ser efetuada por seu revestimento, por exemplo, com polímeros hidrofóbicos incluindo resinas acrílicas, ceras, álcoois alifáticos superiores, ácido polilático e poliglicólico, e certos derivados de celulose como, por exemplo, hidroxipropilmetil celulose. Além disso, a liberação controlada pode ser efetuada pela utilização de outras matrizes de polímero, lipossomos e/ou microesferas.

Os estimuladores imunes de Gag da invenção (por exemplo, polipeptídeos e peptídeos Gag) podem ser fornecidos como sais com contra-íons farmaceuticamente compatíveis. Sais farmaceuticamente compatíveis podem ser formados com muitos ácidos, incluindo, sem limitação, ácido clorídrico, sulfúrico, acético, lático, tartárico, málico, succínico etc. Os sais tendem a ser mais solúveis em solventes aquosos ou em outros solventes protônicos que são as formas de base livre correspondentes.

Alternativamente, pode-se administrar um estimulador imune de Gag de uma forma local em vez de sistêmica, por exemplo, por meio de injeção do composto diretamente em um tecido, freqüentemente em uma formulação de depósito ou de liberação sustentada. Além disso, pode-se administrar o estimulador imune em um sistema de liberação direcionada de fármacos, por exemplo, em um lipossomo revestido com anticorpo tecido-específico, como descrito, por exemplo, na Seção 3.3. Os lipossomos serão direcionados e recolhidos seletivamente pelo tecido.

Composições farmacêuticas adequadas ao uso na presente invenção incluem composições nas quais os ingredientes ativos estão contidos em uma quantidade eficaz para se obter seu objetivo desejado. A dose de agente administrada a um paciente deve ser suficiente para efetuar uma resposta benéfica no paciente ao longo do tempo como, por exemplo, uma redução nos sintomas associados à condição. A quantidade do estimulador imune (ou dos estimuladores imunes) a ser administrada pode depender do indivíduo a ser tratado, inclusive da idade, do sexo, do peso e da condição da saúde geral deste. A esse respeito, quantidades precisas do estimulador imune (ou dos estimuladores imunes) para administração dependerão da avaliação do profissional responsável. Na determinação da quantidade eficaz do estimulador imune a ser administrada no tratamento ou profilaxia da condição, o médico pode avaliar os níveis teciduais de um antígeno-alvo, e a progressão da doença ou condição. Em qualquer caso, aqueles habilitados na técnica podem determinar facilmente dosagens adequadas dos estimuladores imunes da invenção.

Para qualquer composto usado no método da invenção, a dose eficaz pode ser estimada inicialmente a partir de ensaios de cultura de células ou modelos animais. A toxicidade e a eficácia terapêutica dos estimuladores imunes da invenção podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padronizados em culturas de células ou em animais experimentais, por exemplo, para determinação da LD_{50} (a dose letal para 50% da população) e da ED_{50} (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A proporção de dose entre os efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice

terapêutico, e ela pode ser expressa como a proporção LD_{50}/ED_{50}. Compostos que exibem índices terapêuticos grandes são preferidos. Os dados obtidos nesses ensaios de cultura de células e estudos animais podem ser usados na formulação de uma gama de dosagens para uso em seres humanos. A dosagem desses compostos se situa preferivelmente dentro de uma faixa de concentrações circulantes que incluem a ED_{50} com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro dessa faixa, dependendo da forma de dosagem empregada e da via de administração utilizada. A formulação, a via de administração e a dosagem exatas podem ser escolhidas pelo médico responsável à luz da condição do paciente (veja, por exemplo, Fingl *e cols.*, 1975, em "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Capítulo 1, página 1).

A quantidade e o intervalo da dosagem podem ser ajustados individualmente para fornecer níveis plasmáticos do(s) composto(s) ativo(s) que sejam suficientes para manter efeitos de redução de Gag ou efeitos que atenuam a infecção por lentivírus ou doença ou condição associada. Dosagens normais para o paciente para administração sistêmica variam de 1-2.000 mg/dia, comumente de 1-250 mg/dia, e tipicamente de 10-150 mg/dia. Definidas em termos de peso corporal do paciente, dosagens normais variam de 0,02-25 mg/kg/dia, comumente de 0,02-3 mg/kg/dia, tipicamente de 0,2-1,5 mg/kg/dia. Definidas em termos de áreas de superfície corporal do paciente, dosagens normais variam de 0,5-1.200 mg/m^2/dia, comumente de 0,5-150 mg/m^2/dia, tipicamente de 5-100 mg/m^2/dia.

Em algumas modalidades, é administrada uma dose única

de um estimulador imune de Gag. Em outras modalidades, são administradas múltiplas doses de um estimulador imune. Quando são administradas múltiplas doses ao longo de um período de tempo, um estimulador imune é administrado duas vezes ao dia (qid), diariamente (qd), em dias alternados (qod), a cada três dias, três vezes por semana (tiw) ou duas vezes por semana (biw) ao longo de um período de tempo. Em exemplos ilustrativos, um estimulador imune é administrado qid, qd, qod, tiw ou biw ao longo de um período de um dia a cerca de 2 anos ou mais. Adequadamente, um estimulador imune é administrado em qualquer uma das freqüências mencionadas anteriormente por uma semana, duas semanas, um mês, dois meses, seis meses, um ano ou dois anos, ou mais, dependendo de vários fatores.

Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz de um estimulador imune é aquela que reduz a carga de lentivírus em um indivíduo tratado em pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 95% ou mais, comparada com a carga de lentivírus do indivíduo não tratado com o estimulador imune.

Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz de um estimulador imune de Gag é aquela que aumenta a contagem de células T $CD4^+$ em um indivíduo em pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 100%,

pelo menos cerca de 2,5 vezes, pelo menos cerca de 3 vezes, pelo menos cerca de 3,5 vezes, pelo menos cerca de 4 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, ou pelo menos cerca de 10 vezes, ou mais, comparada com a contagem de células T $CD4^+$ do indivíduo não tratado com o estimulador imune.

Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz de um estimulador imune de Gag é aquela que restaura a contagem de células T $CD4^+$ para dentro da faixa da normalidade. No sangue humano, o número de células T $CD4^+$ que é considerado como dentro da faixa da normalidade a normal é de cerca de 600 a cerca de 1.500 células T $CD4^+/mm^3$ de sangue.

O tratamento ou a prevenção de uma infecção por lentivírus inclui, sem limitação, a redução da probabilidade de infecção por lentivírus, redução da disseminação do lentivírus a partir de uma célula infectada a uma célula suscetível, a redução da carga viral em um indivíduo infectado por lentivírus, a redução de uma quantidade de polipeptídeo(s) codificado pelo vírus em um indivíduo infectado por lentivírus e o aumento da contagem de células T $CD4^+$ em um indivíduo infectado por lentivírus.

Qualquer um entre diversos métodos pode ser usado para determinar se um método de tratamento/profilático é eficaz. Por exemplo, métodos para determinar se os métodos da invenção são eficazes na redução da carga de lentivírus, e/ou de tratamento de uma infecção por lentivírus, são qualquer teste para indícios de infecção por lentivírus, incluindo, sem limitação, a medida da carga viral, por exemplo, por medida de quantidade de lentivírus em uma amostra biológica, por exemplo, com o uso de uma reação em cadeia de polimerase (PCR) com iniciadores específicos para

uma seqüência de polinucleotídeos de lentivírus; detecção e/ou medida de um polipeptídeo codificado por lentivírus, por exemplo, p24, gp120, transcriptase reversa, usando, por exemplo, um ensaio imunológico como, por exemplo, um ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) com um anticorpo específico para o polipeptídeo; e medida da contagem das células T CD4.sup.+ no indivíduo. Métodos de teste de uma infecção por lentivírus (ou quaisquer indícios associados a uma infecção por lentivírus) são conhecidos na técnica, e foram descritos em diversas publicações como, por exemplo, "HIV Protocols" ("Methods in Molecular Medicine", 17) N.L. Michael e J.H. Kim, eds. (1999) Humana Press.

A partir do que foi apresentado anteriormente, será observado que os agentes da invenção podem ser usados como composições imunomoduladoras terapêuticas ou profiláticas ou vacinas. Conseqüentemente, a invenção se estende à produção de composições imunomoduladoras que contêm como compostos ativos um ou mais dos estimuladores imunes de Gag da invenção. Qualquer procedimento adequado é contemplado para a produção dessas vacinas. Procedimentos exemplares incluem, por exemplo, aqueles descritos em "New Generation Vaccines" (1997, Levine e cols., Marcel Dekker, Inc. Nova York, Basel Hong Kong).

Composições imunomoduladoras de acordo com a presente invenção podem conter um diluente ou excipiente fisiologicamente aceitável como, por exemplo, água, solução salina tamponada com fosfato e solução salina. Elas também podem incluir um adjuvante, como é bem conhecido na técnica. Adjuvantes adequados incluem, sem limitação: substâncias tensoativas como, por exemplo, hexadecilamina,

octadecilamina, ésteres de octadecil aminoácido, lisolecitina, brometo de dimetildioctadecilamônio, N,N-dicoctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil-propanodiamina), metoxihexadecilglicerol e polióis plurônicos; poliaminas como, por exemplo, pirano, sulfato de dextrana, poli IC carbopol; peptídeos como, por exemplo, muramil dipeptídeo e derivados, dimetilglicina, tuftsina; emulsões oleosas; e géis minerais como, por exemplo, fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio ou alume; linfocinas, QuilA e complexos de estimulação imune (ISCOMS).

As células apresentadoras de antígeno Gag-específicas da invenção ou seus precursores e linfócitos sensibilizados por Gag T gerados com as células apresentadoras de antígeno Gag-específicas, como descrito *supra*, podem ser usados como estimuladores imunes em composições imunomoduladoras para aplicações profiláticas ou terapêuticas. Em algumas modalidades, as células apresentadoras de antígeno antígeno-específicas da invenção são úteis para a geração de grandes números de CTL $CD8^+$ ou $CD4^+$, para transferência adotiva a indivíduos imunossuprimidos que são incapazes de montar respostas imunes normais. Por exemplo, CTLs $CD8^+$ sensibilizadas por Gag podem ser transferidas de forma adotiva para fins terapêuticos em indivíduos que sofrem de uma infecção lentiviral (Koup *e cols.*, 1991, *J. Exp. Med.*, 174: 1.593-1.600; Carmichael *e cols.*, 1993, *J. Exp. Med.*, 177: 249-256; e Johnson *e cols.*, 1992, *J. Exp. Med.*, 175: 961-971).

7. Terapias combinadas

Um estimulador imune de Gag pode ser administrado a um indivíduo em combinação (por exemplo, na mesma formulação

ou em formulações separadas) com pelo menos um segundo agente terapêutico ("terapia combinada"). O estimulador imune pode ser administrado misturado com um segundo agente terapêutico ou pode ser administrado em uma formulação separada. Quando administrado em formulações separadas, um estimulador imune de Gag e um segundo agente terapêutico podem ser administrados substancialmente de forma simultânea (por exemplo, dentro de até 60 minutos, cerca de 50 minutos, cerca de 40 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 20 minutos, cerca de 10 minutos, cerca de 5 minutos ou cerca de 1 minuto um do outro) ou separados no tempo por cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 4 horas, cerca de 6 horas, cerca de 10 horas, cerca de 12 horas, cerca de 24 horas, cerca de 36 horas ou cerca de 72 horas, ou mais. Quantidades eficazes de um agente terapêutico são como descritas acima.

Os agentes terapêuticos que podem ser administrados em terapia combinada, tais como fármacos antiinflamatórios, antivirais, antifúngicos, antimicobacterianos, antibióticos, amebicidas, tricomonocidas, analgésicos, antineoplásicos, anti-hipertensivos, antimicrobianos e/ou esteróides, para o tratamento de infecções virais. Em algumas modalidades, pacientes com uma infecção viral ou bacteriana são tratados com uma combinação de um ou mais estimuladores imunes de Gag com um ou mais dos seguintes: antibióticos de beta-lactam, tetraciclinas, cloranfenicol, neomicina, gramicidina, bacitracina, sulfonamidas, nitrofurazona, ácido nalidíxico, cortisona, hidrocortisona, betametasona, dexametasona, fluocortolona, prednisolona, triamcinolona, indometacina, sulindac, aciclovir,

amantadina, rimantadina, CD4 solúvel recombinante (rsCD4), anticorpos anti-receptor (por exemplo, para rinovírus), nevirapina, cidofovir (Vistide™), fosfonoformato trissódico (Foscamet™), famciclovir, penciclovir, valaciclovir, inibidores de ácido nucléico/replicação, interferon, zidovudina (AZT, Retrovir™), zidovudina/lamivudina (Combivir), didanosina (didesoxiinosina, ddI, Videx™), estavudina (d4T, Zerit™), zalcitabina (didesoxicitosina, ddC, Hivid™), nevirapina (Viramune™), lamivudina (Epivir™, 3TC), inibidores de protease, saquinavir (Invirase™, FortovaseTM), ritonavir (Norvir™), nelfinavir (Viracept™), efavirenz (Sustiva™), abacavir (ZiagenTM), amprenavir (AgeneraseTM) indinavir (Crixivan™), ganciclovir, AzDU, delavirdina (Rescriptor™), lopinavir/ritonavir (Kaletra), trizivir, rifampina, claritromicina, eritropoietina, fatores estimulantes de colônias (G-CSF e GM-CSF), inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa, inibidores nucleosídicos, adriamicina, fluoruracil, metotrexato, asparaginase e combinações destes. Agentes anti-HIV são aqueles na lista precedente que visam especificamente uma função de uma ou mais proteínas do HIV.

Em algumas modalidades, um estimulador imune de Gag é administrado em terapia combinada com dois ou mais agentes anti-HIV. Por exemplo, um agente em questão pode ser administrado em terapia combinada com um, dois ou três inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (por exemplo, Combivir, Epivir, Hivid, Retrovir, Videx, Zerit, Ziagen etc.). Um estimulador imune da invenção pode ser administrado em terapia combinada com um ou dois inibidores

não nucleosídicos da transcriptase reversa (por exemplo, Rescriptor, Sustiva, Viramune etc.). Um estimulador imune de Gag pode ser administrado em terapia combinada com um ou dois inibidores de protease (por exemplo, Agenerase, Crixivan, Fortovase, Invirase, Kaletra, Norvir, Viracept etc.). Um estimulador imune de Gag pode ser administrado em terapia combinada com um inibidor de protease e um inibidor nucleosídico da transcriptase reversa. Um estimulador imune de Gag pode ser administrado em terapia combinada com um inibidor de protease, um inibidor nucleosídico da transcriptase reversa e um inibidor não nucleosídico da transcriptase reversa. Um estimulador imune de Gag pode ser administrado em terapia combinada com um inibidor de protease e um inibidor não nucleosídico da transcriptase reversa. Outras combinações de certo inibidor com um ou mais de um inibidor de protease, um inibidor nucleosídico da transcriptase reversa e um inibidor não nucleosídico da transcriptase reversa são contempladas.

8. Métodos para avaliar a imunomodulação

A eficácia de uma imunização pode ser avaliada com o uso de qualquer técnica adequada. A capacidade de um indivíduo para responder ao Gag pode ser determinada avaliando-se se aquelas células sensibilizadas que respondem ao Gag estão aumentadas em número, atividade e habilidade para detectar e destruir aquele antígeno ou células que apresentam aquele antígeno. A potência da resposta imune é medida por testes padronizados, que incluem: medida direta de linfócitos do sangue periférico por meios conhecidos na técnica; ensaios de citotoxicidade de células *natural killer* (veja, por exemplo, Provincialli

M. *e cols.* (1992, *J. Immunol. Meth.* 155: 19-24), ensaios de proliferação celular (veja, por exemplo, Vollenweider, I. e Groseurth, P.J. (1992, *J. Immunol.* Meth. 149: 133-135), imunoensaios de células imunes e subconjuntos (veja, por exemplo, Loeffler, D.A., *e cols.* (1992, *Cytom.* 13: 169-174); Rivoltini, L., *e cols.* (1992, *Can. Immunol. Immunother.* 34: 241-251); ou testes cutâneos para imunidade mediada por células (veja, por exemplo, Chang, A.E. *e cols.* (1993, *Cancer Res.* 53: 1.043-1.050). Alternativamente, a eficácia da imunização pode ser monitorada com a utilização de uma ou mais técnicas, que incluem, sem limitação, coloração de tetrâmero de HLA da classe I - de PBMCs tanto frescas quanto estimuladas (veja, por exemplo, Allen e *cols.*, 2000, *J. Immunol.* 164(9): 4.968-4.978), ensaios de proliferação (Allen e *cols.*, *supra*), ensaios ELISPOT e coloração de citocina intracelular (Allen e *cols.*, *supra*), ensaios ELISA - para respostas lineares de células B; e *Western blots* de amostra de células que expressam os polinucleotídeos sintéticos. Particularmente relevante será o perfil de citocina de células T ativadas por antígeno e, mais particularmente, a produção e secreção de IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TGF-β e TNF-α.

A atividade citotóxica de linfócitos T e, em particular, a habilidade de linfócitos T citotóxicos para serem induzidos por células apresentadoras de antígeno, pode ser avaliada por qualquer técnica adequada conhecida por aqueles habilitados na técnica. Por exemplo, uma amostra que compreende linfócitos T a serem testados quanto à atividade citotóxica é obtida, e os linfócitos T são então expostos a células apresentadoras de antígeno

sensibilizadas por antígeno, que passaram a apresentar o antígeno. Após um período de tempo apropriado, que pode ser determinado por avaliação da atividade citotóxica de uma população de linfócitos T de controle que sabidamente são capazes de serem induzidos para se tornarem células citotóxicas, os linfócitos T a serem avaliados são testados quanto à atividade citotóxica em um ensaio citotóxico padronizado.

O método de avaliação da atividade de CTL é particularmente útil na avaliação de capacidade de um indivíduo para gerar uma resposta citotóxica contra células que expressam antígenos tumorais ou virais. Conseqüentemente, esse método é útil para avaliação da habilidade de um indivíduo para montar uma resposta imune a um câncer ou vírus. Por exemplo, podem ser empregados ensaios de lise de CTL com o uso de esplenócitos estimulados ou células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em células revestidas com peptídeo ou infectadas com vírus recombinante com o uso de células-alvo marcadas com ^{51}Cr. Esses ensaios podem ser realizados usando, por exemplo, células de primatas, camundongo ou humanas (Allen e *cols.*, *supra*). Além disso, a atividade de CTL também pode ser medida em primatas endogâmicos com o uso de um método de detecção *in vivo*, que envolve a marcação de células autólogas (por exemplo, PMBC) com um marcador opticamente detectável (por exemplo, um marcador ou corante fluorescente, quimioluminescente ou fosforescente ou visual) e o contato dessas células com um ou mais peptídeos Gag, como aqui revelados. Eles são escolhidos de forma que correspondam a um antígeno que é o alvo de uma resposta de

CTL sob teste em um indivíduo. As células autólogas são infundidas no indivíduo e os linfócitos do indivíduo são coletados após um período adequado para dar um tempo suficiente para que o sistema imunológico do indivíduo responda às células autólogas (por exemplo, 10 minutos a 24 horas pós-infusão). Os linfócitos coletados são então analisados para identificar o número ou a proporção de linfócitos que contêm ou de algum outro modo carregam o marcador opticamente detectável, o que representa uma medida da resposta de CTL *in vivo* ao antígeno no indivíduo.

A fim de que a invenção possa ser facilmente compreendida e colocada em um efeito prático, serão agora descritas modalidades preferidas específicas por meio dos seguintes exemplos não limitantes.

EXPERIMENTAL

CONTROLE DE VIREMIA APÓS IMUNOTERAPIA DE MACACOS INFECTADOS POR SIV COM SANGUE PULSADO COM PEPTÍDEO

A imunoterapia com OPAL foi estudada em macacos rabo-de-porco infectados por SIV que recebem ART. Os macacos rabo-de-porco possuem uma evolução pelo menos equivalentemente patogênica de infecção por SIV em relação à dos modelos alternativos em macaco rhesus [9,10]. Trinta e seis macacos foram infectados com SIV_{mac251} e 3 semanas mais tarde o tratamento com os antirretrovirais tenofovir e emtricitabina por 7 semanas foi iniciado. Os animais foram alocados aleatoriamente a 3 grupos estratificados por carga viral de SIV plasmática de pico (VL), estado de *Mane-A*10* (um gene de MHC da classe I que aumenta a VL em macacos rabo-de-porco infectados por SIV [11]), peso e sexo. Os macacos foram imunizados 4 vezes sob uma cobertura de

terapia antirretroviral (4ª, 6ª, 8ª, 10ª semanas) com PBMCs autólogas frescas misturadas por 1 hora *ex vivo* com 10 µg/ml/peptídeo de 125 peptídeos superpostos de 15mer de Gag de SIV apenas (OPAL-Gag), 823 peptídeos de SIV de 15mer que transpõem todas as 9 proteínas do SIV (OPAL-All) ou não imunizados. Os macacos foram acompanhados por 26 semanas após interrupção da ART na 10ª semana.

Todos os 36 macacos se tornaram infectados após exposição ao SIV_{mac251} e tiveram uma VL de pico média de 7,1 log_{10} cópias/ml. Antes da vacinação, 4 animais morreram durante infecção aguda por SIV com diarréia, desidratação, letargia, anorexia e perda de peso. As vacinações foram bem toleradas, sem diferenças nos pesos médios, parâmetros de hematologia ou observações clínicas em animais imunizados com OPAL comparados com controles.

Houve uma acentuada imunogenicidade de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ SIV-específica após a posologia de vacinação nos animais imunizados com OPAL. Respostas médias de células T CD4 e CD8 Gag-específicas 2 semanas após a imunização final foram de 3,0% e 1,9% de todas as células T CD4 e CD8, respectivamente, no grupo de OPAL-Gag. Respostas médias de células T CD4 e CD8 Gag-específicas 2 semanas após a imunização final foram de 0,84% e 0,37% no grupo de OPAL-All e de 0,15% e 0,29% em controles (Figura 1a, b). As células T Gag-específicas nos animais imunizados com OPAL-All, mas não nos animais de controle ou nos imunizados apenas com OPAL-Gag, também tiveram respostas de células T elevadas a todas as outras proteínas do SIV. As respostas médias de CD4/CD8 Env, Pol e proteína reguladora combinada-específicas foram de 2,5%/11,8%, 0,8%/0,3% e 1,5%/2,4%,

respectivamente, no grupo de OPAL-All, comparadas com ≤0,4% para todas as respostas de CD4/8 aos antígenos não-Gag em grupos de controle e OPAL-Gag (Figura 1c, d e Figura 3). Respostas de células T $CD8^+$ mais fortes às proteínas não-Gag estavam relacionadas às respostas de células T $CD8^+$ reduzidas ao Gag (Figura 1e). Dessa forma, embora um número maior de proteínas do SIV fosse reconhecido nos animais imunizados com OPAL-All, as respostas de Gag eram reduzidas em comparação à imunização somente com peptídeos Gag. Embora todos os animais tenham se soro-convertidos após infecção por SIV, não ocorreu nenhum aumento significativo de respostas de anticorpos com as vacinações com OPAL.

O período de 7 semanas de ART controlou VL até abaixo de 3,1 $\log_{10}$ cópias/ml em 26 dos 32 animais restantes por volta da 10ª semana. Os 6 animais que não controlaram a viremia com ART tiveram VLs de pico maiores na 2ª semana (média ± DP de 7,74 ± 0,33, comparado com 6,94 ± 0,52 para animais que controlaram a viremia com ART, $p < 0,001$) e VL maior após retirada da ART (5,98 ± 0,53 vs 4,28 ± 0,90, $p < 0,001$). O controle da VL provavelmente é importante na obtenção de resultados ótimos da imunoterapia de macacos infectados [7,12]. As análises finais primárias pré-definidas (por protocolo) da VL foram realizadas em animais que controlaram a viremia com ART (26 animais), embora os inventores também tenham analisado todos os 32 animais restantes por ajuste do controle da VL com ART.

A comparação final primária da VL entre os grupos de tratamento combinado com OPAL-All e OPAL-Gag nas 10 semanas depois da retirada da ART foi 0,5 $\log_{10}$ cópias/ml mais baixa do que os controles ($p = 0,084$, Figura 2, Tabela 7).

Cada grupo de vacinação (OPAL-All e OPAL-Gag) teve reduções muito similares na VL. A análise de todos os animais ajustada para controle da VL com ART e estado de *Mane-A*10* demonstrou uma redução significante na VL em animais imunizados com OPAL, comparados com controles (Tabela 7). Por volta de 6 meses após retirada da ART, a diferença média na VL entre grupos de controle e imunizados com OPAL foi de 0,93 $\log_{10}$ cópias/ml em 6 meses ($p = 0,02$, Tabela 7).

Para confirmar os achados virológicos usando um ensaio da VL sensível independente, plasma congelado (1 ml) de 32ª semana de estudo foi enviado ao "National Cancer Institute" (NCI) em Maryland, ESA. Drs M. Piatak e J. Lifson gentilmente analisaram as amostras quanto ao RNA do SIV de forma cega usando um ensaio com um limite de quantificação de 1,5 $\log_{10}$ cópias/ml. Os ensaios da "University of Melbourne" e do NCI estavam intimamente correlacionados ($r=0,97$, $p<0,001$) e mostraram uma redução média quase idêntica na viremia nos vacinados comparados com controles nesse momento (0,82 vs 0,88 $\log_{10}$ cópias/ml, respectivamente).

Para avaliar ainda mais a durabilidade do controle de SIV e da prevenção de doença com imunoterapia com OPAL, administramos um reforço em todos os 32 animais nos mesmos grupos randomizados 3 vezes com o procedimento idêntico (na 36ª, 39ª, 42ª semanas) sem cobertura de ART e acompanhamos os animais por mais 6 meses. A imunidade de células T SIV-específica estava aumentada nos animais imunizados similarmente em relação à vacinação primária (Figura 1). O controle viral foi mantido por todo o período de

acompanhamento de pouco mais de 1 ano sem ART (Figura 2, Tabela 7).

Doze dos 32 animais restantes desenvolveram AIDS incipiente e foram submetidos à eutanásia durante o acompanhamento prolongado, incluindo todos os 6 animais que não controlaram a viremia com ART. Dos 6 animais sacrificados que não controlaram a viremia com ART, 5 estavam no grupo de controle e um no grupo de OPAL-Gag (Figura 2). A imunoterapia com OPAL resultou em um benefício na sobrevida, analisando os 26 animais que controlaram a viremia com ART ($p = 0,053$) ou todos os 32 animais, ajustado para estado de *Mane-A*10* e controle da viremia com ART ($p = 0,02$, Tabela 7).

Os inventores também compararam as VL e os níveis periféricos de CD4 nos responsivos com CTL ao Env e Gag. Foram feitas análises primárias nos animais dentro dos grupos de vacina para avaliar o efeito do aumento de células T Env- ou Gag-específicas por imunização terapêutica. Os animais *Mane-A*10*-positivos foram excluídos, considerando que todos esses animais montam respostas de CTLs Gag-específicas benéficas ao epitopo KP9. Na verdade, os controles *Mane-A*10*-positivos nesse experimento tiveram uma VL média ao longo das 12ª-64ª semanas pós-infecção de $4,06 \pm 0,42$ $\log_{10}$ cópias/ml, comparado com $5,49 \pm 0,35$ $\log_{10}$ cópias/ml para controles *Mane-A*10*-negativos ($P = 0,024$, análise da área sob a curva com ponderação temporal).

Os responsivos com CTL apenas para Env mantiveram uma VL média significativamente maior entre as 12ª-64ª semanas pós-infecção do que os animais com respostas de células T

$CD8^+$ apenas para Gag, excluindo os animais *Mane-A*10*-positivos (5,05 ± 0,38 log_{10} cópias/ml vs 3,65 ± 0,24 log_{10} cópias/ml, respectivamente. P = 0,039, Figura 4). Houve uma diferença entre a VL média dos 6 responsivos apenas ao Env entre as 12ª-64ª semanas pós-infecção e os 7 animais de controle, *Mane-A*10* negativos, não vacinados (5,05 ± 0,38 log_{10} cópias/ml e 5,49 ± 0,35 log_{10} cópias/ml, respectivamente; Figura 4).

Para abordar a especulação de que uma resposta ampla, multiproteínas, poderia ser benéfica, aqueles animais com respostas de células T $CD8^+$ tanto ao Env quanto ao Gag foram então incluídos nessa análise. A VL para os 3 animais com respostas tanto Env quanto Gag-específicas tiveram uma média de 5,01 ± 0,56 log_{10} cópias/ml entre as 12ª-64ª semanas pós-infecção. Isso foi significativamente maior do que os responsivos apenas ao Gag (P = 0,049) e não foi melhor do que os responsivos apenas ao Env.

Os animais nesse experimento foram acompanhados por pouco mais de 1 ano após a última vacinação e remoção da ART. Isso permitiu uma análise da depleção de célula T $CD4^+$ periférica e a sobrevida em animais que respondem apenas ao Env ou Gag, naqueles que respondem tanto ao Env quanto ao Gag e nos controles não vacinados. Houve um amento não significativo dos níveis periféricos médios de CD4 nos 3 responsivos apenas ao Gag versus os 6 responsivos apenas ao Env entre as 12ª-64ª semanas pós-infecção (23,42% ± 4,22 e 27,44% ± 3,92, respectivamente, P = 0,547 Figura 4). Os 3 animais que tiveram respostas de células T $CD8^+$ tanto Env quanto Gag-específicas tiveram um nível periférico médio de CD4 não significante, mas menor ao longo do mesmo período

de tempo do que os controles não vacinados (18,59% ± 3,23 e 21,19% ± 3,01, respectivamente; Figura 4).

Durante o acompanhamento, um total de 6 animais vacinados e 6 controles dos 32 animais foi submetido à eutanásia com AIDS incipiente, incluindo perda de peso, depleção de células T $CD4^+$ e trombocitopenia. Os animais que respondem aos epitopos de célula T $CD8^+$ apenas ao Env progrediram para a AIDS mais freqüentemente do que os animais com respostas de CTL ao Gag isoladamente (Figura 4).

Em resumo, a imunoterapia com OPAL, com o uso de peptídeos Gag de SIV superpostos ou peptídeos que englobam todo o proteoma do SIV, foi altamente imunogênica e resultou em cargas virais significativamente menores e um benefício na sobrevida comparado com controles não vacinados. A eficácia virológica em macacos imunizados com OPAL foi durável por 12 meses após término da ART. Os presentes achados sobre a imunoterapia com OPAL foram observados apesar do modelo de SIV_{mac251}-rabo de porco virulento estudado [9] e fornecem forte prova de princípio para a promessa dessa técnica de imunoterapia.

A abordagem de imunoterapia com OPAL é mais simples do que outras imunoterapias celulares, particularmente o uso de células dendríticas. O uso de DNA, bloqueio de CTLA-4 e abordagens baseadas em vetor viral também são agora promissores em estudos em macacos [14,15], embora essas abordagens ainda não tenham sido traduzidas em estudos em humanos. Esse estudo adicionou peptídeos às PBMCs; no entanto, os presentes inventores mostraram uma técnica ainda mais simples, e a adição de peptídeos ao sangue total

também é altamente imunogênica, uma técnica que será mais amplamente aplicável [7].

Células T CD4$^+$ vírus-específicas são tipicamente muito fracas em humanos infectados pelo HIV ou macacos infectados pelo SIV; aumentos dramáticos dessas células foram induzidos pela imunoterapia com OPAL e isso pode ser a base de sua eficácia [16]. Embora os presentes inventores tenham medido primariamente células T produtoras de IFN-γ nesse estudo, ensaios polifuncionais de ICS recentes sugerem que a imunoterapia com OPAL também pode induzir células T capazes de também expressar as citocinas TNF-α e IL-2, a quimiocina MIP1β e o marcador de degranulação CD107a. Os macacos de controle e os vacinados foram tratados com ART precocemente (3 semanas após infecção), o que, isoladamente, está associado a um melhor resultado transitório em humanos. No entanto, uma perda maciça de células T CD4$^+$ no intestino até 2 semanas de infecção [17] e, embora possa ser desafiador identificar seres humanos tão precocemente após infecção, é aproximadamente nesse momento que indivíduos com HIV-1 se apresentam com infecção aguda. Uma redução de aproximadamente 1,0 $\log_{10}$ na VL resultaria em um retardo substancial na doença progressiva por HIV em seres humanos e permite um período de tempo razoável sem a necessidade de reintroduzir ART18 caso esses achados sejam confirmados em experimentos humanos. O controle durável da viremia exibido pelos animais vacinados é interessante e consistente com outros estudos recentes em macacos [14], sugerindo que a necessidade de reimunização pode não ser substancial.

O controle da viremia foi similar para os grupos de

OPAL-Gag e OPAL-All. Respostas de células T CD4 e $CD8^+$ Gag-específicas em animais OPAL-Gag foram 5,1 e 3,5 vezes maiores do que naqueles animais OPAL-All, apesar de uma dose idêntica de peptídeos Gag superpostos. Isso sugere competição antigênica entre peptídeos de Gag e as outras proteínas do SIV. As respostas de células T CD8 Env-específicas identificadas foram incapazes de ter um impacto significativo na replicação viral ou progressão da doença. Respostas ao Env (ou a outros não-Gag) podem potencialmente inibir respostas de células T $CD8^+$ mais eficazes. Esse fenômeno é realçado pela observação de que uma resposta de CTL Gag-específica está relacionada ao controle da viremia, embora animais com respostas de células T $CD8^+$ tanto Env- quanto Gag-específicas não tenham tido um resultado melhor do que os responsivos apenas ao Env ou aos controles não vacinados, tanto no controle da viremia quanto na prevenção de doença. A indução de respostas imunodominantes de células T não-Gag por vacinas de multiproteínas de HIV pode limitar o desenvolvimento de respostas de células T Gag-específicas [19]. Um grande estudo de cohorte em humanos demonstrou que as respostas de células T Gag-específicas foram as mais eficazes no controle da viremia por HIV [29]. Considerados em conjunto, esses estudos sugerem que vacinas terapêuticas para o HIV podem não visar imunidade HIV-específica multiproteínas maximamente ampla. A imunoterapia com OPAL com peptídeos Gag prossegue em experimentos iniciais em humanos infectados pelo HIV.

Materiais e métodos

Animais

Macacos rabo-de-porco juvenis (*Macaca nemestrina*)

livres de retrovírus símio do tipo D foram estudados em protocolos aprovados por comissões de ética animal institucionais e cuidados de acordo com as diretrizes do "Australian National Health and Medical Research Council". Todos os macacos rabo-de-porco foram tipados para alelos de MHC da classe I por análise conformacional mediada por fita de referência, e a presença de *Mane-A*10* confirmada por PCR com iniciador seqüência-específico, como descrito [21,22]. Trinta e seis macacos foram injetados por via intravenosa com 40 doses infecciosas de cultura de tecido de SIV_{mac251} (gentilmente fornecido por R. Pal, Advanced Biosciences, Kensington, MD), como descrito previamente [9,11], e randomizados em 3 grupos de 12 animais (OPAL-Gag, OPAL-All, Controles) 3 semanas mais tarde. A randomização foi estratificada para carga viral de SIV de pico na 2ª semana, peso, sexo e o gene MHC I *Mane-A*10* (que sabidamente aumenta o controle imune de SIV)[11]. Os animais receberam injeções subcutâneas de terapia antirretroviral dupla com tenofovir e emtricitabina (gentilmente doada por Gilead, Foster City, CA; ambos 30 mg/kg/animal) por 7 semanas a partir da 3ª semana: diariamente a partir da 3ª-5ª semanas pós-infecção e três vezes por semana a partir da 6ª-10ª semanas. Essa ART dupla controla a viremia na maioria dos macacos infectados pelo SIV [12,15,23-25].

Imunizações

Dois grupos de animais (OPAL-Gag e OPAL-All) foram imunizados com imunoterapia com OPAL usando PBMC, como descrito previamente. Resumidamente, células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas sobre Ficoll-paque de 18 ml de sangue (anticoagulado com Na^+-Heparina).

Todas as PBMC isoladas (na média 24 milhões de células) foram suspensas em 0,5 ml de solução salina normal, à qual um pool de 125 peptídeos Gag de SIV_{mac239} ou 823 peptídeos que englobam todas as proteínas de SIV_{mac239} (Gag, Pol, Env, Nef, Vif, Tat, Rev, Vpr, Vpx) foi adicionado a 10 µg/ml de cada peptídeo dentro do pool. Os peptídeos eram de 15-mers superpostos por 11 aminoácidos com >80% de pureza, gentilmente fornecidos pelo programa repositório de reagente de AIDS da NIH (números de catálogo 6204, 6443, 6883, 6448-50, 6407, 8762, 6205). Para formar o pool dos peptídeos, cada frasco de 1 mg de peptídeo de 15mer liofilizado foi solubilizado em 10-50 µl de DMSO puro e adicionado em conjunto. A concentração dos pools de peptídeos Gag de SIV e All foi de 629 e 72 µg/ml/peptídeo, respectivamente. As PBMC pulsadas por peptídeo foram mantidas por 1 h em um banho-maria a 37°C, turbilhonadas suavemente a cada 15 minutos, e depois, sem lavagem, reinfundidas IV no animal autólogo. Macacos de controle não receberam tratamento com vacina.

Ensaios de imunologia

Respostas imunes de células T CD4 e CD8 SIV-específicas foram analisadas por expressão de IFN-γ intracelular, como descrito previamente [19]. Resumidamente, 200 µl de sangue total foram incubados a 37°C com 1 µg/ml/peptídeo de pools de peptídeos de 15mer superpostos de SIV (descritos acima) ou DMSO isoladamente, e os anticorpos co-estimuladores anti-CD28 e anti-CD49d (BD Biosciences/Pharmingen San Diego CA) e Brefeldin A (10 µg/ml, Sigma) por 6 h. Anticorpos anti-CD3-PE, anti-CD4-FITC e anti-CD8-PerCP (BD, clones SP34, M-T477 e SK1,

respectivamente) foram adicionados por 30 minutos. As células sangüíneas vermelhas foram lisadas (solução de lise FACS, BD) e os leucócitos restantes permeabilizados (Solução de Permeabilização FACS 2, BD) e incubados com anticorpo anti-IFN-γ-APC humano (BD, clone B27), antes da fixação e aquisição (LSRII, BD). Os dados da aquisição foram analisados usando Flowjo versão 6.3.2 (Tree Star, Ashland, OR). A percentagem de linfócitos antígeno-específicos retidos que expressam IFN-γ foi avaliada em subconjuntos de linfócitos $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$. As respostas ao epítopo de célula T CD8 imunodominante para Gag de SIV KP9 em animais *Mane-A*10*$^+$ foram avaliadas por um tetrâmero *Mane-A*10*/KP9, como descrito [28]. Células T CD4 periféricas totais foram medidas como uma proporção de linfócitos por citometria de fluxo em sangue fresco.

Ensaios de virologia

RNA de SIV no plasma foi quantificado por PCR em tempo real em 140 µl de plasma na "University of Melbourne" (limite inferior de quantificação de 3,1 $\log_{10}$ cópias/ml) em todos os pontos do tempo usando uma sonda TaqMan®, como descrito previamente [19,26] e, para validar esses resultados com um ensaio mais sensível, em vírions peletizados de 1,0 ml de plasma no "National Cancer Institute" (limite inferior de quantificação de 1,5 $\log_{10}$ cópias/ml), como descrito previamente [13]. Para identificar se ocorreu escape mutacional no epítopo KP9, realizamos clonagem por RT-PCR e seqüenciamento do cDNA viral plasmático extraído através de KP9 em Gag, como descrito previamente [27].

Pontos finais/análises estatísticas

O ponto final primário foi a redução no RNA do SIV no

plasma em animais imunizados com OPAL, comparados com controles por área sob a curva com ponderação temporal (TWAUC) por 10 semanas após a retirada da ART (ou seja, amostras da 12ª até a 20ª semana). Essa abordagem de resumo estatístico é recomendada para estudos como aqueles que envolvem medidas seriais [38]. Os inventores compararam grupos de tratamento ativo (OPAL-Gag e OPAL-All) com controles separadamente e em conjunto. A análise primária foi restrita aos animais que controlaram a viremia na ART na 10ª semana (VL < 3,1 $\log_{10}$ cópias/ml), na medida em que o controle da VL é um previsor importante da habilidade dos animais para responderem às imunoterapias [7,39]. Um ponto final virológico secundário pré-planejado foi o estudo de todos os animais vivos com ajuste tanto para a VL ao final da ART (10ª semana) quanto ao estado de *Mane-A*10*. As comparações de grupos usaram testes t de duas amostras para dados contínuos, e o teste exato de Fisher para dados binários. As análises de sobrevida utilizaram análises Cox-regressão.

Cálculo da potência

Os presentes inventores estimaram que o desvio-padrão do retorno da VL após interrupção do tratamento seria de 0,8 $\log_{10}$ cópia de RNA do SIV/ml de plasma [5,12,15,23-25]. Nesse estudo intensivo, foi estimado que 2 dos 12 macacos dentro de um grupo podem ter problemas confusos como, por exemplo, resposta incompleta à ART ou morte por infecção aguda por SIV. Uma comparação de 10 animais de controles vs 10 animais com tratamento ativo gera 80% de potência (p = 0,05) para detectar uma diferença de 1,0 $\log_{10}$ na TWAUC da VL ao longo das primeiras 10 semanas. Uma comparação

estimada de 10 animais de controle vs. todos os 20 animais tratados ativamente (OPAL-Gag mais OPAL-All) gerou 80% de potência para detectar diferenças de 0,87 $\log_{10}$ cópia/ml de redução da VL.

Realização do estudo

Esse estudo foi realizado de acordo com um protocolo escrito previamente usando "Good Laboratory Practice Standards" da "Australian Therapeutic Goods Administration" como diretrizes. Os desvios do protocolo foram pouco significativos e não afetaram os resultados do estudo. A auditoria de dados parciais durante o estudo não despertaram preocupações sobre a realização do estudo.

A revelação de cada patente, pedido de patente e publicação aqui citados é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

A citação de qualquer referência aqui feita não deve ser considerada como uma admissão de que essa referência está disponível como "Técnica estabelecida" em relação ao presente pedido.

Ao longo de toda a especificação, o objetivo foi descrever as modalidades preferidas da invenção, sem limitação da invenção a qualquer modalidade ou conjunto específico de características. Aqueles habilitados na técnica, portanto, observarão que, à luz da presente revelação, várias modificações e alterações podem ser feitas nas modalidades específicas exemplificadas, sem se afastar do escopo da presente invenção. Todas essas modificações e alterações devem ser incluídas dentro do escopo das reivindicações em anexo.

TABELAS

TABELA 1

SUBSTITUIÇÕES CONSERVADORAS DE AMINOÁCIDOS

Resíduo original	Substituições exemplares	Resíduo original	Substituições exemplares
Ala	Ser	Leu	Ile, Val
Arg	Lys	Lys	Arg, Gln, Glu
Asn	Gln, His	Met	Leu, Ile,
Asp	Glu	Phe	Met, Leu, Tyr
Cys	Ser	Ser	Thr
Gln	Asn	Thr	Ser
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp, Phe
His	Asn, Gln	Val	Ile, Leu
Ile	Leu, Val		

TABELA 2

Uma modalidade de uma seqüência do pool de peptídeo gag de SIV_{mac239}. Cada peptídeo tem 15 aminoácidos de comprimento e se sobrepõe ao peptídeo precedente por 11 aminoácidos. O peptídeo 125 tem 14 aminoácidos de comprimento. A seqüência de gag de comprimento total [ID. DE SEQ. N°: 250] está modificada em relação à base de dados da seqüência de HIV (http://hiv-web.lanl.gov).

	PEPTÍDEO	ID DE SEQÜÊNCIA
1	MGVRNSVLSGKKADE	ID. DE SEQ. N°: 1
2	NSVLSGKKADELEKI	ID. DE SEQ. N°: 2
3	SGKKADELEKIRLRP	ID. DE SEQ. N°: 3
4	ADELEKIRLRPNGKK	ID. DE SEQ. N°: 4
5	EKIRLRPNGKKKYML	ID. DE SEQ. N°: 5
6	LRPNGKKKYMLKHVV	ID. DE SEQ. N°: 6

	PEPTÍDEO	ID DE SEQÜÊNCIA
7	GKKKYMLKHVVWAAN	ID. DE SEQ. N°: 7
8	YMLKHVVWAANELDR	ID. DE SEQ. N°: 8
9	HVVWAANELDRFGLA	ID. DE SEQ. N°: 9
10	AANELDRFGLAESLL	ID. DE SEQ. N°: 10
11	LDRFGLAESLLENKE	ID. DE SEQ. N°: 11
12	GLAESLLENKEGCQK	ID. DE SEQ. N°: 12
13	SLLENKEGCQKILSV	ID. DE SEQ. N°: 13
14	NKEGCQKILSVLAPL	ID. DE SEQ. N°: 14
15	CQKILSVLAPLVPTG	ID. DE SEQ. N°: 15
16	LSVLAPLVPTGSENL	ID. DE SEQ. N°: 16
17	LSVLAPLVPTGSENL	ID. DE SEQ. N°: 17
18	PTGSENLKSLYNTVC	ID. DE SEQ. N°: 18
19	ENLKSLYNTVCVIWC	ID. DE SEQ. N°: 19
20	SLYNTVCVIWCIHAE	ID. DE SEQ. N°: 20
21	TVCVIWCIHAEEKVK	ID. DE SEQ. N°: 21
22	IWCIHAEEKVKHTEE	ID. DE SEQ. N°: 22
23	HAEEKVKHTEEAKQI	ID. DE SEQ. N°: 23
24	KVKHTEEAKQIVQRH	ID. DE SEQ. N°: 24
25	TEEAKQIVQRHLVVE	ID. DE SEQ. N°: 25
26	KQIVQRHLVVETGTT	ID. DE SEQ. N°: 26
27	QRHLVVETGTTETMP	ID. DE SEQ. N°: 27
28	VVETGTTETMPKTSR	ID. DE SEQ. N°: 28
29	GTTETMPKTSRPTAP	ID. DE SEQ. N°: 29
30	TMPKTSRPTAPSSGR	ID. DE SEQ. N°: 30
31	TSRPTAPSSGRGGNY	ID. DE SEQ. N°: 31
32	TAPSSGRGGNYPVQQ	ID. DE SEQ. N°: 32
33	SGRGGNYPVQQIGGN	ID. DE SEQ. N°: 33
34	GNYPVQQIGGNYVHL	ID. DE SEQ. N°: 34

	PEPTÍDEO	ID DE SEQÜÊNCIA
35	VQQIGGNYVHLPLSP	ID. DE SEQ. N°: 35
36	GGNYVHLPLSPRTLN	ID. DE SEQ. N°: 36
37	VHLPLSPRTLNAWVK	ID. DE SEQ. N°: 37
38	LSPRTLNAWVKLIEE	ID. DE SEQ. N°: 38
39	TLNAWVKLIEEKKFG	ID. DE SEQ. N°: 39
40	WVKLIEEKKFGAEVV	ID. DE SEQ. N°: 40
41	IEEKKFGAEWPGFQ	ID. DE SEQ. N°: 41
42	KFGAEVVPGFQALSE	ID. DE SEQ. N°: 42
43	EVVPGFQALSEGCTP	ID. DE SEQ. N°: 43
44	GFQALSEGCTPYDIN	ID. DE SEQ. N°: 44
45	LSEGCTPYDINQMLN	ID. DE SEQ. N°: 45
46	CTPYDINQMLNCVGD	ID. DE SEQ. N°: 46
47	DINQMLNCVGDHQAA	ID. DE SEQ. N°: 47
48	MLNCVGDHQAAMQII	ID. DE SEQ. N°: 48
49	VGDHQAAMQIIRDII	ID. DE SEQ. N°: 49
50	QAAMQIIRDIINEEA	ID. DE SEQ. N°: 50
51	QIIRDIINEEAADWD	ID. DE SEQ. N°: 51
52	DIINEEAADWDLQHP	ID. DE SEQ. N°: 52
53	EEAADWDLQHPQPAP	ID. DE SEQ. N°: 53
54	DWDLQHPQPAPQQGQ	ID. DE SEQ. N°: 54
55	QHPQPAPQQGQLREP	ID. DE SEQ. N°: 55
56	PAPQQGQLREPSGSD	ID. DE SEQ. N°: 56
57	QGQLREPSGSDIAGT	ID. DE SEQ. N°: 57
58	REPSGSDIAGTTSSV	ID. DE SEQ. N°: 58
59	GSDIAGTTSSVDEQI	ID. DE SEQ. N°: 59
60	AGITSSVDEQIQWMY	ID. DE SEQ. N°: 60
61	SSVDEQIQWMYRQQN	ID. DE SEQ. N°: 61
62	EQIQWMYRQQNPIPV	ID. DE SEQ. N°: 62

	PEPTÍDEO	ID DE SEQÜÊNCIA
63	WMYRQQNPIPVGNIY	ID. DE SEQ. N°: 63
64	QQNPIPVGNIYRRWI	ID. DE SEQ. N°: 64
65	IPVGNIYRRWIQLGL	ID. DE SEQ. N°: 65
66	NIYRRWIQLGLQKCV	ID. DE SEQ. N°: 66
67	RWIQLGLQKCVRMYN	ID. DE SEQ. N°: 67
68	LGLQKCVRMYNPTNI	ID. DE SEQ. N°: 68
69	KCVRMYNPTNILDVK	ID. DE SEQ. N°: 69
70	MYNPTNILDVKQGPK	ID. DE SEQ. N°: 70
71	TNILDVKQGPKEPFQ	ID. DE SEQ. N°: 71
72	DVKQGPKEPFQSYVD	ID. DE SEQ. N°: 72
73	GPKEPFQSYVDRFYK	ID. DE SEQ. N°: 73
74	PFQSYVDRFYKSLRA	ID. DE SEQ. N°: 74
75	YVDRFYKSLRAEQTD	ID. DE SEQ. N°: 75
76	FYKSLRAEQTDAAVK	ID. DE SEQ. N°: 76
77	LRAEQTDAAVKNWMT	ID. DE SEQ. N°: 77
78	QTDAAVKNWMTQTLL	ID. DE SEQ. N°: 78
79	AVKNWMTQTLLIQNA	ID. DE SEQ. N°: 79
80	WMTQTLLIQNANPDC	ID. DE SEQ. N°: 80
81	TLLIQNANPDCKLVL	ID. DE SEQ. N°: 81
82	QNANPDCKLVLKGLG	ID. DE SEQ. N°: 82
83	PDCKLVLKGLGVNPT	ID. DE SEQ. N°: 83
84	LVLKGLGVNPTLEEM	ID. DE SEQ. N°: 84
85	GLGVNPTLEEMLTAC	ID. DE SEQ. N°: 85
86	NPTLEEMLTACQGVG	ID. DE SEQ. N°: 86
87	EEMLTACQGVGGPGQ	ID. DE SEQ. N°: 87
88	TACQGVGGPGQKARL	ID. DE SEQ. N°: 88
89	GVGGPGQKARLMAEA	ID. DE SEQ. N°: 89
90	PGQKARLMAEALKEA	ID. DE SEQ. N°: 90

	PEPTÍDEO	ID DE SEQÜÊNCIA
91	ARLMAEALKEALAPV	ID. DE SEQ. N°: 91
92	AEALKEALAPVPIPF	ID. DE SEQ. N°: 92
93	KEALAPVPIPPAAAQ	ID. DE SEQ. N°: 93
94	APVPIPPAAAQQRGP	ID. DE SEQ. N°: 94
95	IPPAAAQQRGPRKPI	ID. DE SEQ. N°: 95
96	AAQQRGPRKPIKCWN	ID. DE SEQ. N°: 96
97	RGPRKPIKCWNCGKE	ID. DE SEQ. N°: 97
98	KPIKCWNCGKEGHSA	ID. DE SEQ. N°: 98
99	CWNCGKEGHSARQCR	ID. DE SEQ. N°: 99
100	GKEGHSARQCRAPRR	ID. DE SEQ. N°: 100
101	HSARQCRAPRRQGCW	ID. DE SEQ. N°: 101
102	QCRAPRRQGCWKCGK	ID. DE SEQ. N°: 102
103	PRRQGCWKCGKMDHV	ID. DE SEQ. N°: 103
104	GCWKCGKMDHVMAKC	ID. DE SEQ. N°: 104
105	CGKMDHVMAKCPDRQ	ID. DE SEQ. N°: 105
106	DHVMAKCPDRQAGFL	ID. DE SEQ. N°: 106
107	AKCPDRQAGFLGLGP	ID. DE SEQ. N°: 107
108	DRQAGFLGLGPWGKK	ID. DE SEQ. N°: 108
109	GFLGLGPWGKKPRNF	ID. DE SEQ. N°: 109
110	LGPWGKKPRNFPMAQ	ID. DE SEQ. N°: 110
111	GKKPRNFPMAQVHQG	ID. DE SEQ. N°: 111
112	RNFPMAQVHQGLMPT	ID. DE SEQ. N°: 112
113	MAQVHQGLMPTAPPE	ID. DE SEQ. N°: 113
114	HQGLMPTAPPEDPAV	ID. DE SEQ. N°: 114
115	MPTAPPEDPAVDLLK	ID. DE SEQ. N°: 115
116	PPEDPAVDLLKNYMQ	ID. DE SEQ. N°: 116
117	PAVDLLKNYMQLGKQ	ID. DE SEQ. N°: 117
118	LLKNYMQLGKQQREK	ID. DE SEQ. N°: 118

	PEPTÍDEO	ID DE SEQÜÊNCIA
119	YMQLGKQQREKQRES	ID. DE SEQ. N°: 119
120	GKQQREKQRESREKP	ID. DE SEQ. N°: 120
121	REKQRESREKPYKEV	ID. DE SEQ. N°: 121
122	RESREKPYKEVTEDL	ID. DE SEQ. N°: 122
123	EKPYKEVTEDLLHLN	ID. DE SEQ. N°: 123
124	KEVTEDLLHLNSLFG	ID. DE SEQ. N°: 124
125	EDLLHLNSLFGGDQ	ID. DE SEQ. N°: 125

TABELA 3

Uma modalidade de uma seqüência de consenso do pool de peptídeo Gag de HIV-1 Clado B. Cada peptídeo tem 15 aminoácidos de comprimento e se sobrepõe ao peptídeo precedente por 11 aminoácidos. O peptídeo 124 tem 12 aminoácidos de comprimento. A seqüência de Gag de comprimento total [ID. DE SEQ. N°: 251] está modificada em relação à base de dados de seqüência do HIV.

	PEPTÍDEO	ID DE SEQÜÊNCIA
1	MGARASVLSGGELDR	ID. DE SEQ. N°: 126
2	ASVLSGGELDRWEKI	ID. DE SEQ. N°: 127
3	SGGELDRWEKIRLRP	ID. DE SEQ. N°: 128
4	LDRWEKIRLRPGGKK	ID. DE SEQ. N°: 129
5	EKIRLRPGGKKKYKL	ID. DE SEQ. N°: 130
6	LRPGGKKKYKLKHIV	ID. DE SEQ. N°: 131
7	GKKKYKLKHIVWASR	ID. DE SEQ. N°: 132
8	YKLKHIVWASRELER	ID. DE SEQ. N°: 133
9	HIVWASRELERFAVN	ID. DE SEQ. N°: 134
10	ASRELERFAVNPGLL	ID. DE SEQ. N°: 135
11	ELERFAVNPGLLETS	ID. DE SEQ. N°: 136
12	FAVNPGLLETSEGCR	ID. DE SEQ. N°: 137

	PEPTÍDEO	ID DE SEQÜÊNCIA
13	PGLLETSEGCRQILG	ID. DE SEQ. N°: 138
14	ETSEGCRQILGQLQP	ID. DE SEQ. N°: 139
15	GCRQILGQLQPSLQT	ID. DE SEQ. N°: 140
16	ILGQLQPSLQTGSEE	ID. DE SEQ. N°: 141
17	LQPSLQTGSEELRSL	ID. DE SEQ. N°: 142
18	LQTGSEELRSLYNTV	ID. DE SEQ. N°: 143
19	SEELRSLYNTVATLY	ID. DE SEQ. N°: 144
20	RSLYNTVATLYCVHQ	ID. DE SEQ. N°: 145
21	NTVATLYCVHQRIEV	ID. DE SEQ. N°: 146
22	TLYCVHQRIEVKDTK	ID. DE SEQ. N°: 147
23	VHQRIEVKDTKEALE	ID. DE SEQ. N°: 148
24	IEVKDTKEALEKIEE	ID. DE SEQ. N°: 149
25	DTKEALEKIEEEQNK	ID. DE SEQ. N°: 150
26	ALEKIEEEQNKSKKK	ID. DE SEQ. N°: 151
27	IEEEQNKSKKKAQQA	ID. DE SEQ. N°: 152
28	QNKSKKKAQQAAADT	ID. DE SEQ. N°: 153
29	KKKAQQAAADTGNSS	ID. DE SEQ. N°: 154
30	QQAAADTGNSSQVSQ	ID. DE SEQ. N°: 155
31	ADTGNSSQVSQNYPI	ID. DE SEQ. N°: 156
32	NSSQVSQNYPIVQNL	ID. DE SEQ. N°: 157
33	VSQNYPIVQNLQGQM	ID. DE SEQ. N°: 158
34	YPIVQNLQGQMVHQA	ID. DE SEQ. N°: 159
35	QNLQGQMVHQAISPR	ID. DE SEQ. N°: 160
36	GQMVHQAISPRTLNA	ID. DE SEQ. N°: 161
37	HQAISPRTLNAWVKV	ID. DE SEQ. N°: 162
38	SPRTLNAWVKVVEEK	ID. DE SEQ. N°: 163
39	LNAWVKVVEEKAFSP	ID. DE SEQ. N°: 164
40	VKVVEEKAFSPEVIP	ID. DE SEQ. N°: 165

	PEPTÍDEO	ID DE SEQÜÊNCIA
41	EEKAFSPEVIPMFSA	ID. DE SEQ. N°: 166
42	FSPEVIPMFSALSEG	ID. DE SEQ. N°: 167
43	VIPMFSALSEGATPQ	ID. DE SEQ. N°: 168
44	FSALSEGATPQDLNT	ID. DE SEQ. N°: 169
45	SEGATPQDLNTMLNT	ID. DE SEQ. N°: 170
46	TPQDLNTMLNTVGGH	ID. DE SEQ. N°: 171
47	LNTMLNTVGGHQAAM	ID. DE SEQ. N°: 172
48	LNTVGGHQAAMQMLK	ID. DE SEQ. N°: 173
49	GGHQAAMQMLKETIN	ID. DE SEQ. N°: 174
50	AAMQMLKETINEEAA	ID. DE SEQ. N°: 175
51	QMLKETINEEAAEWD	ID. DE SEQ. N°: 176
52	ETINEEAAEWDRLHP	ID. DE SEQ. N°: 177
53	EEAAEWDRLHPVHAG	ID. DE SEQ. N°: 178
54	EWDRLHPVHAGPIAP	ID. DE SEQ. N°: 179
55	LHPVHAGPIAPGQMR	ID. DE SEQ. N°: 180
56	HAGPIAPGQMREPRG	ID. DE SEQ. N°: 181
57	IAPGQMREPRGSDIA	ID. DE SEQ. N°: 182
58	QMREPRGSDIAGTTS	ID. DE SEQ. N°: 183
59	PRGSDIAGTTSTLQE	ID. DE SEQ. N°: 184
60	DIAGTTSTLQEQIGW	ID. DE SEQ. N°: 185
61	TTSTLQEQIGWMTNN	ID. DE SEQ. N°: 186
62	LQEQIGWMTNNPPIP	ID. DE SEQ. N°: 187
63	IGWMTNNPPIPVGEI	ID. DE SEQ. N°: 188
64	TNNPPIPVGEIYKRW	ID. DE SEQ. N°: 189
65	PIPVGEIYKRWIILG	ID. DE SEQ. N°: 190
66	GEIYKRWIILGLNKI	ID. DE SEQ. N°: 191
67	KRWIILGLNKIVRMY	ID. DE SEQ. N°: 192
68	ILGLNKIVRMYSPTS	ID. DE SEQ. N°: 193

	PEPTÍDEO	ID DE SEQÜÊNCIA
69	NKIVRMYSPTSILDI	ID. DE SEQ. N°: 194
70	RMYSPTSILDIRQGP	ID. DE SEQ. N°: 195
71	PTSILDIRQGPKEPF	ID. DE SEQ. N°: 196
72	LDIRQGPKEPFRDYV	ID. DE SEQ. N°: 197
73	QGPKEPFRDYVDRFY	ID. DE SEQ. N°: 198
74	EPFRDYVDRFYKTLR	ID. DE SEQ. N°: 199
75	DYVDRFYKTLRAEQA	ID. DE SEQ. N°: 200
76	RFYKTLRAEQASQEV	ID. DE SEQ. N°: 201
77	TLRAEQASQEVKNWM	ID. DE SEQ. N°: 202
78	EQASQEVKNWMTETL	ID. DE SEQ. N°: 203
79	QEVKNWMTETLLVQN	ID. DE SEQ. N°: 204
80	NWMTETLLVQNANPD	ID. DE SEQ. N°: 205
81	ETLLVQNANPDCKTI	ID. DE SEQ. N°: 206
82	VQNANPDCKTILKAL	ID. DE SEQ. N°: 207
83	NPDCKTILKALGPAA	ID. DE SEQ. N°: 208
84	KTILKALGPAATLEE	ID. DE SEQ. N°: 209
85	KALGPAATLEEMMTA	ID. DE SEQ. N°: 210
86	PAATLEEMMTACQGV	ID. DE SEQ. N°: 211
87	LEEMMTACQGVGGPG	ID. DE SEQ. N°: 212
88	MTACQGVGGPGHKAR	ID. DE SEQ. N°: 213
89	QGVGGPGHKARVLAE	ID. DE SEQ. N°: 214
90	GPGHKARVLAEAMSQ	ID. DE SEQ. N°: 215
91	KARVLAEAMSQVTNS	ID. DE SEQ. N°: 216
92	LAEAMSQVTNSATIM	ID. DE SEQ. N°: 217
93	MSQVTNSATIMMQRG	ID. DE SEQ. N°: 218
94	TNSATIMMQRGNFRN	ID. DE SEQ. N°: 219
95	TIMMQRGNFRNQRKT	ID. DE SEQ. N°: 220
96	QRGNFRNQRKTVKCP	ID. DE SEQ. N°: 221

	PEPTÍDEO	ID DE SEQÜÊNCIA
97	FRNQRKTVKCFNCGK	ID. DE SEQ. N°: 222
98	RKTVKCFNCGKEGHI	ID. DE SEQ. N°: 223
99	VKCFNCGKEGHIAKN	ID. DE SEQ. N°: 224
100	NCGKEGHIAKNCRAP	ID. DE SEQ. N°: 225
101	EGHIAKNCRAPRKKG	ID. DE SEQ. N°: 226
102	AKNCRAPRKKGCWKC	ID. DE SEQ. N°: 227
103	RAPRKKGCWKCGKEG	ID. DE SEQ. N°: 228
104	KKGCWKCGKEGHQMK	ID. DE SEQ. N°: 229
105	WKCGKEGHQMKDCTE	ID. DE SEQ. N°: 230
106	KEGHQMKDCTERQAN	ID. DE SEQ. N°: 231
107	QMKDCTERQANFLGK	ID. DE SEQ. N°: 232
108	CTERQANFLGKIWPS	ID. DE SEQ. N°: 233
109	QANFLGKIWPSHKGR	ID. DE SEQ. N°: 234
110	LGKIWPSHKGRPGNF	ID. DE SEQ. N°: 235
111	WPSHKGRPGNFLQSR	ID. DE SEQ. N°: 236
112	KGRPGNFLQSRPEPT	ID. DE SEQ. N°: 237
113	GNFLQSRPEPTAPPE	ID. DE SEQ. N°: 238
114	QSRPEPTAPPEESFR	ID. DE SEQ. N°: 239
115	EPTAPPEESFRFGEE	ID. DE SEQ. N°: 240
116	PPEESFRFGEETTTP	ID. DE SEQ. N°: 241
117	SFRFGEETTTPSQKQ	ID. DE SEQ. N°: 242
118	GEETTTPSQKQEPID	ID. DE SEQ. N°: 243
119	TTTPSQKQEPIDKEL	ID. DE SEQ. N°: 244
120	SQKQEPIDKELYPLA	ID. DE SEQ. N°: 245
121	EPIDKELYPLASLRS	ID. DE SEQ. N°: 246
122	KELYPLASLRSLFGN	ID. DE SEQ. N°: 247
123	PLASLRSLFGNDPSS	ID. DE SEQ. N°: 248
124	LRSLFGNDPSSQ	ID. DE SEQ. N°: 249

TABELA 4

UMA MODALIDADE DE UMA SEQÜÊNCIA DE GAG DE SIV DE COMPRIMENTO TOTAL

MGVRNSVLSGKICADELEKIRLRPNGKKKYMLKHVVWAANELD RFGLAESLLENKEGCQKILSVLAPLVPTGSENLKSLYNTVCVI WCIHAEEKVKHTEEAKQIVQRHLVVETGTTETMPKTSRPTAPS SGRGGNYPVQQIGGNYVHLPLSPRTLNAWVKLIEEKKFGAEVV IEEKKFGAEVVPGFQALSEGCTPYDINQMLNCVGDHQAAMQII RDIINEEAADWDLQHPQPAPQQGQLREPSGSDIAGTTSSVDEQ IQWMYRQQNPIPVGNIYRRWIQLGLQKCVRMYNPTNILDVKQG PKEPFQSYVDRFYKSLRAEQTDAAVKNWMTQTLLIQNANPDCT LLIQNANPDCKLVLKGLGVNPTLEEMLTACQGVGGPGQKARLM AEALKEALAPVPIPFAAAQQRGPRKPIKCWNCGKEGHSARQCR APRRQGCWKCGKMDHVMAKCPDRQAGFLGLGPWGKKPRNFPMA QVHQGLMPTAPPEDPAVDLLKNYMQLGKQQREKQRESREKPRE KQRESREKPYKEVTEDLLHLNSLFGGDQ	ID. DE SEQ. N°: 250

TABELA 5

UMA MODALIDADE DE UMA SEQÜÊNCIA DE GAG DE HIV-1 DE COMPRIMENTO TOTAL

MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERF AVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCV HQRIEVKDTKEALEKIEEEQNKSKKKAQQAAADTGNSSQVSQNY PIVQNLQGQMVHQAISPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPEEKAFS PEVIPMFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEA AEWDRLHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNN PPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYV DRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDETLLVQNANPDC KTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVTNSA TIMMQRGNFRNQRKTVKCFNCGKEGHIAKNCRAPRKKGCWKCGK EGHQMKDCTERQANFLGKIWPSHKGRPGNFLQSRPEPTAPPEES	ID. DE SEQ. N°: 251

FRFGEETTTPSQKQEPIDKELYPLAEPIDKELYPLASLRSLFGN DPSSQ	

TABELA 6

LISTA DE AMINOÁCIDOS NÃO CONVENCIONAIS

Aminoácido não convencional	**Aminoácido não convencional**
Ácido α-aminobutírico	L-N-metilalanina
α-amino-α-metilbutirato	L-N-metilarginina
Aminociclopropano-carboxilato	L-N-metilasparagina
Ácido aminoisobutírico	Ácido L-N-metilaspártico
Aminonorbornil-carboxilato	L-N-metilcisteína
Ciclohexilalanina	L-N-metilglutamina
Ciclopentilalanina	Ácido L-N-metilglutâmico
L-N-metilisoleucina	L-N-metilhistidina
D-alanina	L-N-metilleucina
D-arginina	L-N-metillisina
Ácido D-aspártico	L-N-metilmetionina
D-cisteína	L-N-metilnorleucina
D-glutamato	L-N-metilnorvalina
D-glutâmico ácido	L-N-metilornitina
D-histidina	L-N-metilfenilalanina
D-isoleucina	L-N-metilprolina
D-leucina	L-N-metilserina
D-lisina	L-N-metiltreonina
D-metionina	L-N-metiltriptofano
D-ornitina	L-N-metiltirosina
D-fenilalanina	L-N-metilvalina
D-prolina	L-N-metiletilglicina
D-serina	L-N-metil-t-butilglicina

D-treonina	L-norleucina
D-triptofano	L-norvalina
D-tirosina	α-metil-aminoisobutirato
D-valina	α-metil-γ-aminobutirato
D-α-metilalanina	α-metilciclohexilalanina
D-α-metilarginina	α-metilciclopentilalanina
D-α-metilasparagina	α-metil-α-naftilalanina
D-α-metilaspartato	α-metilpenicilamina
D-α-metilcisteína	N-(4-aminobutil)glicina
D-α-metilglutamina	N-(2-aminoetil)glicina
D-α-metilhistidina	N-(3-aminopropil)glicina
D-α-metilisoleucina	N-amino-α-metilbutirato
D-α-metilleucina	α-naftilalanina
D-α-metillisina	N-benzilglicina
D-α-metilmetionina	N-(2-carbamiletil)glicina
D-α-metilornitina	N-(carbamilmetil)glicina
D-α-metilfenilalanina	N-(2-carboxietil)glicina
D-α-metilprolina	N-(carboximetil)glicina
D-α-metilserina	N-ciclobutilglicina
D-α-metiltreonina	N-cicloheptilglicina
D-α-metiltriptofano	N-ciclohexilglicina
D-α-metiltirosina	N-ciclodecilglicina
L-α-metilleucina	L-α-metillisina
L-α-metilmetionina-L-α-metilnorvalina	L-α-metilnorleucina
L-α-metilfenilalanina	L-α-metilornitina
L-α-metilserina	L-α-metilprolina
L-α-metiltriptofano	L-α-metiltreonina
L-α-metilvalina	L-α-metiltirosina

N-(N-(2,2-difeniletil-carbamilmetil)glicina	L-N-metilhomofenilalanina
1-carbóxi-1-(2,2-difenil-etil-amino)ciclopropano	N-(N-(3,3-difenilpropil-carbamilmetil)glicina

TABELA 7

ANÁLISE ESTATÍSTICA SOBRE VL E SOBREVIDA

Animais analisados	Comparação	n	Redução da VL 10 semanas sem ART*	Teste t bicaudado (valor p)	Redução da VL 6 meses sem ART	Teste t bicaudado (valor p)	Redução da VL 1 ano sem ART**	Teste t bicaudado (valor p)	Sobrevida 1 ano sem ART (valor p) +
VL indetectável na 10ª semana (n=26)	OPAL-Gag + All vs Controles	16 vs 10	0,50 (0,73)	**0,084**	0,64 (0,93)	**0,028**	0,80 (0,98)	**0,019**	**0,053**
	OPAL-All vs Controles	8 vs 10	0,42 (0,74)	0,136	0,61 (0,90)	0,114	0,79 (0,88)	**0,066**	NA**
	OPAL-Gag vs Controles	8 vs 10	0,57 (0,71)	0,262	0,67 (0,95)	**0,080**	0,81 (1,07)	**0,069**	0,212

Todos os animais ajustados para estado de *Mane-A*10* e VL na 10ª semana (n=32)	OPAL-Gag + All vs Controles	21 vs 11	0,47 (0,54)	**0,050**	0,61 (0,66)	**0,016**	0,74 (0,66)	**0,011**	**0,020**
	OPAL-All vs Controles	11 vs 11	0,51 (0,53)	**0,072**	0,60 (0,64)	**0,040**	0,71 (0,60)	**0,023**	**0,054**
	OPAL-Gag vs Controles	10 vs 11	0,44 (0,54)	0,116	0,63 (0,69)	**0,032**	0,77 (0,72)	**0,035**	**0,022**

* Reduções dos valores da VL são $\log_{10}$ cópias/ml comparados com controles. Os valores mostrados refletem AUC VL com ponderação temporal entre animais vacinados e controles após retirada da ART, e redução média absoluta ao final do período entre parênteses.

** 12 animais morreram após a 41ª semana; a média das 2 últimas observações da VL foi usada para estimar diferenças na VL até a 64ª semana.

* Valor p da sobrevida reflete análise Cox-regressão.

** Nenhum dos 8 animais vacinados com OPAL-All que tinham VL indetectável em ART morreu vs 5 de 10 controles - essa comparação não permitiu uma estimativa da significância dessa comparação.

BIBLIOGRAFIA

1. Markowitz, M. *e cols.* "Discontinuation of antiretroviral therapy commenced early during the course of human immunodeficiency virus type 1 infection, with or without adjunctive vaccination". *J. Infect. Dis.* 186, 634-643 (2002).

2. Tubiana, R. *e cols.* "Therapeutic immunization with a human immunodeficiency virus (HIV) type 1-recombinant canarypox vaccine in chronically HIV-infected patients: The Vacciter Study (ANRS 094)". *Vaccine* 23, 4.292-4.301 (2005).

3. Kahn, J.O., Cherng, D.W., Mayer, K., Murray, H. e Lagakos, S. "Evaluation of HIV-1 immunogen, an immunologic modifier, administered to patients infected with HIV having 300 to 549 x 10(6)/L CD4 cell counts: A randomized controlled trial". *Jama* 284, 2.193-2.202 (2000).

4. Katlama, C. *e cols.* "A Phase II, Randomized, Placebo-controlled Study to Evaluate the Immunogenicity of 2 Schedules of an Homologous Prime-boost with the ALVAC-HIV vCP1452 in Chronically HIV-infected Patients (MANON 02)". *14th Conference on Retroviruses and Opportunistic infections*, 25-28 de Fevereiro 2007, *Los Angeles Abstract* 486 (2007).

5. Lu, W., Wu, X., Lu, Y., Guo, W. e Andrieu, J.M. "Therapeutic dendritic-cell Vaccine for simian AIDS". *Nat. Med.* 9, 27-32 (2003).

6. Lu, W., Arraes, L.C., Ferreira, W.T. e Andrieu, J.M. "Therapeutic dendritic-cell Vaccine for chronic HIV-1 infection". *Nat. Med.* 10, 1.359-1.365 (2004).

7. Chea, S., Dale, C.J., De Rose, R., Ramshaw, I.A. e Kent, S.J. "Enhanced cellular immunity in macaques

following a novel peptide immunotherapy". *J. Virol.* 79, 3.748-3.757 (2005).

8. Stratov, I., Dale, C.J., Chea, S., McCluskey, J. e Kent, S.J. "Induction of T-cell immunity to antiretroviral drug-resistant human immunodeficiency virus type 1". *J. Virol.* 79, 7.728-7.737 (2005).

9. Batten, C.J. *e cols.* "Comparative Evaluation of Simian, Simian-Human, and Human Immunodeficiency Virus Infections in the Pigtail Macaque (Macaca nemestrina) Model". *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 22, 580-588 (2006).

10. Reimann, K.A. *e cols.* "Pathogenicity of simian-human immunodeficiency virus SHIV-89.6P and SIVmac is attenuated in cynomolgus macaques and associated with early T-lymphocyte responses". *J. Virol.* 79, 8.878-8.885 (2005).

11. Smith, M.Z. *e cols.* "Analysis of Pigtail Macaque Major Histocompatibility Complex Class I Molecules Presenting Immunodominant Simian Immunodeficiency Virus Epitopes". *J. Virol.* 79, 684-695 (2005).

12. Hel, Z. *e cols.* "Viremia control following antiretroviral treatment and therapeutic immunization during primary SIV251 infection of macaques". *Nat. Med.* 6, 1.140-1.146. (2000).

13. Cline, A.N., Bess, J.W., Piatak, M., Jr. e Lifson, J.D. "Highly sensitive SIV plasma viral load assay: practical considerations, realistic performance expectations, and application to reverse engineering of vaccines for AIDS". *J. Med. Primatol.* 34, 303-312 (2005).

14. von Gegerfelt, A.S. *e cols.* "Long-lasting decrease in viremia in macaques chronically infected with simian immunodeficiency virus SIVmac251 after therapeutic DNA

immunization". *J. Virol.* 81, 1.972-1.979 (2007).

15. Lisziewicz, J. *e cols.* "Control of viral rebound through therapeutic immunization with DermaVir". *Aids* 19, 35-43 (2005).

16. Rosenberg, E.S. *e cols.* "Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia". *Science* 278, 1.447-1.450 (1997).

17. Mattapallil, J.J. *e cols.* "Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection". *Nature* 434, 1.093-1.097 (2005).

18. O'Brien, W.A. *e cols.* "Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS". *N. Engl. J. Med.* 334, 426-431 (1996).

19. De Rose, R. *e cols.* "Comparative Efficacy of Subtype AE Simian-Human Immunodeficiency Virus Priming and Boosting Vaccines in Pigtail Macaques". *J. Virol.* 81, 292-300 (2007).

20. Kiepiela, P. *e cols.* "CD8(+) T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load". *Nat. Med.* 13, 46-53 (2007).

21. Pratt, B.F. *e cols.* "MHC class I allele frequencies in pigtail macaques of diverse origin". *Immunogenetics* 58, 995-1.001 (2006).

22. Smith, M.Z. *e cols.* "The pigtail macaque MHC class I allele Mane-A*10 presents an immundominant SIV Gag epitope: identification, tetramer development and implications of immune escape and reversion". *J. Med. Primatol.* 34, 282-293 (2005).

23. Lori, F. *e cols.* "Control of SIV rebound through

structured treatment interruptions during early infection". *Science* 290, 1.591-1.593 (2000).

24. Villinger, F. *e cols.* "Adoptive transfer of simian immunodeficiency virus (SIV) naive autologous CD4(+) cells to macaques chronically infected with SIV is sufficient to induce long-term nonprogressor status". *Blood* 99, 590-599 (2002).

25. Shen, A. *e cols.* "Resting CD4+ T lymphocytes but not thymocytes provide a latent viral reservoir in a simian immunodeficiency virus-Macaca nemestrina model of human immunodeficiency virus type 1-infected patients on highly active antiretroviral therapy". *J. Virol.* 77, 4.938-4.949 (2003).

26. Dale, C.J. *e cols.* "Chimeric human papilloma virus-simian/human immunodeficiency virus virus-like-particle vaccines: immunogenicity and protective efficacy in macaques". *Virology* 301, 176-187 (2002).

27. Fernandez, C.S. *e cols.* "Rapid viral escape at an immunodominant simian-human immunodeficiency virus cytotoxic T-lymphocyte epitope exacts a dramatic fitness cost". *J. Virol.* 79, 5.721-5.731 (2005).

28. Matthews, J.N., Altman, D.G., Campbell, M.J. e Royston, P. "Analysis of serial measurements in medical research". *Bmj* 300, 230-235 (1990).

29. Fuller, D.H. *e cols.* "DNA immunization in combination with effective antiretroviral drug therapy controls viral rebound and prevents simian AIDS after treatment is discontinued". *Virology* 348, 200-215 (2006).

REIVINDICAÇÕES

1. Método para o tratamento ou a prevenção de uma infecção por lentivírus em um indivíduo, o método caracterizado por compreender o aumento do número de células apresentadoras de antígeno Gag-específicas ou de precursores da célula apresentadora de antígeno Gag-específica no indivíduo, que apresentam em sua superfície pelo menos um peptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma porção de um polipeptídeo Gag, em que as células apresentadoras de antígeno Gag-específicas ou os precursores da célula apresentadora de antígeno Gag-específica são produzidos por contato das células apresentadoras de antígeno ou de precursores da célula apresentadora de antígeno com uma composição que consiste basicamente em diversos peptídeos por um período e sob condições suficientes para que os peptídeos, ou formas processadas dos peptídeos, sejam apresentados pelas células apresentadoras de antígeno ou pelos precursores em sua superfície, em que os peptídeos individuais da composição compreendem porções diferentes de uma seqüência de aminoácidos que correspondem a um polipeptídeo Gag e, opcionalmente, exibem identidade ou similaridade de seqüência parcial para pelo menos outro peptídeo dos diversos peptídeos.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o indivíduo recebe a administração das células apresentadoras de antígeno Gag-específicas ou dos precursores da célula apresentadora de antígeno Gag-específica.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que o indivíduo recebe a administração da composição.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que os peptídeos estão contidos ou de algum outro modo associados a uma partícula.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a partícula é selecionada de lipossomos, micelas, partículas lipídicas, partículas cerâmicas/inorgânicas e partículas poliméricas.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o método exclui a administração ao indivíduo (1) de um peptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma porção de um polipeptídeo não-Gag de lentivírus, ou (2) de uma célula apresentadora de antígeno que foi colocada em contato com um peptídeo de acordo com (1).

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno são selecionadas de células dendríticas, macrófagos e células de Langerhans.

8. Método, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno ou composição são administradas com um veículo e/ou diluente farmaceuticamente aceitável.

9. Método, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno ou composição são administradas com um adjuvante.

10. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada com um composto que estabiliza os peptídeos.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o lentivírus é selecionado do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e vírus da imunodeficiência símia (SIV).

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a identidade ou similaridade de seqüência parcial está contida em uma ou em ambas as extremidades de um peptídeo individual.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que pelo menos 4 resíduos de aminoácidos contíguos estão presentes em uma ou em ambas essas extremidades, cuja seqüência é idêntica ou similar a uma seqüência de aminoácidos contida dentro de pelo menos outro dos peptídeos.

14. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o peptídeo possui pelo menos 6 resíduos de aminoácidos de comprimento.

15. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o peptídeo possui, no máximo, cerca de 500 resíduos de aminoácidos de comprimento.

16. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o comprimento dos peptídeos é selecionado para aumentar a produção de uma resposta de linfócitos T citolíticos.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que os peptídeos possuem cerca de 8 a cerca de 10 aminoácidos de comprimento.

18. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o comprimento dos peptídeos é selecionado para aumentar a produção de uma resposta de

linfócitos T auxiliares.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que os peptídeos possuem cerca de 12 a cerca de 20 aminoácidos de comprimento.

20. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que as seqüências peptídicas são derivadas de pelo menos cerca de 30% da seqüência que corresponde ao polipeptídeo Gag.

21. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que os diversos peptídeos compreendem peptídeos de dois ou mais polipeptídeos Gag diferentes.

22. Processo para a produção de células apresentadoras de antígeno para o tratamento ou a prevenção de uma infecção por lentivírus, o processo caracterizado por compreender o contato de células apresentadoras de antígeno ou de precursores da célula apresentadora de antígeno com uma composição que consiste essencialmente em diversos peptídeos por um período e sob condições suficientes para que os peptídeos, ou as formas processadas dos peptídeos, sejam apresentados pelas células apresentadoras de antígeno ou pelos precursores em sua superfície, em que os peptídeos individuais da composição compreendem porções diferentes de uma seqüência de aminoácidos que correspondem a um polipeptídeo Gag e, opcionalmente, exibem identidade ou similaridade de seqüência parcial para pelo menos outro peptídeo dos diversos peptídeos.

23. Processo, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que os precursores são cultivados por um período e sob condições suficientes para

diferenciar as células apresentadoras de antígeno dos precursores.

24. Processo, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que os peptídeos são colocados em contato com uma população substancialmente purificada de células apresentadoras de antígeno ou seus precursores.

25. Processo, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que os peptídeos são colocados em contato com uma população heterogênea de células apresentadoras de antígeno ou seus precursores.

26. Processo, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a população heterogênea de células é selecionada de sangue e células mononucleares do sangue periférico.

27. Processo, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno ou seus precursores são selecionadas de monócitos, macrófagos, células da linhagem mielóide, células B, células dendríticas ou células de Langerhans.

28. Processo, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que os peptídeos são colocados em contato com uma população não cultivada de células apresentadoras de antígeno ou seus precursores.

29. Processo, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que a população é homogênea.

30. Processo, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que a população é heterogênea.

31. Processo, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que a população é selecionada de sangue total, sangue fresco ou frações deste, células

mononucleares do sangue periférico, frações de células brancas do sangue total, concentrado de hemácias, sangue irradiado, células dendríticas, monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos, células *natural killer* e células T *natural killer*.

32. Processo, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que a população não foi submetida às condições de ativação.

33. Método para a produção de linfócitos sensibilizados por Gag, caracterizado pelo fato de que os métodos compreendem o contato de uma população de linfócitos, ou de seus precursores, com uma célula apresentadora de antígeno Gag-específica produzida pelo processo da reivindicação 22 por um período e sob condições suficientes para sensibilizar os linfócitos para que respondam ao polipeptídeo Gag.

34. Método para o tratamento ou a prevenção de uma infecção por lentivírus em um indivíduo, o método caracterizado por compreender a administração ao indivíduo de um modulador imune selecionado de: (1) células apresentadoras de antígeno ou precursores da célula apresentadora de antígeno, que foram colocadas em contato com uma composição que consiste basicamente em diversos peptídeos por um período e sob condições suficientes para que os peptídeos, ou formas processadas dos peptídeos, sejam apresentados pelas células apresentadoras de antígeno ou pelos precursores em sua superfície, em que os peptídeos individuais da composição compreendem porções diferentes de uma seqüência de aminoácidos que correspondem a um polipeptídeo Gag e, opcionalmente, exibem identidade ou

similaridade de seqüência parcial para pelo menos outro peptídeo dos diversos peptídeos; e (2) uma composição que consiste basicamente em diversos peptídeos, em que os peptídeos individuais compreendem porções diferentes de uma seqüência de aminoácidos que correspondem a um polipeptídeo Gag e, opcionalmente, exibem identidade ou similaridade de seqüência parcial para pelo menos outro peptídeo dos diversos peptídeos; e (3) uma população de linfócitos, ou seus precursores, que foi colocada em contato com células apresentadoras de antígeno de acordo com (1) por um período e sob condições suficientes para sensibilizar os linfócitos para que respondam a um polipeptídeo Gag,

em que o modulador imune é administrado em uma quantidade que é eficaz para tratar ou evitar a infecção por lentivírus.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o modulador imune é administrado sistemicamente.

36. Método, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o modulador imune é administrado por injeção.

37. Método para o tratamento ou a prevenção de uma doença de imunodeficiência adquirida em um indivíduo, o método caracterizado por compreender a administração ao indivíduo de um modulador imune selecionado de: (1) células apresentadoras de antígeno ou precursores da célula apresentadora de antígeno, que foram colocadas em contato com uma composição que consiste basicamente em diversos peptídeos por um período e sob condições suficientes para que os peptídeos, ou as formas processadas dos peptídeos,

sejam apresentados pelas células apresentadoras de antígeno ou pelos precursores em sua superfície, em que os peptídeos individuais da composição compreendem porções diferentes de uma seqüência de aminoácidos que correspondem a um polipeptídeo Gag e, opcionalmente, exibem identidade ou similaridade de seqüência parcial para pelo menos outro peptídeo dos diversos peptídeos; e (2) uma composição que consiste basicamente em diversos peptídeos, em que os peptídeos individuais compreendem porções diferentes de uma seqüência de aminoácidos que correspondem a um polipeptídeo Gag e, opcionalmente, exibem identidade ou similaridade de seqüência parcial para pelo menos outro peptídeo dos diversos peptídeos; e (3) uma população de linfócitos, ou seus precursores, que foi colocada em contato com células apresentadoras de antígeno de acordo com (1) por um período e sob condições suficientes para sensibilizar os linfócitos para que respondam a um polipeptídeo Gag,

em que o modulador imune é administrado em uma quantidade que é eficaz para tratar ou evitar a doença.

38. Uso de um modulador imune, caracterizado por ser selecionado a partir de: (1) células apresentadoras de antígeno ou precursores da célula apresentadora de antígeno, que foram colocadas em contato com uma composição que consiste basicamente em diversos peptídeos por um período e sob condições suficientes para que os peptídeos, ou as formas processadas dos peptídeos, sejam apresentados pelas células apresentadoras de antígeno ou pelos precursores em sua superfície, em que os peptídeos individuais da composição compreendem porções diferentes de uma seqüência de aminoácidos que correspondem a um

polipeptídeo Gag e, opcionalmente, exibem identidade ou similaridade de seqüência parcial para pelo menos outro peptídeo dos diversos peptídeos; e (2) uma composição que consiste basicamente em diversos peptídeos, em que os peptídeos individuais compreendem porções diferentes de uma seqüência de aminoácidos que correspondem a um polipeptídeo Gag e, opcionalmente, exibem identidade ou similaridade de seqüência parcial para pelo menos outro peptídeo dos diversos peptídeos; e (3) uma população de linfócitos, ou seus precursores, que foi colocada em contato com células apresentadoras de antígeno de acordo com (1) por um período e sob condições suficientes para sensibilizar os linfócitos para que respondam a um polipeptídeo Gag, para o tratamento ou a prevenção de uma condição selecionada de uma infecção por lentivírus e uma doença de imunodeficiência adquirida.

39. Composição caracterizada por consistir essencialmente em células apresentadoras de antígeno ou precursores da célula apresentadora de antígeno que foram colocadas em contato com uma composição que consiste basicamente em diversos peptídeos por um período e sob condições suficientes para que os peptídeos, ou as formas processadas dos peptídeos, sejam apresentados pelas células apresentadoras de antígeno ou pelos precursores em sua superfície, em que os peptídeos individuais da composição compreendem porções diferentes de uma seqüência de aminoácidos que correspondem a um polipeptídeo Gag e, opcionalmente, exibem identidade ou similaridade de seqüência parcial para pelo menos outro peptídeo dos diversos peptídeos.

40. Composição, de acordo com a reivindicação 39,

caracterizada pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno ou precursores da célula apresentadora de antígeno estão na forma de uma população substancialmente purificada de células apresentadoras de antígeno ou precursores.

41. Composição, de acordo com a reivindicação 39, caracterizada pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno ou precursores da célula apresentadora de antígeno estão na forma de uma população heterogênea de células apresentadoras de antígeno ou precursores.

42. Composição, de acordo com a reivindicação 41, caracterizada pelo fato de que a população heterogênea de células apresentadoras de antígeno ou seus precursores é selecionada de sangue e células mononucleares do sangue periférico.

43. Composição, de acordo com a reivindicação 39, caracterizada pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno ou seus precursores são selecionadas de monócitos, macrófagos, células da linhagem mielóide, células B, células dendríticas ou células de Langerhans.

44. Composição, de acordo com a reivindicação 39, caracterizada pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno ou seus precursores estão na forma de uma população não cultivada de células apresentadoras de antígeno ou seus precursores.

45. Composição, de acordo com a reivindicação 44, caracterizada pelo fato de que a população é homogênea.

46. Composição, de acordo com a reivindicação 44, caracterizada pelo fato de que a população é heterogênea.

47. Composição, de acordo com a reivindicação 44, caracterizada pelo fato de que a população é selecionada de

sangue total, sangue fresco ou frações deste, células mononucleares do sangue periférico, frações de células brancas do sangue total, concentrado de hemácias, sangue irradiado, células dendríticas, monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos, células *natural killer* e células T *natural killer*.

48. Composição, de acordo com a reivindicação 44, caracterizada pelo fato de que a população não foi submetida às condições de ativação.

49. Composição, de acordo com a reivindicação 39, caracterizada por excluir células apresentadoras de antígeno que apresentam em sua superfície peptídeos que compreendem seqüências de aminoácidos que correspondem às porções de polipeptídeos não-Gag.

50. Composição caracterizada pelo fato de que consiste basicamente em diversos peptídeos, em que os peptídeos individuais compreendem porções diferentes de uma seqüência de aminoácidos que correspondem a um polipeptídeo Gag e, opcionalmente, exibem identidade ou similaridade de seqüência parcial para pelo menos outro peptídeo dos diversos peptídeos.

51. Composição, de acordo com a reivindicação 50, caracterizada pelo fato de que os peptídeos estão contidos ou de algum outro modo associados a uma partícula.

52. Composição, de acordo com a reivindicação 51, caracterizada pelo fato de que a partícula é selecionada de lipossomos, micelas, partículas lipídicas, partículas cerâmicas/inorgânicas e partículas poliméricas.

53. Composição, de acordo com a reivindicação 50, caracterizada por compreender ainda células apresentadoras

de antígeno ou precursores da célula apresentadora de antígeno.

54. Composição, de acordo com a reivindicação 53, caracterizada pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno ou precursores da célula apresentadora de antígeno estão na forma de uma população substancialmente purificada de células apresentadoras de antígeno ou precursores.

55. Composição, de acordo com a reivindicação 53, caracterizada pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno ou precursores da célula apresentadora de antígeno estão na forma de uma população heterogênea de células apresentadoras de antígeno ou seus precursores.

56. Composição, de acordo com a reivindicação 55, caracterizada pelo fato de que a população heterogênea de células apresentadoras de antígeno ou precursores é selecionada de sangue e células mononucleares do sangue periférico.

57. Composição, de acordo com a reivindicação 53, caracterizada pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno ou seus precursores são selecionadas de monócitos, macrófagos, células da linhagem mielóide, células B, células dendríticas ou células de Langerhans.

58. Composição, de acordo com a reivindicação 53, caracterizada pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno ou seus precursores estão na forma de uma população não cultivada de células apresentadoras de antígeno ou seus precursores.

59. Composição, de acordo com a reivindicação 58, caracterizada pelo fato de que a população é homogênea.

60. Composição, de acordo com a reivindicação 58,

caracterizada pelo fato de que a população é heterogênea.

61. Composição, de acordo com a reivindicação 60, caracterizada pelo fato de que a população é selecionada de sangue total, sangue fresco ou frações deste, células mononucleares do sangue periférico, frações de células brancas do sangue total, concentrado de hemácias, sangue irradiado, células dendríticas, monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos, células *natural killer* e células T *natural killer*.

62. Composição, de acordo com a reivindicação 58, caracterizada pelo fato de que a população não foi submetida às condições de ativação.

63. Composição, de acordo com a reivindicação 51, caracterizada por excluir células apresentadoras de antígeno que apresentam em sua superfície peptídeos que compreendem seqüências de aminoácidos que correspondem às porções de polipeptídeos não-Gag.

64. Composição, de acordo com a reivindicação 50, caracterizada por excluir um peptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma porção de um polipeptídeo não-Gag de lentivírus.

65. Uso de uma Composição da reivindicação 39 ou reivindicação 50 caracterizado pelo fato de ser para o tratamento ou a prevenção de uma condição selecionada de uma infecção por lentivírus e uma doença de imunodeficiência adquirida.

66. Uso de uma Composição da reivindicação 39 ou reivindicação 50 caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento ou a prevenção de uma condição selecionada de uma infecção por

lentivírus e uma doença de imunodeficiência adquirida.

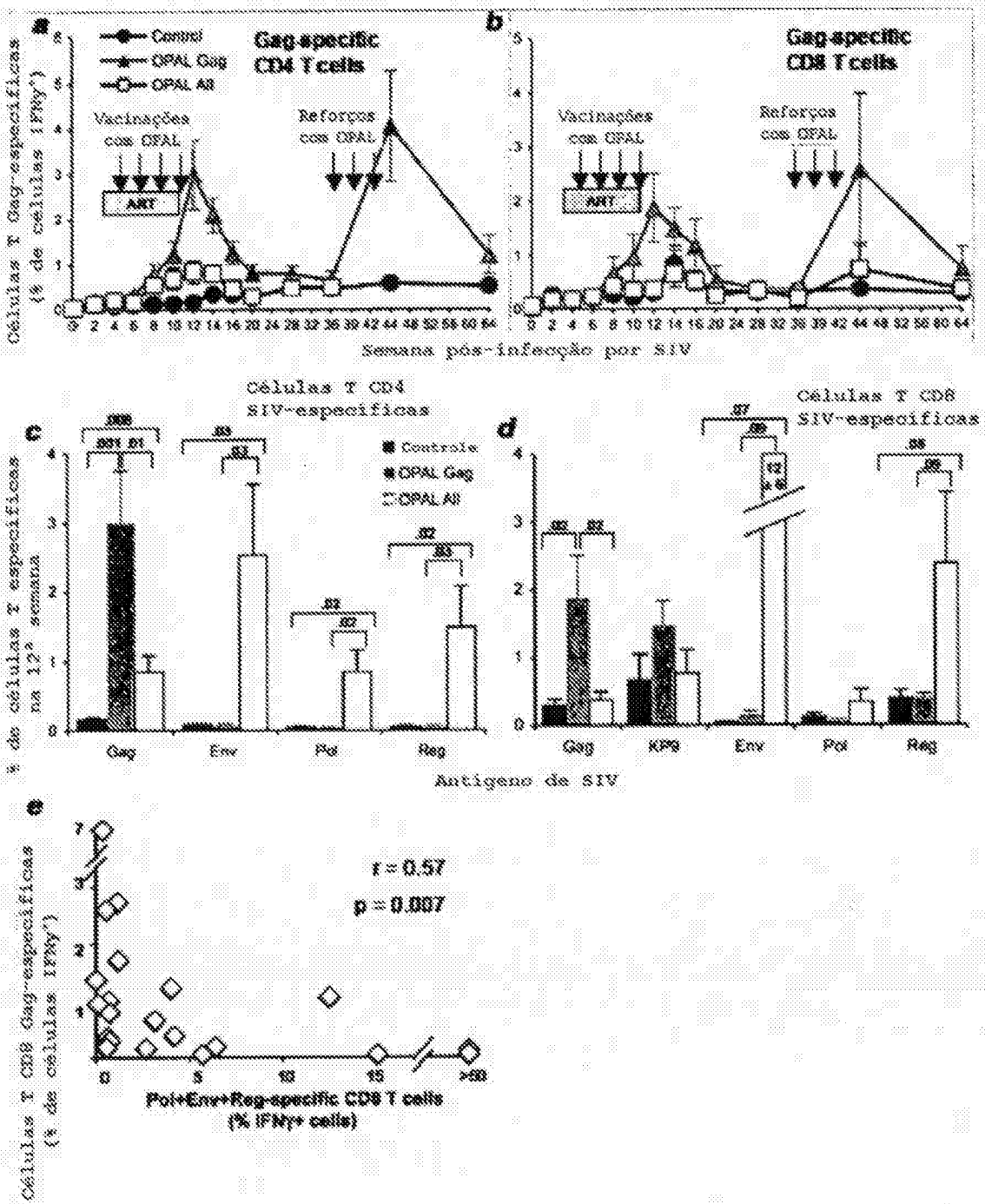

a
Gag-specific CD4 T cells
Control
OPAL Gag
OPAL All
Vacinações com OPAL
Reforços com OPAL
ART
b
Gag-specific CD8 T cells
Células T Gag-específicas (% de células IFNγ+)
Semana pós-infecção por SIV
c
Células T CD4 SIV-específicas
Controle
OPAL Gag
OPAL All
Gag
Env
Pol
Reg
d
Células T CD8 SIV-específicas
Gag
KP9
Env
Pol
Reg
% de células T específicas na 12ª semana
Antígeno de SIV
e
r = 0.57
p = 0.007
Pol+Env+Reg-specific CD8 T cells (% IFNγ+ cells)
Células T CD8 Gag-específicas (% de células IFNγ+)

FIGURA 1

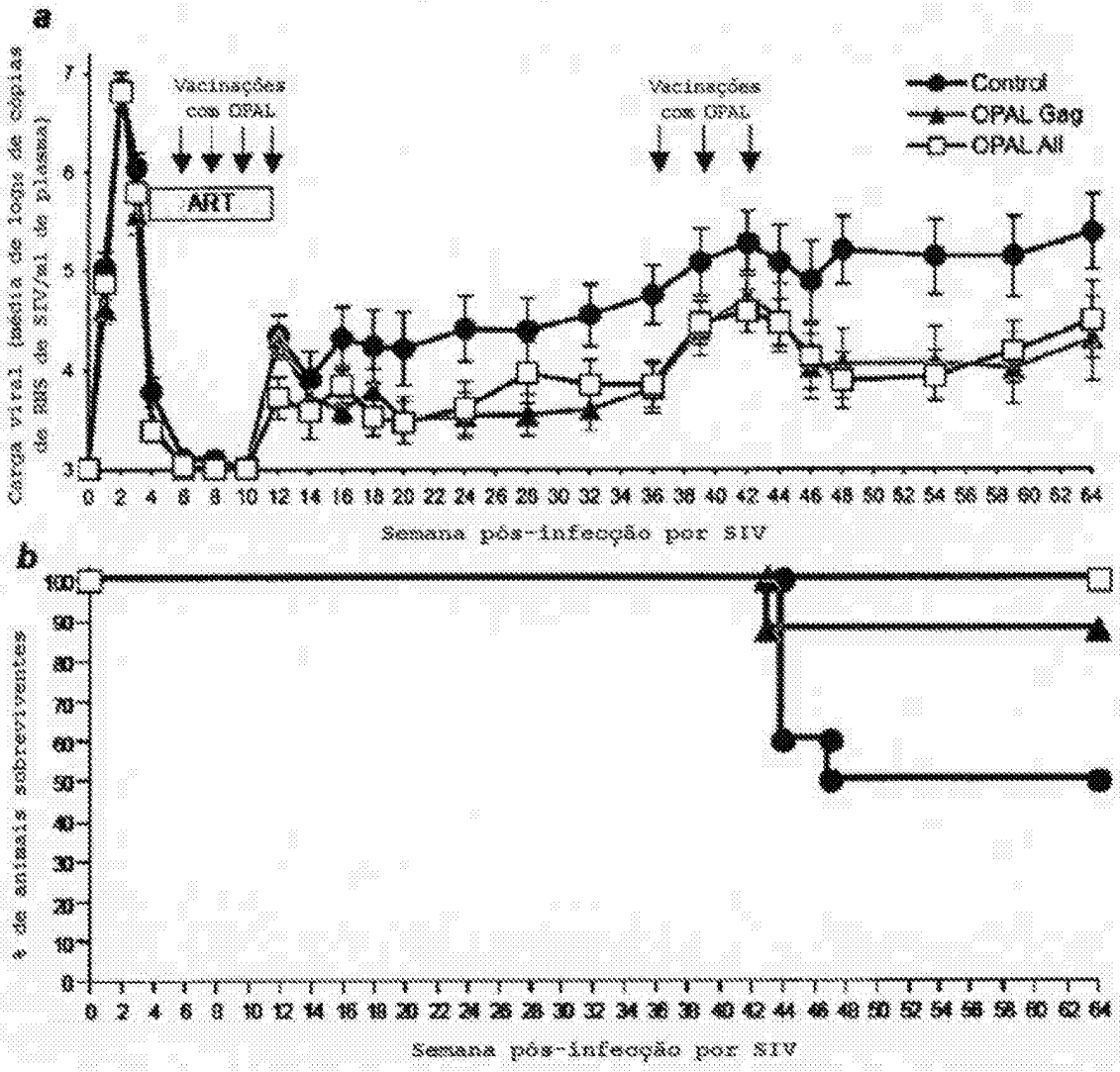

a
Carga viral (média de logs de cópias de RNA de SIV/ml de plasma)
Vacinações com OPAL
ART
Vacinações com OPAL
Control
OPAL Gag
OPAL All
Semana pós-infecção por SIV
b
% de animais sobreviventes
Semana pós-infecção por SIV

FIGURA 2

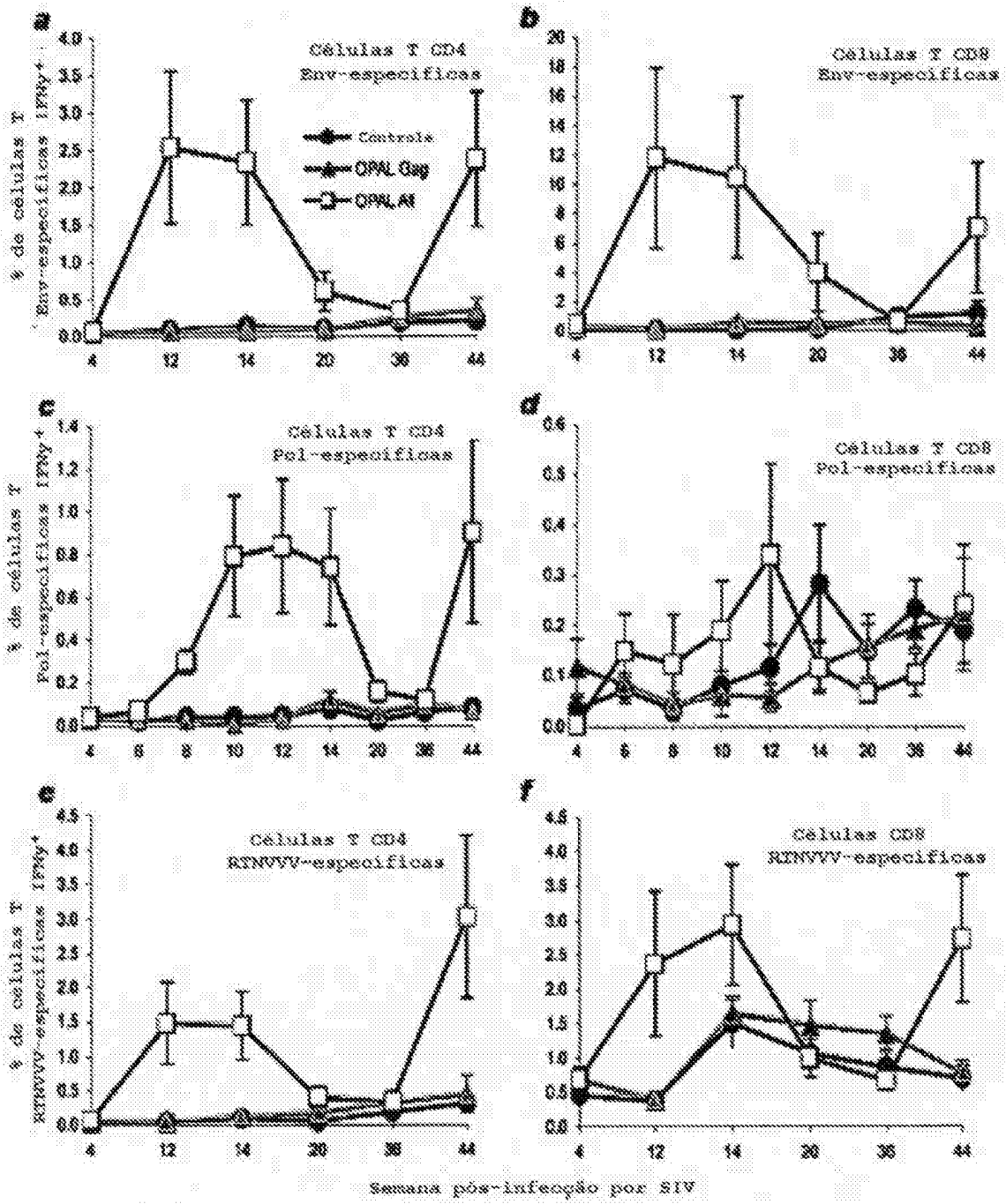

a
Células T CD4
Env-específicas
Controle
OPAL Gag
OPAL-NI
% de células T
Env-específicas IFNγ+
b
Células T CD8
Env-específicas
c
Células T CD4
Pol-específicas
% de células T
Pol-específicas IFNγ+
d
Células T CD8
Pol-específicas
e
Células T CD4
RINVVV-específicas
% de células T
RINVVV-específicas IFNγ+
f
Células CD8
RINVVV-específicas
Semana pós-infecção por SIV

FIGURA 3

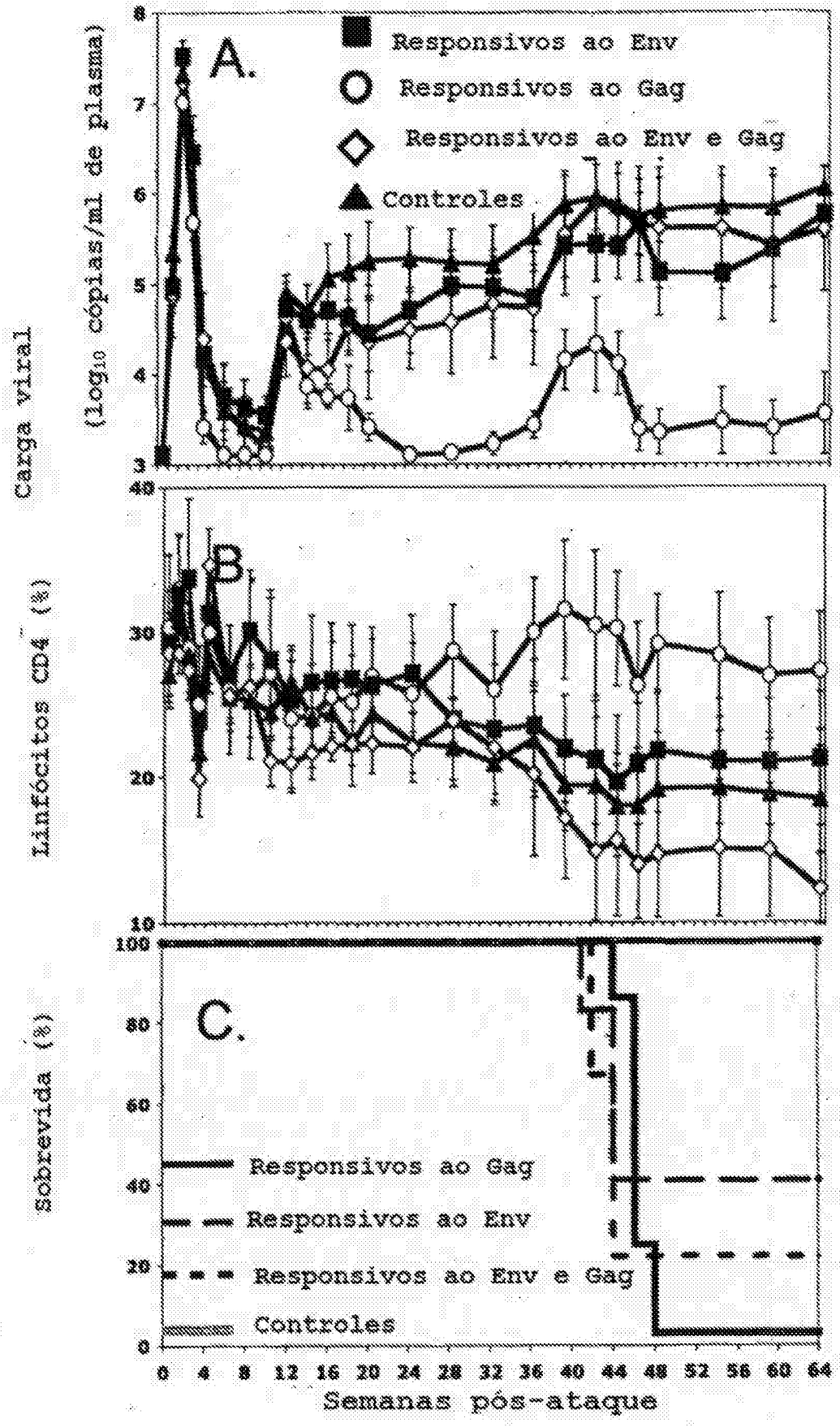

A.
Responsivos ao Env
Responsivos ao Gag
Responsivos ao Env e Gag
Controles
Carga viral
(log10 cópias/ml de plasma)
8
7
6
5
4
3
B.
Linfócitos CD4+ (%)
40
30
20
10
C.
Sobrevida (%)
100
80
60
40
20
0
Responsivos ao Gag
Responsivos ao Env
Responsivos ao Env e Gag
Controles
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60 64
Semanas pós-ataque

FIGURA 4

RESUMO

COMPOSIÇÕES IMUNOMODULADORAS E USOS DESTAS

Esta invenção revela composições que consistem basicamente em um polipeptídeo Gag ou pelo menos uma porção deste e, opcionalmente, células apresentadoras de antígeno ou seus precursores, para o tratamento ou a prevenção de infecções lentivirais, incluindo o tratamento ou prevenção de doenças de imunodeficiência adquirida relacionadas. Em certas modalidades, as composições consistem basicamente em diversos peptídeos superpostos e/ou não superpostos derivados de um único polipeptídeo Gag ou de polipeptídeos Gag diferentes.