



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0520330-9 B1

(22) Data do Depósito: 08/06/2005

(45) Data de Concessão: 24/04/2018



(54) Título: ADJUVANTE A BASE DE ÁCIDO POLINOSÍNICO-POLICITIDÍLICO

(51) Int.Cl.: A61K 39/39

(73) Titular(es): YISHENG BIOPHARMA (SINGAPORE) PTE LTD

(72) Inventor(es): HAIXIANG LIN

ADJUVANTE A BASE DE ÁCIDO POLINOSÍNICO-POLICITIDÍLICO. CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se de forma geral a composições adjuvantes e seus métodos de uso para o aumento da resposta imunológica, mais especificamente a compostos, vacinas e métodos para aumentar a imunogenicidade de um antígeno, e mais especificamente a composições adjuvantes polinucleotídicas, vacinas que compreendem as composições adjuvantes polinucleotídicas e métodos de uso das referidas composições adjuvantes polinucleotídicas e vacinas para aumentar a resposta imunológica em um hospedeiro.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

1. Descrição da técnica correspondente.

O sistema imunológico pode apresentar tanto imunidade específica como não específica. Geralmente, os linfócitos B e T, os quais apresentam receptores específicos em suas superfícies celulares para um determinado antígeno, produzem imunidade específica. O sistema imunológico pode responder a diferentes antígenos em duas formas: 1) imunidade humoral, que inclui a estimulação das células B e a produção de anticorpos ou imunoglobulinas, as células apresentadoras de antígenos (APCs), e as células auxiliaadoras T (Th1 e Th2), e 2) imunidade mediada por células (CMI), que geralmente envolve as células T, incluindo os linfócitos T citotóxicos (CTLs), embora outras células também estejam envolvidas na geração de uma resposta CTL (por exemplo, células Th1 e/ou Th2 e APCs).

A imunidade não específica engloba várias células e mecanismos como a fagocitose (engolfamento de partículas estranhas ou antígenos) por macrófagos ou granulócitos, e a atividade da célula exterminadora natural (NK), entre outros. A imunidade não específica baseia-se em mecanismos menos avançados em termos evolutivos e não apresenta a natureza adquirida da especificidade e memória, que são marcas exemplares de uma resposta imunológica específica. As principais diferenças entre a imunidade específica

e a não específica estão baseadas na especificidade das células B e T. Essas células predominantemente adquirem sua responsividade após a ativação com um antígeno específico e possuem mecanismos para exibir uma memória no caso de uma futura exposição a esse antígeno específico. Conseqüentemente, a vacinação (envolvendo a especificidade e a memória) é um protocolo eficaz na proteção contra patógenos prejudiciais.

Os adjuvantes geralmente são compostos que, quando administrados com um antígeno (ou a ele misturados, ou fornecidos antes da administração do antígeno) melhoram ou modificam a resposta imunológica a esse antígeno específico.

Adjuvantes exemplares que foram usados para aumentar a resposta imunológica incluem compostos de alumínio (todos geralmente referidos como "Alum"), emulsões de óleo em água (o adjuvante completo de Freund (CFA) é uma emulsão de óleo em água que contém organismos Mycobacterium Tuberculosis secos mortos a quente), Saponina (isolada do córtex de Quillaja Saponaria, adjuvante do princípio ativo conhecido como Quile A), CpG ODN (oligodesoxinucleotídeos sintéticos contendo dinucleotídeos CpG não metilados), MPL (derivado de lipopolissacarídeo da Salmonella Minnesota Re595), Lipossomas (normalmente obtidos de materiais biodegradáveis como fosfolipídeos) e microsferas de polímeros biodegradáveis (obtidas de uma série de polímeros como PLGA, polifosfazeno e polianidridos). As propriedades do adjuvante desses compostos foram avaliadas, sendo apresentadas as vantagens e desvantagens de cada adjuvante.

O maior problema relacionado ao uso de adjuvantes para vacinas humanas, especificamente vacinas infantis de rotina, é a toxicidade e os efeitos colaterais adversos da maioria das formulações dos adjuvantes. A aplicação de novas tecnologias no desenvolvimento de vacina conduz a antígenos sintéticos, purificados e de subunidade, que tendem a apresentar baixa imunogenicidade. O desenvolvimento de novos adjuvantes, para

aumentar a imunogenicidade/eficácia e reduzir os efeitos colaterais, apresenta um dos maiores desafios da pesquisa e desenvolvimento de vacina.

Os complexos polinucleotídicos foram investigados quanto às suas várias aplicações, incluindo sua ação como adjuvantes. Os RNAs de duplo
5 filamento (dsRNAs) são modificadores biológicos muito potentes que podem exercer profunda influência sobre as células em concentrações nanomolares. Os efeitos da modulação dos dsRNA incluem um amplo espectro de ações em níveis celulares e moleculares.

Em nível molecular, os dsRNAs podem apresentar efeitos
10 biológicos como a síntese do interferon, indução da proteína quinase, aumento do antígeno da histocompatibilidade e inibição do metabolismo. E, em nível celular, os dsRNA podem apresentar efeitos biológicos como a pirogenicidade, mitogenicidade, ativação do macrófago, ativação da imunidade mediada por células e indução do estado antiviral. Um potencial
15 promissor dos dsRNAs é o seu efeito imunomodulador em terapias antimicrobianas. A patente U.S. 4.124.702 relata que os polinucleotídeos de duplo filamento provocaram a indução do interferon em células de animais vivos. A patente U.S. 3.906.092 relata que a resposta de anticorpos à vacina tipo adjuvante aumentou pela incorporação de um polinucleotídeo ou um
20 complexo de polinucleotídeos à vacina. Houston et al. estabeleceram o PICLC (complexo poli-L-lisina carboxi-metilcelulose do ácido polinosínico-policidílico) como um potente adjuvante aumentando a resposta primária do anticorpo sem o auxílio de um adjuvante adicional. Houston et al., *Infection and Immunity*, 14: 318-9, 1976C. Descobriu-se que o dsRNA micoviral
25 aumenta significativamente a resposta de anticorpos hemaglutinantes para eritrócitos de carneiro (sRBC). Wright and Adler-Moore, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 131: 949-45, 1985.

Entretanto, o PIC (ácido polinosínico-policidílico) manifesta grave toxicidade quando usado em animais. Por exemplo, Phillips et al. relataram
30 que manifestações tóxicas graves foram observadas em cães mediante a

administração subcrônica do PIC à dose de 2,0 mg/kg. A toxicidade se caracterizou pela diminuição da atividade espontânea, baixa coordenação, vômito, anorexia, perda de peso, alterações hematológicas refletindo na diminuição da hematopoiese, aumento da fosfatase alcalina e das atividades da transaminase, degeneração do timo, destruição da medula óssea, dilatação dos capilares sinusoidais hepáticos em áreas centrolobulares, necrose das células hepáticas, colapso das estruturas hepáticas e artrite generalizada. Vide Phillips et al., Toxicologia e Farmacologia Aplicada;⁴18: 220- 30, 1971.

O PIC, um dos complexos polinucleotídicos mais estudados, não se mostrou eficiente quando usado em macacos e humanos devido à sua instabilidade no corpo após a administração. Assim sendo, o PIC foi modificado de diversas formas para resolver uma ou outra deficiência. Por exemplo, um complexo de ácido poliriboinosínico – poliribocitidílico com poli-L-lisina hidrobrometo é aproximadamente 5 a 15 vezes mais resistente à hidrólise pela ribonuclease pancreática que o PIC original. Outro exemplo é o poli-ICLC de dsRNA, ou PICLC, para resumir, que se mostrou altamente eficiente como um agente antitumoral ou antiviral. O PICLC é um dsRNA sintético composto de filamentos de ácido poliriboinosínico e poliribocitidílico (PIC). Embora o PICLC seja um imunomodulador promissor que possui grande potencial nas terapias antimicrobianas e anticancerígenas, comprovou-se que ele produz sérios efeitos colaterais em humanos, especialmente quando o medicamento é administrado em elevadas doses múltiplas. Alguns dos efeitos colaterais relatados incluem febre, hipotensão, leucopenia, mialgia, trombocitopenia e poliartalgia. O problema inerente à toxicidade deverá ser resolvido para que um PICLC seguro para uso em humanos possa ser oferecido. Além disso, a eficácia terapêutica de poli-ICLC é limitada por sua estabilidade *in vivo*.

Um medicamento antiviral composto de ácido polinosínico-policitidílico (Poli I:C), canamicina e cálcio (Av-PICKCa) é usado no tratamento de infecções viróticas. O Av-PICKCa demonstrou ser capaz de

induzir a produção de interferon e interleucina-2. O Av-PICKCa administrado isolado como um medicamento antiviral estimula uma resposta imunológica inespecífica, ou seja, estimula uma forma de interferon que não é específica a nenhum antígeno em particular. Esta resposta antiviral é totalmente diferente da resposta imunológica do antígeno específico gerado quando um adjuvante é administrado em conjunto com um antígeno.

Mais vantajosamente, o inventor da presente invenção descobriu que o Av-PICKCa possui propriedades de um adjuvante, ou seja, a habilidade de gerar uma resposta imunológica específica quando administrado com um antígeno. Além disso, o inventor também descobriu que o Av-PICKCa é um adjuvante eficaz quando usado em conjunto com antígenos da febre hemorrágica e da hidrofobia.

Lin et al. descreveram que o Av-PICKCa pode ser usado como um adjuvante (Lin et al., Novo Complexo Imunoestimulatório (PICKCa) em Hidrofobia Experimental: Efeitos de Adjuvantes e Antivirais, Arch Virol, 131: 307-19, 1993; e Patente Chinesa Nº 93105862.7). A Patente Chinesa Nº 93105862.7 refere-se ao uso de uma composição geral de Poli I:C, canamicina e cálcio (PICKCa) como adjuvante na vacina para humanos e aplicação em mamíferos.

As amostras de Av-PICKCa são heterogêneas com relação à dimensão e peso das moléculas. O Av-PICKCa é descrito na literatura em termos de valores médios ou faixas dos coeficientes de sedimentação, conforme medidos por Svedbergs S. O Av-PICKCa de medicamento antiviral existe em uma configuração de 5S a 8S (Fonte A); vide Zhung J.C., Memória de Pesquisa do Ácido polinosínico - Policidílico (PIC), Registro da 5ª Conferência Chinesa sobre Teoria e Aplicação Clínica de Interferon, Siam 1985, pp23-28. Em outras configurações, o Av-PICKCa é apresentado com um coeficiente de sedimentação de 4S a 12S com uma média de 6S (Fonte B) ou 5S a 12S com uma média de 7S (Fonte C) ou 8S a 10S (Fonte D): vide Hu Q.G., Tianjin Aplicação Clínica e Pesquisa Laboratorial de Av-PICKCa,

Fujian Medical Journal, 1983.12; (6): 28-30 e Hu Q.G. Revista da Indústria Farmacêutica e Médica Chinesa, 1983 (9) 3134.

O coeficiente de sedimentação deste conjunto heterogêneo de moléculas em Av-PICKCa pode ser convertido em peso molecular equivalente (mw em Daltons) usando a fórmula de conversão $mw = 1,100 \times S^{2.2}$ (vide Su B.X. et al; Introdução à Tecnologia Bioquímica, Primeira Edição, Zhongshan University, 1978, 356-357). Os resultados da conversão em Daltons são apresentados na tabela a seguir:

Tabela A						
Características de Av-PICKCa						
Fonte de Av-PICKCa	Coeficiente de Sedimentação em S			Peso Molecular em Daltons		
	Mín.	Máx.	Médio	Mín.	Máx.	Médio
A	5	8	*	38.000	107.000	*
B	4	12	6	23.000	260.000	57.000
C	5	12	7	38.000	260.000	59.000
D	8	10	*	107.000	174.000	*

(*) dados não citados na referência.

10 A pesquisa original sobre Av-PICKCa como um adjuvante foi feita por Lin et al, com uma amostra cujas moléculas apresentavam características similares à da Fonte A, ou seja, um coeficiente de sedimentação de 5S a 8S, que é o peso molecular equivalente de moléculas que variam de 38.000 a 107.000 Daltons. (vide Lin et al., acima).

15 Todas as formas de PICKCa são consideradas igualmente seguras e eficazes, dado que o Av-PICKCa é essencialmente uma forma de PICKCa e também o uso histórico de Av-PICKCa como um medicamento antiviral. Entretanto, isso comprovou não ser o caso. Uma pesquisa conduzida pelo inventor demonstrou que a eficácia e a toxicidade de PICKCa, quando usado
20 como adjuvante em combinação com um antígeno, realmente variam de acordo com os diferentes pesos moleculares. O inventor descobriu que o Av-PICKCa não oferece o perfil de eficácia/segurança ideal para uso como adjuvante e que o PICKCa não provoca efeitos colaterais inaceitáveis sob determinadas condições. Portanto, permanece a necessidade de um adjuvante

que seja mais apropriado para o uso humano e que seja seguro e eficaz no fornecimento de efeito imunogênico desejado. A presente invenção aborda essa necessidade e oferece outras vantagens que ficarão evidentes referindo-se à descrição detalhada.

5

LITERATURA

As seguintes referências poderão ser interessantes:

- JP 1093540A2;
- Patente U.S. 4.124.702
- Patente U.S. 3.692.899
- 10 • Patente U.S. 3.906.092
- Patente U.S. 4.389.395
- Patente U.S. 4.349.538
- Patente U.S. 4.024.241
- Patente U.S. 3.952.097
- 15 • Houston et al., Infecção e Imunidade, 14: 318-9, 1976C
- Wright e Adler-Moore, Comunicações em Pesquisa Bioquímica e Biofísica, 131: 949-45, 1985
- Phillips et al., Toxicologia e Farmacologia Aplicada, 18 : 220-30, 1971
- 20 • Lin, et al., Novo complexo imunoestimulatório (PICKCa) em raivas experimentais: efeitos de adjuvantes e antivirais, Arch Virol, 131: 307-19, 1993
- Patente chinesa 93105862.7
- Zhung J.C., Memória de Pesquisa do Ácido Polinosínico - Policitidílico (PIC). Registro da 5ª Conferência Chinesa sobre
- 25 Teoria e Aplicação Clínica de Interferon, Siam 1985, pp23-28
- Hu Q.G., Tianjin Aplicação Clínica e Pesquisa Laboratorial de Av-PICKCa, Fujian Medical Journal, 1983.12; (6): 28-30
- Hu Q.G. Revista da Indústria Farmacêutica e Médica Chinesa,
- 30 1983 (9) 3134.

- Su B.X. et al; Introdução à Tecnologia Bioquímica, Primeira Edição, Zhongshan University, 1978, 356-357
- Gupta R.K. et al., Adjuvantes – Equilíbrio entre Toxicidade e Adjuvanticidade, *Vaccine*, 11:293-306, 1993
- 5 • Arnon, R. (Ed.) *Vacinas Sintéticas* 1:83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1987
- Sela, M., *Science* 166:1365-1374 (1969)
- Patente U.S. 6.008.200
- 10 • Ellouz et al., *Comunicações em Pesquisa Bioquímica e Biofísica*, 59:1317, 1974
- Patente U.S. 4.094.971
- Patente U.S. 4.101.536
- Patente U.S. 4.153.684
- Patente U.S. 4.235.771
- 15 • Patente U.S. 4.323.559
- Patente U.S. 4.327.085
- Patente U.S. 4.185.089
- Patente U.S. 4.082.736
- Patente U.S. 4.369.178
- 20 • Patente U.S. 4.314.998
- Patente U.S. 4.082.735
- Patente U.S. 4.186.194
- Patente U.S. 6.468.558
- 25 • *Novas Tendências e Desenvolvimentos em Vacinas*, editado por Voller et al., University Park Press, Baltimore, Md., USA, 1978
- Klein, J., et al., *Imunologia* (2^a), Blackwell Science Inc., Boston (1997)
- Gupta R.K. e Siber G.R., Adjuvantes para vacinas humanas — condições atuais, problemas e perspectivas futuras, *Vacina*, 13
- 30 (14): 1263-1276, 1995

- Richard T Kenney et al. Relatório de Reunião – 2º Encontro sobre Novos adjuvantes atualmente em / praticamente em teste clínico em humanos, Vacina 20 2155-2163, 2002
- Técnicas Laboratoriais em Raivas, Editado por F X Meslin, M M Kaplan, H Koprowski 4ª Edição ISBN 92 4 1544 1

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma composição adjuvante polinucleotídica e métodos de uso para a obtenção de uma resposta imunológica. A presente invenção refere-se ainda a uma composição imunogênica que compreende uma composição adjuvante polinucleotídica em conjunto com um antígeno (por exemplo, na forma de uma vacina). As composições adjuvantes da invenção possuem propriedades físicas específicas (por exemplo, peso molecular, dimensão, concentração e pH) que abordam a necessidade de um adjuvante seguro e eficaz para obter uma maior resposta imunológica. A presente invenção também contempla métodos de uso das referidas composições adjuvantes, especificamente na obtenção de uma resposta imunológica a um composto antigênico.

Em uma configuração, a invenção refere-se a uma composição adjuvante polinucleotídica que compreende o ácido poliriboinosínico - poliribocitidílico (PIC), um antibiótico e um íon positivo, caracterizado pelo fato de que o antibiótico pode ser a canamicina e o íon positivo pode ser um íon bivalente como o cálcio. A presente invenção refere-se ainda a uma composição imunogênica que compreende uma composição adjuvante polinucleotídica em conjunto com um antígeno ou vacina.

A presente invenção serve para aumentar o corpo de conhecimento pela definição de uma composição inovadora que poderá ser usada com segurança e eficácia como um adjuvante para aumentar e/ou modificar a resposta imunológica em um hospedeiro humano ou animal. Enquanto as revelações anteriores demonstram a aplicação do medicamento antiviral Av-PICKCa para uso como um adjuvante, observou-se que essa forma de

PICKCa apresenta apenas uma limitada resposta imunológica específica, quando administrada com um antígeno. Além disso, descobriu-se que PICKCa apresenta efeitos colaterais adversos inaceitáveis sob determinadas condições.

5 A presente invenção aborda esses problemas oferecendo uma composição adjuvante, geralmente aqui referida como "PIKA", que pode ser administrada de forma mais segura e eficaz como um adjuvante em animais, incluindo humanos.

10 PIKA é uma composição que compreende um polinucleotídeo, um antibiótico e um íon positivo que foi especificamente desenvolvida como um adjuvante. Estão incluídas nesta invenção as composições que possuem um atributo exclusivo que as tornam mais apropriadas para uso como adjuvante em uma composição imunogênica a ser administrada em animais e/ou humanos.

15 Mais especificamente, a presente invenção refere-se à composição adjuvante polinucleotídica que compreende um polinucleotídeo, um antibiótico e um íon positivo, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo pode ser ácido poliriboinosínico - poliribocitídílico (PIC); o antibiótico é canamicina, antraciclina, sulfato de butirosina, gentamicina, higromicina, 20 ampicacina, dibecacina, nebramicina, metrizamida, neomicina, puromicina, estreptomomicina ou estreptozocina; e o íon é cálcio, cádmio, lítio, magnésio, cério, césio, cromo, cobalto, deutério, gálio, iodo, ferro ou zinco.

25 Mais especificamente, a presente invenção apresenta a especificação, incluindo o peso molecular, a concentração e o pH da composição, que compreende um polinucleotídeo, um antibiótico e um íon positivo, a qual aborda a necessidade de um adjuvante seguro que ofereça uma máxima resposta imunológica desejada.

30 A presente invenção refere-se ainda a uma composição imunogênica que compreende a composição adjuvante polinucleotídica e um antígeno ou vacina.

Em determinadas configurações, a presente invenção refere-se a um kit que compreende um adjuvante polinucleotídico e um composto imunogênico.

Além disso, a presente invenção apresenta um método para
5 aumentar a resposta imunológica a um composto antigênico, mediante a administração da composição imunogênica em um hospedeiro. O hospedeiro pode ser um humano ou animal. A administração pode ser feita por injeção intramuscular, intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea, ou por inalação. Em outras configurações, a composição imunogênica pode ser aplicada por
10 via retal, vaginal, nasal, oral, oftálmica, tópica, transdérmica ou intradérmica.

De forma correspondente, a presente invenção apresenta um adjuvante e uma composição imunogênica que pode ser usada com segurança em humanos e animais.

De forma correspondente, em um aspecto, a invenção apresenta uma
15 composição adjuvante polinucleotídica, que compreende um ácido poliribonucleotídico - poliribocitidílico (PIC), um antibiótico e um íon positivo, caracterizada pelo fato de que a composição contém moléculas de adjuvante heterogêneas com peso molecular aproximadamente de 66.000 a 1.200.000 Daltons.

Nas configurações relacionadas, as moléculas da composição adjuvante polinucleotídica são heterogêneas quanto ao peso molecular, que é aproximadamente de 300.000 a 1.200.000 Daltons, ou aproximadamente de 66.000 a 660.000 Daltons, ou aproximadamente de 300.000 a 660.000 Daltons, ou aproximadamente de 300.000 a 2.000.000 Daltons, ou
25 aproximadamente de 300.000 a 4.000.000 Daltons, ou aproximadamente de 500.000 a 1.000.000 Daltons, ou aproximadamente de 1.000.000 a 1.500.000 Daltons, ou aproximadamente de 1.500.000 a 2.000.000 Daltons, ou aproximadamente de 2.000.000 a 2.500.000 Daltons, ou aproximadamente de 2.500.000 a 3.000.000 Daltons, ou de aproximadamente 3.000.000 a
30 3.500.000 Daltons, ou aproximadamente de 3.500.000 a 4.000.000 Daltons,

ou aproximadamente de 4.000.000 a 4.500.000 Daltons, ou aproximadamente de 4.500.000 a 5.000.000 Daltons.

Nas configurações relacionadas, as moléculas da composição adjuvante polinucleotídica possuem peso molecular médio igual ou superior a 150.000 Daltons, ou igual ou superior a 250.000 Daltons, ou igual ou superior a 350.000 Daltons, ou igual ou superior a 500.000 Daltons, ou igual ou superior a 650.000 Daltons, ou igual ou superior a 750.000 Daltons, ou igual ou superior a 1.000.000 Daltons, ou igual ou superior a 1.200.000 Daltons, ou igual ou superior a 1.500.000 Daltons, ou igual ou superior a 2.000.000 Daltons.

De forma correspondente, em um aspecto, a invenção apresenta uma composição adjuvante polinucleotídica, que compreende o ácido poliriboinosínico - poliribocitidílico (PIC), um antibiótico, e um íon positivo, caracterizada pelo fato de que a composição contém moléculas de adjuvante heterogêneas cuja dimensão molecular possui coeficiente de sedimentação em Svedbergs (S) de aproximadamente 6,43S a 24,03S.

Nas configurações relacionadas, as moléculas da composição adjuvante polinucleotídica são heterogêneas quanto à dimensão molecular, que é aproximadamente de 12,8S a 24,03S, ou aproximadamente de 6,43 a 18,31S, ou aproximadamente de 12,8 a 18,31S, ou aproximadamente de 12,8S a 30,31S, ou aproximadamente de 12,8S a 41,54S, ou aproximadamente de 13,5S, a 18,31S, ou aproximadamente de 13,5S a 24,03S, ou aproximadamente de 16,14 a 22,12S, ou aproximadamente de 22,12S a 26,6S, ou aproximadamente de 26,6S a 30,31S, ou aproximadamente de 30,31S a 33,55S, ou aproximadamente de 33,55S a 36,45S, ou aproximadamente de 36,45S a 39,1S, ou aproximadamente de 39,1S a 41,54S, ou aproximadamente de 41,54S a 43,83S, ou aproximadamente de 43,83S a 45,95S.

Nas outras configurações relacionadas, a composição adjuvante polinucleotídica possui um coeficiente de sedimentação (Svedbergs) médio superior a 9, ou superior a 12, ou superior a 13,5, ou superior a 15, ou

superior a 16, ou superior a 17, ou superior a 18, ou superior a 19, ou superior a 20, ou superior a 21, ou superior a 22 ou superior a 25, ou superior a 30.

Em uma configuração relacionada, o antibiótico da composição é canamicina, neomicina, antraciclina, sulfato de butirosina, gentamicina, higromicina, amicacina, dibecacina, nebramicina, metrizamida, puromicina, estreptomicina ou estreptozocina.

Em uma outra configuração relacionada, a composição adjuvante também compreende uma fonte de íons de cálcio.

Em uma outra configuração relacionada, o íon positivo na composição é o cálcio, cádmio, lítio, magnésio, cério, césio, cromo, cobalto, deutério, gálio, iodo, ferro ou zinco. O positivo pode ser na forma de sais inorgânicos ou complexos orgânicos.

A fonte de íons de cálcio pode ser fornecida, por exemplo, por cloreto de cálcio, carbonato de cálcio, fluoreto de cálcio, hidróxido de cálcio, fosfatos de cálcio ou sulfato de cálcio.

Em um aspecto de particular interesse, a invenção apresenta uma composição adjuvante polinucleotídica que compreende o ácido poliriboinosínico - poliribocitidílico (PIC), a canamicina e o cálcio, caracterizada pelo fato de que a composição inclui moléculas do adjuvante heterogêneas quanto ao peso molecular que é aproximadamente de 66.000 a 1.200.000 Daltons.

Nas configurações relacionadas, as moléculas do ácido poliriboinosínico - poliribocitidílico (PIC), canamicina e cálcio possuem peso molecular de aproximadamente 300.000 a 1.200.000 Daltons, ou aproximadamente de 66.000 a 660.000 Daltons, ou aproximadamente de 300.000 a 660.000 Daltons, ou aproximadamente de 300.000 a 2.000.000 Daltons, ou aproximadamente de 300.000 a 4.000.000 Daltons, ou aproximadamente de 500.000 a 1.000.000 Daltons, ou aproximadamente de 1.000.000 a 1.500.000 Daltons, ou aproximadamente de 1.500.000 a 2.000.000 Daltons, ou aproximadamente de 2.000.000 a 2.500.000 Daltons,

ou aproximadamente de 2.500.000 a 3.000.000 Daltons, ou aproximadamente de 3.000.000 a 3.500.000 Daltons, ou aproximadamente de 3.500.000 a 4.000.000 Daltons, ou aproximadamente de 4.000.000 a 4.500.000 Daltons, ou aproximadamente de 4.500.000 a 5.000.000 Daltons.

5 Em outras configurações relacionadas, as moléculas do ácido poliriboinosínico - poliribocitidílico (PIC), canamicina e cálcio do adjuvante são heterogêneas quanto ao peso molecular médio que é igual ou superior a 150.000 Daltons, igual ou superior a 250.000 Daltons, ou igual ou superior a 350.000 Daltons, ou igual ou superior a 500.000 Daltons, ou igual ou superior a 650.000 Daltons, ou igual ou superior a 750.000 Daltons, ou igual ou superior a 1.000.000 Daltons, ou igual ou superior a 1.200.000 Daltons, ou igual ou superior a 1.500.000 Daltons, ou igual ou superior a 1.500.000 Daltons.

15 Em um aspecto de particular interesse, a invenção apresenta uma composição adjuvante polinucleotídica que compreende o ácido poliriboinosínico - poliribocitidílico (PIC), canamicina e cálcio, caracterizada pelo fato de que a composição inclui moléculas do adjuvante heterogêneas quanto à dimensão molecular que possui um coeficiente de sedimentação em Svedbergs (S) de aproximadamente 6,43S a 24,03S.

20 Nas configurações relacionadas, as moléculas da composição adjuvante polinucleotídica são heterogêneas quanto à dimensão molecular, que é aproximadamente 12,8S a 24,03S, ou aproximadamente de 6,43 a 18,31S, ou aproximadamente de 12,8 a 18,31S, ou aproximadamente de 12,8S a 30,31S, ou aproximadamente de 12,8S a 41,54S, ou aproximadamente de 13,5S a 18,31S, ou aproximadamente de 13,5S a 24,03S, ou aproximadamente de 16,14 a 22,12S, ou aproximadamente de 22,12S a 26,6S, ou aproximadamente de 26,6S a 30,31S, ou aproximadamente de 30,31S a 33,55S, ou aproximadamente de 33,55S a 36,45S, ou aproximadamente de 36,45S a 39,1S, ou aproximadamente de 39,1S a 41,54S, ou aproximadamente de 41,54S a 43,83S, ou aproximadamente de 43,83S a 45,95S.

Ainda em outras configurações relacionadas, o ácido poliriboinosínico - poliribocitidílico (PIC), canamicina e cálcio possuem coeficiente de sedimentação médio superior a 9, ou superior a 12, ou superior a 13,5, ou superior a 15, ou superior a 16, ou superior a 17, ou superior a 18, ou superior a 19, ou superior a 20, ou superior a 21, ou superior a 22, ou superior a 25, ou superior a 30.

Em algumas configurações, a invenção apresenta uma composição adjuvante polinucleotídica que compreende o ácido poliriboinosínico - poliribocitidílico (PIC), canamicina e cálcio, caracterizada pelo fato de que pode ser preferível para a composição excluir moléculas, especificamente até uma medida em que as referidas moléculas excluídas não tenham qualquer efeito imunogênico significativo e tenham peso molecular aproximado ou inferior a 30.000 Daltons, aproximado ou inferior a 40.000 Daltons, aproximado ou inferior a 50.000 Daltons, aproximado ou inferior a 60.000 Daltons, aproximado ou inferior a 70.000 Daltons, aproximado ou inferior a 80.000 Daltons, aproximado ou inferior a 90.000 Daltons, aproximado ou inferior a 100.000 Daltons, aproximado ou inferior a 150.000 Daltons, aproximado ou inferior a 200.000 Daltons, aproximado ou inferior a 250.000 Daltons, aproximado ou inferior a 300.000 Daltons, aproximado ou inferior a 350.000 Daltons, aproximado ou inferior a 400.000 Daltons, aproximado ou inferior a 450.000 Daltons, aproximado ou inferior a 500.000 Daltons, aproximado ou inferior a 600.000 Daltons, aproximado ou inferior a 700.000 Daltons, aproximado ou inferior a 800.000 Daltons, aproximado ou inferior a 900.000 Daltons, aproximado ou inferior a 1.000.000 Daltons.

Em algumas configurações, a invenção apresenta uma composição adjuvante polinucleotídica que compreende o ácido poliriboinosínico - poliribocitidílico (PIC), a canamicina e cálcio, caracterizada pelo fato de que pode ser preferível para a composição excluir moléculas, especificamente até uma medida em que as referidas moléculas excluídas não tenham qualquer efeito imunogênico significativo e tenham dimensão molecular aproximada

ou inferior a 4,49S, aproximada ou inferior a 5,12S, aproximada ou inferior a 5,67S, aproximada ou inferior a 6,16S, aproximada ou inferior a 6,6S, aproximada ou inferior a 7,02S, aproximada ou inferior a 7,4S, aproximada ou inferior a 7,77S, aproximada ou inferior a 9,34S, aproximada ou inferior a 10,64S, aproximada ou inferior a 11,78S, aproximada ou inferior a 12,8S, aproximada ou inferior a 13,73S, aproximada ou inferior a 14,59S, aproximada ou inferior a 15,39S, aproximada ou inferior a 16,14S, aproximada ou inferior a 17,54S, aproximada ou inferior a 18,81S, aproximada ou inferior a 19,99S, aproximada ou inferior a 21,09S, aproximada ou inferior a 22,12S.

Em um aspecto de particular interesse, a invenção fornece uma composição imunogênica para aumentar a antigenicidade de um composto antigênico compreendendo uma composição adjuvante polinucleotídica.

Nas configurações relacionadas, a composição imunogênica compreende um adjuvante polinucleotídico e um antígeno.

Nas configurações relacionadas, a fonte do antígeno é um antígeno humano, antígeno animal não humano, antígeno de planta, antígeno bacteriano, antígeno fúngico, antígeno viral, antígeno parasítico ou antígeno cancerígeno.

Nas configurações relacionadas, a composição imunogênica compreende uma composição adjuvante polinucleotídica e um antígeno rábico.

Em determinadas configurações, os antígenos podem ser purificados a partir de uma fonte natural, sintetizada por meio de uma síntese de fase sólida ou pode ser obtida por meio da genética recombinante. O antígeno pode conter um fragmento protéico com uma ou mais regiões imunogênicas da molécula. Os antígenos também podem ser fornecidos por células inteiras ou microorganismos (por exemplo, partículas virais inteiras), que podem estar vivos, debilitados, mutilados ou mortos.

Em outras configurações, os antígenos incluem um ou mais agentes

provenientes de agentes infecciosos, antígeno de planta, antígeno cancerígeno, agentes alérgicos e outro antígeno humano, tal como para o desenvolvimento de doenças auto-imunes. Em outras configurações, os antígenos incluem um ou mais agentes infecciosos de qualquer vírus, bactéria, micobactérias, fungos e parasitas.

A composição adjuvante polinucleotídica da presente invenção também pode ser utilizada para aumentar a resposta imunológica contra os antígenos produzidos pelo uso de vacinas de DNA. As seqüências de DNA dessas vacinas que codificam o antígeno podem estar "expostas" ou contidas em um sistema de distribuição, como os lipossomas.

Ainda em outras configurações relacionadas, o antígeno rábico é selecionado a partir da vacina de células diplóides humanas (HDCV), ou da vacina anti-rábica, purificada, inativada de células renais de criceto (HKC-IPRV), ou da vacina anti-rábica, natural, inativada de células renais de criceto (HKC-ICRV), ou da vacina anti-rábica, purificada, de células vero (PVRV), ou vacina purificada de células embrionárias de frango (PCEC), ou da vacina purificada de células embrionárias de pato (PDEV), ou do antígeno rábico purificado, inativado de células renais de criceto (HKC-IPRA) ou do antígeno rábico natural, inativo, de células renais de criceto (HKC-ICRA).

Em um aspecto de particular interesse, a invenção apresenta uma composição imunogênica para aumentar a antigenicidade de um composto antigênico, que compreende uma composição adjuvante polinucleotídica capaz de produzir uma resposta imunológica mediada por células específicas do antígeno.

Em um aspecto de particular interesse, a invenção fornece uma composição imunogênica para aumentar a antigenicidade de um composto antigênico, que compreende uma composição adjuvante polinucleotídica capaz de produzir uma resposta imunológica mediada por células B específica do antígeno.

Em um aspecto de particular interesse, a invenção fornece uma

composição imunogênica para aumentar a antigenicidade de um composto antigênico, que compreende uma composição adjuvante polinucleotídica capaz de produzir uma resposta imunológica específica do antígeno das células B e T.

5 Em um aspecto de particular interesse, a invenção fornece uma composição imunogênica para aumentar a antigenicidade de um composto que compreende uma composição adjuvante polinucleotídica e um antígeno rábico purificado inativado de células renais de criceto, onde a presença do antígeno rábico deve atingir uma quantidade mínima, de mais de 1 Unidade
10 Internacional (IU).

Nas configurações relacionadas, a composição imunogênica compreende uma composição adjuvante polinucleotídica e um antígeno rábico purificado inativo de células renais de criceto, onde a presença do antígeno rábico deve atingir uma quantidade mínima, como por exemplo, que seja mais
15 de 0,25 Unidades Internacionais, mais de 0,5 Unidades Internacionais, mais de 1,2 Unidades Internacionais, mais de 1,4 Unidades Internacionais, mais de 1,6 Unidades Internacionais, mais de 1,8 Unidades Internacionais, mais de 2,0 Unidades Internacionais, mais de 2,2 Unidades Internacionais, mais de 2,4 Unidades Internacionais, mais de 2,6 Unidades Internacionais, mais de 2,8
20 Unidades Internacionais, mais de 3,0 Unidades Internacionais, mais de 3,2 Unidades Internacionais, mais de 3,4 Unidades Internacionais, mais de 3,6 Unidades Internacionais, mais de 3,8 Unidades Internacionais, ou mais de 4,0 Unidades Internacionais.

Em um aspecto de particular interesse, a invenção fornece uma
25 composição imunogênica para aumentar a antigenicidade de um composto que compreende uma composição adjuvante polinucleotídica e um antígeno rábico purificado inativo de células renais de criceto, onde a presença de um adjuvante e do antígeno rábico ocorre na proporção de aproximadamente 1 para 1.

30 Nas configurações relacionadas, a composição imunogênica

compreende uma composição adjuvante polinucleotídica e um antígeno rábico purificado inativo de células renais de criceto, onde a presença de um adjuvante e do antígeno rábico ocorre na proporção de menos de 1 para 10, aproximadamente de 1 para 9, aproximadamente de 1 para 8, aproximadamente de 1 para 7, aproximadamente de 1 para 5, aproximadamente de 1 para 4, aproximadamente de 1 para 3, aproximadamente de 1 para 2, aproximadamente de 2 para 1, aproximadamente de 3 para 1, aproximadamente de 4 para 1, aproximadamente de 5 para 1, aproximadamente de 6 para 1, aproximadamente de 7 para 1, aproximadamente de 8 para 1, aproximadamente de 9 para 1, aproximadamente de 10 para 1, mais de 10 para 1.

Em um aspecto de particular interesse, a invenção fornece uma composição adjuvante ou composição imunogênica, sendo que a composição imunogênica ou a composição adjuvante contida na composição imunogênica se apresenta na forma sólida ou líquida, ou em suspensão ou em solução.

Em um aspecto de particular interesse, a invenção fornece uma composição adjuvante ou composição imunogênica que compreende uma composição adjuvante, sendo que a composição adjuvante ou a composição imunogênica é liofilizada.

Nas configurações relacionadas, a invenção fornece um kit que compreende uma composição adjuvante e um composto antigênico.

Em um aspecto de particular interesse, a invenção fornece o uso da composição adjuvante polinucleotídica para a preparação de um medicamento para aumentar a resposta imunogênica de um hospedeiro.

Em um aspecto de particular interesse, a invenção fornece um método para aumentar a resposta imunológica a um composto antigênico, o qual consiste na administração, a um hospedeiro, de uma composição imunogênica para aumentar a antigenicidade do composto antigênico compreendendo a composição adjuvante polinucleotídica.

Nas configurações relacionadas, o método de administração, a um hospedeiro, de uma composição imunogênica pode ser uma das formas selecionadas a partir de um grupo que inclui a injeção parenteral, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa e subcutânea, a inalação, a aplicação por via retal, vaginal, nasal, oral, oftálmica, tópica, transdérmica ou intradérmica.

Em um aspecto de particular interesse, a invenção fornece um método para aumentar a resposta imunológica a um composto antigênico, que compreende a administração, a um hospedeiro, de uma composição imunogênica para aumentar a antigenicidade de um composto antigênico compreendendo uma composição adjuvante polinucleotídica, sendo que o hospedeiro é um humano.

Em um aspecto de particular interesse, a invenção fornece um método para aumentar a resposta imunológica a um composto antigênico, que compreende a administração, a um hospedeiro, de uma composição imunogênica para aumentar a antigenicidade de um composto antigênico compreendendo uma composição adjuvante polinucleotídica, sendo que o hospedeiro é um animal.

Estas e outras características e vantagens da invenção se tornarão evidentes a partir da descrição detalhada das configurações preferidas apresentadas a seguir em conjunto com os desenhos que a acompanham.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 mostra o peso molecular relativo para amostras de Av-PICKCa e PIKA.

A figura 2 mostra que a PIKA induz à produção dose dependente de citocina interferon gama específica.

DESCRIÇÃO DETALHADA DE CONFIGURAÇÕES EXEMPLARES DA INVENÇÃO.

A presente invenção pode ser compreendida mais facilmente pela referência à descrição detalhada a seguir de determinadas configurações da

invenção e Exemplos aqui incluídos.

Ao longo deste pedido, no qual as publicações são referidas, as descobertas contidas nessas publicações são incorporadas por referências, na sua totalidade, neste pedido, a fim de descrever de forma mais completa o estado da técnica ao qual esta invenção pertence.

Antes de também descrever a presente invenção, fica entendido que esta invenção não se limita às configurações específicas descritas, uma vez que elas podem naturalmente variar. Fica entendido também que a terminologia aqui empregada tem por finalidade apenas descrever as configurações específicas e ela não pretende ser restritiva, uma vez que o escopo da presente invenção será limitado apenas pelas reivindicações anexas.

A menos que definidos de outra forma, todos os termos técnicos e científicos aqui empregados possuem os mesmos significados aos comumente conhecidos por um perito na técnica à qual esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes aos aqui descritos também possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais preferidos são descritos a seguir. Todas as publicações mencionadas são aqui incorporadas pela referência para apresentar e descrever os métodos e/ou materiais com relação aos quais as publicações são citadas.

Deve-se notar que, conforme aqui empregado e nas reivindicações anexas, as formas singulares de “um/uma”, “e”, e “o/a” incluem referentes plurais, a menos que o contexto claramente estabeleça o contrário. Portanto, por exemplo, a referência a “um texto” inclui uma pluralidade dos referidos textos e referência a “o segmento” inclui a referência a um ou mais segmentos e equivalentes desses, conhecidos pelos especializados na técnica, etc. Deve-se também notar que as reivindicações podem ser redigidas para excluir qualquer elemento opcional. Assim sendo, esta declaração tem por finalidade servir como base antecedente para uso de terminologia de exclusividade como “unicamente”, “apenas” e similares em conjunto com a declaração dos

elementos de reivindicação ou uso de uma limitação “negativa”.

DEFINIÇÃO DOS TERMOS

Antes de apresentar os detalhes da presente invenção, poderá ser útil para a sua compreensão estabelecer definições de diversos termos aqui empregados.

O termo “adjuvante” conforme aqui empregado, se refere a qualquer substância ou mistura de substâncias que aumente ou diversifique a resposta imunológica de um hospedeiro a um composto antigênico. Especificamente:

1. O termo “PICKCa” geralmente se refere a uma composição de poli I:C, canamicina e cálcio, sem restrição de propriedades imunogênicas e físicas específicas.

2. “Av-PICKCa” se refere a uma forma de PICKCa usada comercialmente como um medicamento antiviral.

3. “PIKA” se refere a uma composição da invenção, que compreende a poli I:C, um antibiótico (por exemplo, canamicina), e um íon positivo (por exemplo, cálcio), em que PIKA é caracterizada por atributos físicos (por exemplo, peso molecular, dimensão e similares, conforme aqui descritos) tal que mediante a administração, a PIKA exhibe características de um adjuvante com efeitos colaterais adversos reduzidos (por exemplo, toxicidade reduzida) com relação a, por exemplo, PICKCa e maior potência (por exemplo, estimula uma resposta imunológica aumentada) com relação a, por exemplo, Av-PICKCa.

“Molécula contendo PIC” ou “Composto contendo PIC” se refere, sem restrição, ao PIC, que pode ser opcionalmente complexado ou de outra forma combinado com pelo menos um deles ou os dois, o antibiótico (por exemplo, a canamicina) e o íon positivo (por exemplo, o cálcio) presentes em uma composição com moléculas contendo PIC.

“Heterogêneas” conforme aqui empregado no contexto das composições adjuvantes da invenção indica que os componentes da composição, por exemplo, as moléculas contendo PIC, não são uniformes

com respeito à característica física de peso molecular, dimensão, ou ambos.

O termo “animal” inclui humanos e todos os mamíferos selvagens e domésticos e aves, incluindo, sem restrição, gados, cavalos, vacas, suínos, carneiros, cabras, cães, gatos, coelhos, veados, martas, galinhas, patos, gansos, perus, pássaros de caça e semelhantes.

O termo “anticorpos” inclui os anticorpos monoclonais e policlonais, bem como fragmentos de ligação de compostos antigênicos dos referidos anticorpos, incluindo fragmentos Fab, F(ab')₂, Fd, Fv e derivativos simples da cadeia desses anticorpos. Adicionalmente, o termo “anticorpos” inclui anticorpos que ocorrem naturalmente, bem como anticorpos que não ocorrem naturalmente, incluindo, por exemplo, anticorpos quiméricos, bifuncionais e humanizados e isoformas sintéticas relacionadas.

Conforme aqui empregado, o termo “composto antigênico” se refere a qualquer substância que possa ser reconhecida pelo sistema imunológico (por exemplo, ligado por um anticorpo ou processado de forma a produzir uma resposta celular imune) em condições apropriadas.

Um “antígeno” se refere a uma substância, incluindo composições na forma de vacina sendo que a vacina propriamente dita compreende um composto antigênico e pode ou não compreender um adjuvante diferente da PIKA, a qual, quando administrada por via apropriada (por exemplo, parenteralmente), induz uma resposta imunológica, por exemplo, a formação de anticorpos, incluindo aqueles que especificamente ligam o antígeno. Duas das características dos antígenos são a sua imunogenicidade, ou seja, a sua capacidade de induzir uma resposta imunológica *in vivo*, e sua antigenicidade, ou seja, a sua capacidade de ser seletivamente reconhecida pelos anticorpos cuja origem são os antígenos.

Os termos “imunidade mediada por células” e “resposta imunológica mediada por células” se referem à defesa imunológica proporcionada pelos linfócitos, como as proporcionadas pelos linfócitos de células T quando se aproximam de suas células vítimas. A resposta

imunológica mediada por células normalmente inclui a proliferação dos linfócitos. Quando a “proliferação dos linfócitos” é medida, mede-se a habilidade dos linfócitos de proliferar em resposta a um antígeno específico. A proliferação dos linfócitos significa a proliferação das células B, células auxiliadoras T ou células do linfócito T citotóxico (CTL).

Uma “quantidade eficaz de um composto antigênico” se refere a uma quantidade de composto antigênico que, numa combinação opcional com adjuvante, leva o indivíduo a produzir uma resposta imunológica específica ao composto antigênico.

A expressão “resposta imunológica aumentada” ou similar significa que a resposta imunológica é elevada, melhorada ou aumentada para beneficiar o hospedeiro com relação à condição anterior da resposta imunológica, por exemplo, antes da administração de uma composição imunogênica da invenção.

Os termos “imunidade humoral” e “resposta imunológica humoral” se referem a uma forma de imunidade em que as moléculas dos anticorpos são produzidas em resposta à estimulação antigênica.

O termo “resposta imunológica” se refere a qualquer resposta a um composto antigênico pelo sistema imunológico de um indivíduo vertebrado. Exemplos de respostas imunes incluem, mas não se limitam à imunidade humoral sistêmica e local, bem como celular, como a resposta CTL, incluindo indução específica de antígeno de respostas de CD8+ CTLs, células auxiliadoras T, incluindo respostas proliferativas das células T e liberação de citocinas e respostas das células B, incluindo a resposta dos anticorpos.

O termo “obtenção de uma resposta imunológica” é aqui empregado geralmente para abranger a indução e/ou potencialização de uma resposta imunológica.

O termo “indução de uma resposta imunológica” se refere a uma resposta imunológica que seja estimulada, iniciada ou induzida.

O termo “potencialização de uma resposta imunológica” se refere a

uma resposta imunológica preexistente que seja melhorada, favorecida, complementada, amplificada, melhorada, aumentada ou prolongada.

O termo "Poli I:C" ou "PIC" se refere a uma composição contendo ácidos nucleicos poliribonucleotídicos e poliribocitidílicos, que também podem ser referidos como ácido polinosínico- ácido policitidílico, respectivamente.

O termo "quantidade imunogênica" se refere a uma quantidade de composto antigênico suficiente para estimular uma resposta imunológica, quando administrado com a composição da invenção e comparado com a resposta imunológica observada na ausência de um adjuvante polinucleotídico.

O termo "quantidade de imunopotencialização" se refere à quantidade de adjuvante necessária para produzir um aumento na titulação do anticorpo e/ou na imunidade mediada por células ao ser administrada com um composto antigênico na composição da invenção, quando comparada com o aumento no nível de imunidade mediada por células e/ou anticorpos observado na ausência de um adjuvante polinucleotídico.

Conforme aqui empregado, o termo "mistura" inclui qualquer método para combinar os componentes da composição; os referidos métodos incluem, mas não se limitam à mistura, dispensação, dissolução, emulsificação, coagulação, suspensão ou outra forma que combine fisicamente os componentes da composição.

"Sal farmacêuticamente aceitável" de um composto significa um sal que seja farmacêuticamente aceitável e que possua uma atividade farmacológica desejada do composto original. Os referidos sais incluem: (1) sais com adição de ácido, formados com ácidos inorgânicos como o ácido clorídrico, ácido hidrobromídico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico e semelhantes; ou formados com ácidos orgânicos como o ácido acético, ácido propiônico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiônico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malônico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido

benzóico, ácido 3-(4-hidroxibenzil)benzóico, ácido cinâmico, ácido mandélico, ácido metanosulfônico, ácido etanosulfônico, ácido 1,2-etanodisulfônico, ácido 2-hidroxietanosulfônico, ácido benzenosulfônico, ácido 4-clorobenzenosulfônico, ácido 2-naftalenosulfônico, ácido 4-toluenosulfônico, ácido canforsulfônico, ácido glucoeptônico, ácido 4,4'-metilenebis-(3- hidroxí-2-ene-1-carboxílico), ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido tertiaributilacético, ácido laurilsulfúrico, ácido glucônico, ácido glutâmico, ácido hidroxinaftóico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucônico e semelhantes; ou (2) sais formados quando um próton acidífero presente no composto original é substituído por um íon metálico, por exemplo, um íon metálico alcalino, um íon alcalino terroso ou um íon de alumínio; ou coordena com uma base orgânica como a etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N- metilglucamina e semelhantes.

15 O termo “tratamento” cobre qualquer tratamento de uma doença em animal vertebrado, especificamente em humano e inclui: (i) prevenção de ocorrência da doença em um indivíduo que pode estar predisposto a ela, porém que ainda não tenha sido diagnosticado como a tendo contraído; (ii) inibição da doença, ou seja, detendo o seu desenvolvimento; ou (iii) controle da doença, ou seja, provocando a sua regressão.

20 O termo “forma de dosagem unitária” conforme aqui empregado se refere a unidades fisicamente discretas e adequadas, como as doses unitárias para humanos e animais, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de compostos da presente invenção, calculada em um número suficiente para produzir o efeito desejado em associação com um diluente, portador ou veículo aceitável do ponto de vista farmacêutico / fisiológico.

VISÃO GERAL DA INVENÇÃO

25 A presente invenção refere-se a compostos e métodos úteis para aumentar uma resposta imunológica, que pode ser humoral e/ou mediada por células, em humano, animal ou cultura celular. De forma geral, a invenção

consiste em uma composição imunogênica contendo um adjuvante. A presença do adjuvante aumenta ou modifica a resposta imunológica. Portanto, a resposta imunológica humoral e/ou mediada por células é mais eficaz na presença do adjuvante. Além disso, o adjuvante pode alterar a qualidade da
5 resposta imunológica, afetando as subclasses (isótipos) das imunoglobulinas e citocinas produzidas.

As principais características do adjuvante são a sua habilidade de estimular um desejado nível e tipo de resposta imunológica sem induzir efeitos colaterais adversos. Atualmente há apenas um limitado número de
10 adjuvantes aprovados para uso humano que tenham a referida combinação de características. Os padrões de segurança para as substâncias imunogênicas e, especificamente, para as vacinas são estritos e rigorosamente impostos. Portanto, uma significativa restrição para o desenvolvimento bem-sucedido de um adjuvante é o desenvolvimento de um produto que seja suficientemente
15 potente para obter uma resposta imunológica apropriada e que, ao mesmo tempo, não induza efeitos colaterais adversos.

A configuração preferida da invenção é um adjuvante polinucleotídico, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo é o ácido poliribonucleotídico - poliribocitidílico (PIC). O PIC isolado demonstrou ser um
20 adjuvante eficaz, mas apresenta um perfil de segurança inaceitável e é instável em humanos e primatas. A presente invenção apresenta uma composição do PIC combinada com um antibiótico e íon positivo que aumenta os atributos imunogênicos desejados do adjuvante e ao mesmo tempo melhora o perfil de segurança e estabilidade.

25 A presente invenção se baseia também na descoberta de que as características físicas e biológicas das moléculas PIKA da composição adjuvante influenciam as características da resposta imunológica e os efeitos colaterais adversos. No curso dos estudos da pesquisa investigativa, descobriu-se inesperadamente que, pelo ajuste de determinadas características
30 do adjuvante polinucleotídico, este se torna mais ou menos potente e/ou mais

ou menos tóxico nas formas que também são descritas a seguir. Portanto, pela definição da composição adjuvante em termos de suas características físicas, é possível descrever mais precisamente os seus atributos que apresenta resposta imunogênica e perfil de segurança/estabilidade preferíveis.

5 O adjuvante da presente invenção, aqui referido por conveniência como adjuvante PIKA é, portanto, completamente definido como combinação de sua composição química somada aos atributos físicos fundamentais das moléculas que compõem o adjuvante. Portanto, a forma específica da PIKA, que exibe propriedades imunogênicas significativamente superiores sendo ao
10 mesmo tempo seguras quanto ao uso em animais e humanos, é mais bem definida por um ou mais atributos específicos, normalmente uma combinação deles, incluindo composição, peso molecular, dimensão molecular, concentração e pH.

A PIKA geralmente compreende um polinucleotídeo, um antibiótico
15 e um íon positivo, sendo que o polinucleotídeo pode ser o ácido poliriboinosínico - poliribocitidílico (PIC), e o antibiótico um aminoglicosídeo (por exemplo, a canamicina, estreptomina, tobramicina), neomicina, uma antraciclina, sulfato de butirosina, gentamicina, higromicina, amicacina, dibecacina, nebramicina, metrizamida, puromicina ou
20 estreptozocina, e o íon pode ser cálcio, cádmio, lítio, magnésio, cério, césio, cromo, cobalto, deutério, gálio, iodo, ferro ou zinco.

Os antibióticos “aminoglicosídeos” se referem a antibióticos cuja estrutura contém amino-açúcares ligados a um anel aminociclitol (núcleos de hexose) através de ligações glicosídicas. Os antibióticos aminoglicosídeos são
25 derivados de várias espécies de *Streptomyces* e *Micromonospora* ou são produzidos sinteticamente. Por exemplo, a canamicina é um antibiótico aminoglicosídeo obtido da bactéria do solo *Streptomyces Kanamyceticus*, usado no tratamento de várias infecções, especialmente as causadas pela bactéria Gram-negativa.

30 A composição PIKA é obtida através da mistura do ácido

polinosínico e ácido policitidílico, um antibiótico e uma fonte de um íon positivo na solução tampão de fosfato/cloreto de sódio que tem pH entre pH6 e pH8. O ácido polinosínico e o ácido policitidílico são geralmente fornecidos a uma concentração de 0,1 a 10 mg/ml, preferivelmente de 0,5 a 5 mg/ml e, mais preferivelmente, de 0,5 a 2,5 mg/ml. O valor da hipercromicidade deverá ser superior a 10%, preferivelmente superior a 15% e, mais preferivelmente, superior a 20%. A preparação do PIC e a combinação com a canamicina e o cálcio são preferivelmente conduzidas segundo os padrões de qualidade do Processo de Boas Práticas de Fabricação Internacional.

10 Em determinadas configurações da presente invenção, a canamicina na composição adjuvante polinucleotídica pode ser usada em conjunto ou substituída por um ou mais antibióticos selecionados do grupo que inclui a tobramicina, antraciclinas, sulfato de butirosina, gentamicinas, higromicina, amicacina, dibecacina, nebramicina, metrizamida, neomicina, puromicina, estreptomicina e estreptozocina. O antibiótico (por exemplo, a canamicina ou similares) em uma composição adjuvante polinucleotídica da invenção é geralmente fornecido a uma concentração de aproximadamente 10 a 100.000 unidades/ml, preferivelmente de aproximadamente 100 a 10.000 unidades/ml e, mais preferivelmente, de aproximadamente 500 a 5.000 unidades/ml.

20 Em determinadas configurações da presente invenção, a composição adjuvante polinucleotídica também compreende um íon positivo (cátion), normalmente um cátion bivalente, normalmente um cátion de um metal alcalino. O íon positivo geralmente é fornecido na composição da invenção como uma fonte de íons positivos como um sal ou complexo, por exemplo, um sal ou complexo orgânico ou inorgânico, normalmente um sal inorgânico ou complexo orgânico. Íons positivos exemplares incluem, mas não se limitam necessariamente ao cálcio, cádmio, lítio, magnésio, cério, césio, cromo, cobalto, deutério, gálio, iodo, ferro ou zinco.

30 O íon positivo (por exemplo, o cálcio) pode ser fornecido na composição da invenção a uma concentração na faixa de aproximadamente 10

umol a 10 mmol/ml, preferivelmente de aproximadamente 50 umol a 5 mmol/ml e, mais preferivelmente, de aproximadamente 100 umol a 1 mmol/ml.

Conforme observado acima, o íon positivo pode ser fornecido na forma de qualquer sal ou complexo orgânico apropriado, incluindo, mas não se limitando necessariamente aos sais de cloreto, fluoreto, hidróxido, fosfato ou sulfato. Por exemplo, quando o íon positivo for cálcio, o íon poderá estar na forma de carbonato, cloreto, fluoreto, hidróxido, fosfatos ou sulfato de cálcio.

Quando o íon positivo na composição adjuvante da invenção for cálcio, este poderá ser em combinação ou substituído por outros íons positivos, incluindo o cádmio, lítio, magnésio, cério, césio, cromo, cobalto, deutério, gálio, iodo, ferro e zinco, sendo que os íons podem estar na forma de sais inorgânicos ou complexos orgânicos.

A composição resultante é posteriormente transformada em PIKA através de um processo de fabricação adicional que envolve o isolamento das moléculas com dimensão e/ou peso definido. A separação das moléculas polinucleotídicas de características específicas usando a filtração, cromatografia, tratamento térmico, separação centrífuga, eletroforese e métodos similares que são processos padrão é conhecida pelos especialistas na técnica.

Em determinadas configurações da presente invenção, a composição adjuvante polinucleotídica é também definida pelo atributo físico do peso molecular. No curso da investigação, descobriu-se surpreendentemente que há uma correlação positiva entre o peso molecular e a eficácia da composição adjuvante polinucleotídica. O nível de potência observado de uma composição imunogênica contendo uma composição adjuvante polinucleotídica, incluindo a habilidade de produzir imunoglobulinas e citocinas, aumenta à medida que o peso molecular da composição adjuvante polinucleotídica aumenta. O peso molecular do adjuvante polinucleotídico

pode ser determinado por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no Exemplo 1.

Conforme ilustrado na seção de Exemplos a seguir, o inventor descobriu que as composições da vacina contendo um adjuvante da PIKA de diversos pesos moleculares exibiram uma correlação direta entre o peso molecular e a potência protetora específica do antígeno (vide Exemplo 2). Da mesma forma, o inventor descobriu que há uma correlação direta entre o peso molecular das composições adjuvantes PIKA e a habilidade de produzir o interferon-gama, quando administradas a um hospedeiro em combinação com um antígeno rábico (vide Exemplo 3).

O inventor também identificou, durante os estudos em humanos em 1996, na China, usando uma vacina anti-rábica com um adjuvante contendo PICKCa com uma especificação de peso molecular particularmente elevado que a composição resultante apresentou surpreendentemente um nível inaceitável de efeitos colaterais adversos. Os resultados do estudo clínico de 1996 que não tinham sido anteriormente publicados estão apresentados no Exemplo 4. A pesquisa sobre o peso molecular está apresentada nos Exemplos 5 e 6. O estudo foi conduzido sob a jurisdição da Agência Chinesa de Controle de Alimentos e Medicamentos. Assim sendo, o adjuvante não deveria ser administrado em humanos em ambiente controlado de estudo clínico, se os referidos efeitos colaterais tinham sido antecipados com base no conhecimento daquela ocasião.

O inventor descobriu que as composições adjuvantes PIKA da invenção em estudos pré-clínicos com pesos moleculares de até $1,0 \times 10^6$ e composições de vacinas incluindo composições adjuvantes PIKA com pesos moleculares de até $5,5 \times 10^5$ apresentaram uma ampla margem de segurança em testes específicos de toxicidade (vide Exemplo 7). A PIKA com peso molecular máximo de $1,2 \times 10^6$ foi usado com sucesso em pesquisa pré-clínica (vide Exemplo 3). Pesquisas posteriores conduzidas pelo inventor demonstraram a segurança da PIKA, quando usada em conjunto com um

composto antigênico na forma de vacina (vide Exemplo 8).

Resultados de uma experiência subsequente conduzida pelo inventor na China em 2002 também demonstraram que o uso da PIKA apresenta um adjuvante seguro e eficaz em humanos. Os resultados desse experimento, não anteriormente publicados, são apresentados no Exemplo 9.

Com base nas observações acima, a configuração preferida da PIKA, portanto, compreende as moléculas com características físicas de peso molecular e/ou dimensão que proporcionam vantagens pelo aumento da potência e eficácia, fornecendo ao mesmo tempo um nível adequado de margem de segurança, de forma a não induzir quaisquer efeitos colaterais adversos. As moléculas presentes em Av-PICKCa, na faixa inferior do peso molecular podem ser eficazes como uma composição antiviral, mas são significativamente menos eficazes que a composição molecular da PIKA quando usada como adjuvante em uma composição imunogênica. Além disso, a PIKA demonstrou um perfil de segurança que a torna preferível a PICKCa.

Um aspecto da presente invenção é, portanto, o peso molecular da PIKA, a composição da invenção.

A composição inventiva da PIKA geralmente compreende um conjunto ou uma população de moléculas, onde as moléculas possuem características físicas, por exemplo, de peso e/ou dimensão molecular que proporcionam o efeito desejado na produção de uma resposta imunológica, ao mesmo tempo, preferivelmente, diminuindo ou evitando efeitos colaterais adversos (como os associados à administração de PICKCa). Geralmente, as moléculas da PIKA são heterogêneas quanto ao peso e/ou dimensão molecular.

Conforme aqui usado de forma geral e a menos que especificamente indicado de outra forma, a PIKA, composição adjuvante da invenção, inclui o PIC que pode ser complexado com um antibiótico (por exemplo, a canamicina) e um íon positivo (por exemplo, o cálcio). As moléculas contidas na PIKA são heterogêneas quanto ao peso molecular (por exemplo, conforme

calculado em Daltons) ou à dimensão molecular (por exemplo, conforme calculada em termos de coeficiente de sedimentação).

Quando uma faixa é usada em referência às características heterogêneas das moléculas da PIKA (por exemplo, peso ou dimensão molecular), a referência à referida faixa aqui indica os limites superiores e inferiores aproximados dos pesos e dimensões das moléculas da PIKA na composição, mas não implica ou pretende que a composição contenha uma molécula da PIKA que tenha peso ou dimensão molecular que seja representativo de qualquer peso ou dimensão molecular dentro da faixa. Portanto, por exemplo, uma faixa de peso molecular de aproximadamente 66.000 a 1.200.000 Daltons indica que as moléculas da PIKA de aproximadamente 66.000 Daltons e aproximadamente 1.200.000 Daltons estão contidas na composição, mas não há nenhuma exigência de que as moléculas da PIKA de 88.000 Daltons estejam presentes na composição (embora, de fato, elas possam estar presentes).

Quando a característica física das moléculas da PIKA na composição inventiva é definida por uma faixa de pesos moleculares, as moléculas da PIKA são heterogêneas quanto ao peso molecular, sendo que a faixa de peso molecular é aproximadamente de 300.000 a 660.000 Daltons, aproximadamente de 300.000 a 1.200.000 Daltons, aproximadamente de 66.000 a 660.000 Daltons, ou aproximadamente de 66.000 a 1.200.000 Daltons.

A invenção também contempla as composições com moléculas da PIKA heterogêneas quanto ao peso molecular, sendo a faixa de peso molecular aproximadamente de 300.000 a 2.000.000 Daltons, aproximadamente de 300.000 a 4.000.000 Daltons, aproximadamente de 500.000 a 1.000.000 Daltons, aproximadamente de 1.000.000 a 1.500.000 Daltons, aproximadamente de 1.500.000 a 2.000.000 Daltons, aproximadamente de 2.000.000 a 2.500.000 Daltons, aproximadamente de 2.500.000 a 3.000.000 Daltons, aproximadamente de 3.000.000 a 3.500.000

Daltons, aproximadamente de 3.500.000 a 4.000.000 Daltons, aproximadamente de 4.000.000 a 4.500.000 Daltons, ou aproximadamente 4.500.000 a 5.000.000 Daltons. As moléculas da PIKA com pesos moleculares nos limites superiores e inferiores dessas faixas, bem como dentro dessas faixas, estão presentes na composição.

Quando a característica física das moléculas da PIKA na composição inventiva estiver definida por uma faixa de pesos moleculares, as moléculas da PIKA podem ter peso molecular médio igual ou superior a 150.000 Daltons, igual ou superior a 250.000 Daltons, igual ou superior a 350.000 Daltons, igual ou superior a 500.000 Daltons, igual ou superior a 650.000 Daltons, igual ou superior a 750.000 Daltons, igual ou superior a 1.000.000 Daltons, igual ou superior a 1.200.000 Daltons, igual ou superior a 1.500.000 Daltons ou igual ou superior a 2.000.000 Daltons.

Quando a característica física das moléculas da PIKA na composição inventiva estiver definida pelo coeficiente de sedimentação, que é uma medida de peso e dimensão moleculares, as moléculas da PIKA podem ter o seu coeficiente de sedimentação superior a 9, ou superior a aproximadamente 12, ou superior a aproximadamente 13,5, ou superior a 15, ou superior a 16, ou superior a 17, ou superior a 18, ou superior a 19, ou superior a 20, ou superior a 21, ou superior a 22, ou superior a 25, ou superior a 30.

Em algumas configurações, a invenção apresenta uma composição adjuvante polinucleotídica que compreende o ácido poliriboinosínico - poliribocitidílico (PIC), a canamicina e o cálcio, sendo que a composição exclui uma quantidade detectável de moléculas com peso molecular aproximado ou inferior a 30.000 Daltons, aproximado ou inferior a 40.000 Daltons, aproximado ou inferior a 50.000 Daltons, aproximado ou inferior a 60.000 Daltons, aproximado ou inferior a 70.000 Daltons, aproximado ou inferior a 80.000 Daltons, aproximado ou inferior a 90.000 Daltons, aproximado ou inferior a 100.000 Daltons, aproximado ou inferior a 150.000

Daltons, aproximado ou inferior a 200.000 Daltons, aproximado ou inferior a 250.000 Daltons, aproximado ou inferior a 300.000 Daltons, aproximado ou inferior a 350.000 Daltons, aproximado ou inferior a 400.000 Daltons, aproximado ou inferior a 450.000 Daltons, aproximado ou inferior a 500.000 Daltons, aproximado ou inferior a 600.000 Daltons, aproximado ou inferior a 700.000 Daltons, aproximado ou inferior a 800.000 Daltons, aproximado ou inferior a 900.000 Daltons, ou aproximado ou inferior a 1.000.000 Daltons. Nessa configuração, a exclusão dessas referidas moléculas de peso molecular inferior é particularmente interessante na medida em que elas não provocam efeito imunogênico significativo.

A PIKA, que compreende as moléculas com peso molecular de até $1,0 \times 10^6$ Daltons é, conforme demonstra o inventor, segura para os animais em teste de toxicidade específica (vide Exemplo 7). A PIKA, que compreende as moléculas com peso molecular de até $1,2 \times 10^6$ Daltons tem sido usada com segurança em estudos pré-clínicos (vide Exemplo 3). A PIKA também tem se mostrado ser segura quando usada em uma composição imunogênica (vide Exemplo 8). A referida composição PIKA apresenta vantagens em termos de eficácia. A PIKA, que compreende moléculas com peso molecular de até $6,6 \times 10^5$ Daltons, também produz uma resposta imunológica eficaz com maior margem de segurança quando usada em humanos e animais. Aumentando o peso das moléculas menores presentes para $6,6 \times 10^5$ Daltons e preferivelmente para $3,0 \times 10^5$ Daltons, a eficácia do adjuvante aumentará sem comprometer os padrões de segurança.

Foi também descoberto que a concentração da composição adjuvante polinucleotídica pode causar impacto no peso das moléculas da composição. O peso molecular de PICKCa parece aumentar quando a concentração da composição adjuvante (veja o Exemplo 5) aumenta. O inventor observou que o aumento na concentração do adjuvante polinucleotídico pode resultar na coalescência (ou agregação) das moléculas de PICKCa, resultando em moléculas com grande peso molecular. Esse

processo tem se mostrado irreversível. Portanto, a diluição subsequente de uma composição adjuvante polinucleotídica em um meio apropriado não resulta na redução do peso das moléculas do adjuvante. Conforme observado no Exemplo 6, quando a grande forma molecular concentrada da composição adjuvante polinucleotídica é combinada com o antígeno rábico, o resultado é uma composição que mantém alta a sua faixa de peso molecular. A vacina anti-rábica assim formada apresentou efeitos colaterais adversos em estudos clínicos humanos (vide Exemplo 4).

A composição PIKA da invenção pode ser fornecida em qualquer tampão fisiologicamente aceitável aqui utilizada, mas os tampões de fosfato são preferidos. Outros tampões aceitáveis como o acetato, tris, bicarbonato, carbonato, ou similares podem ser usados como substitutos dos tampões de fosfato.

O pH do componente aquoso estará preferivelmente entre 4,0 e 10,0 embora seja preferível ajustar o pH do sistema de 6 a 8,5 sendo que esse pH não reduz significativamente a estabilidade de outros componentes da composição e não é, por outro lado, fisiologicamente impróprio. Em determinadas configurações, a parte aquosa da composição imunogênica é salina tamponada. Quando se pretende administrar essas composições parenteralmente, é preferível preparar as soluções de forma que a tonicidade, ou seja, a osmolalidade seja essencialmente a mesma que a dos fluidos fisiológicos normais, a fim de evitar o inchaço pós-administração ou a rápida absorção da composição em decorrência de diferentes concentrações de íons entre a composição e os fluidos fisiológicos.

A quantidade de salina tamponada empregada nessas composições será a necessária para que o valor da composição atinja a unidade. Ou seja, uma quantidade de salina tamponada, suficiente para atingir 100%, será misturada com outros componentes, a fim de que a composição atinja o volume.

Em determinadas configurações, os antígenos podem ser purificados

a partir de uma fonte natural, sintetizada por meio de uma síntese de fase sólida ou pode ser obtida por meio da genética recombinante. O antígeno pode conter um fragmento de proteína com uma ou mais regiões imunogênicas da molécula. Os antígenos também podem ser fornecidos por células inteiras ou microorganismos (por exemplo, partículas virais inteiras),
5 que podem estar vivos, debilitados, mutilados ou mortos.

Em outras configurações, os antígenos incluem um ou mais agentes provenientes de agentes infecciosos, antígeno de planta, antígeno cancerígeno, agentes alérgicos e outro antígeno humano, tal como para o desenvolvimento de doenças auto-imunes. Em outras configurações, os antígenos incluem um ou mais agentes infecciosos de qualquer vírus, bactéria, micobactéria, fungos e parasitas.
10

A composição adjuvante polinucleotídica da presente invenção também pode ser utilizada para aumentar a resposta imunológica contra os antígenos produzidos pelo uso de vacinas de DNA. As seqüências de DNA dessas vacinas que codificam o antígeno podem estar "expostas" ou contidas em um sistema de distribuição, como os lipossomas.
15

Em determinadas configurações, a composição adjuvante polinucleotídica pode ser usada em conjunto com vacinas. Não importa se a vacina contém ou não adjuvantes. As classes incluídas são as vacinas contra doenças infecciosas, as anticancerígenas, as antialérgicas, as contra doenças autoimunes e imunocontraceção.
20

A invenção também contempla o uso de adjuvante polinucleotídico da invenção em combinação com qualquer antígeno rábico apropriado.

Em determinadas configurações, o antígeno rábico pode ser um antígeno rábico natural inativado como o antígeno rábico natural inativado das células renais de criceto (HKC-ICRA) ou antígeno rábico purificado inativado como o antígeno rábico purificado inativado das células renais de criceto (HKC-IPRA).
25

Em determinadas configurações, a composição adjuvante
30

polinucleotídica pode ser usada com a vacina anti-rábica. As vacinas anti-rábicas apropriadas estão comercialmente disponibilizadas ou em desenvolvimento de pesquisa incluindo as vacinas de peptídeo e recombinante, de subunidade, inativada como as vacinas de células diplóides humanas (HDCV), ou vacina anti-rábica, purificada, inativada de células renais de criceto (HKC-IPRV), ou vacina anti-rábica, natural, inativada, de células renais de criceto (HKC-ICRV), ou vacina anti-rábica purificada de células vero (PVRV), ou vacina purificada de células embrionárias de frango (PCEC), ou da vacina purificada de células embrionárias de pato (PDEV),

5 Entretanto, nem todas as vacinas anti-rábicas produzem uma resposta imunológica mediada por células que seja importante nas imunizações de pré e pós-exposição. Quando a composição adjuvante polinucleotídica (por exemplo, PIKA) for administrada com a vacina anti-rábica, as respostas imunes induzidas incluem: respostas não específicas (por exemplo, funções

10 aumentadas dos macrófagos), respostas humorais (por exemplo, produção de anticorpos específicos aumentada), e respostas mediadas por células (por exemplo, produção de citocinas incluindo interferon e interleucina-2).

Em determinadas configurações, a invenção fornece um kit que compreende o adjuvante polinucleotídico e um composto antigênico.

20 Uma composição imunogênica incluindo PIKA pode induzir uma resposta imunológica específica em duas formas: i) imunidade humoral, que inclui a estimulação de células B e a produção de anticorpos ou imunoglobulinas (outras células também estão envolvidas na geração de uma resposta de anticorpos, por exemplo as células apresentadoras de antígenos

25 (APCs, incluindo os macrófagos), e células auxiliaadoras T (Th1 e Th2)), e ii) imunidade mediada por células, que geralmente envolve as células T incluindo os linfócitos T citotóxicos (CTLs), embora outras células também estejam envolvidas na geração de uma resposta CTL (por exemplo, células Th1 e/ou Th2 e APCs). Métodos para a avaliação da resposta imunológica

30 humoral e/ou celular em um indivíduo são conhecidos na técnica. (vide

Exemplos 10, 11, 12 e 13).

Além disso, a composição adjuvante polinucleotídica pode alterar a qualidade da resposta imunológica, ao afetar as subclasses (isotipos) das imunoglobulinas produzidas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 para humanos IgGs; 5 IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 para camundongos IgGs), bem como suas afinidades.

A resposta regulada das células Th1 em camundongos induzirá IgG1, IgG2a, IgG2b e em menor extensão IgG3, e também favorecerá uma resposta imunológica mediada por células a um antígeno. Se a resposta IgG a 10 um antígeno for regulada por células do tipo Th2, isso melhorará predominantemente a produção de IgG1 e IgA.

Os testes de potência de NIH usando a composição adjuvante PIKA e o antígeno rábico purificado inativado de células renais de criceto mostraram surpreendentemente que a potência imunogênica da composição 15 exige uma presença mínima de antígenos rábicos (veja o Exemplo 14). A potência da composição aumenta rapidamente com relação à presença de antígeno rábico adicional de 1 IU. Portanto, a taxa de aumento da potência da composição foi observada como sendo o máximo em torno de 1,5IU a 2,5IU de antígeno rábico presente na composição. O teste de potência de NIH está 20 descrito em: Técnicas Laboratoriais em Hidrofobia, Editado por F X Meslin, M M Kaplan H Koprowski, 4th Edition, ISBN 92 4 1544 1.

Testes usando uma composição adjuvante PIKA e o antígeno rábico purificado inativado de células renais de criceto demonstraram que a potência imunogênica da composição aumentou à medida que a quantidade do 25 adjuvante presente excedeu a do antígeno presente. A potência aumentou quando a proporção de PIKA com relação ao antígeno rábico purificado inativado de células renais de criceto foi aumentada, sendo a proporção preferida superior a 3:1. (vide Exemplo 15).

A invenção contempla os métodos de uso do adjuvante 30 polinucleotídico com um antígeno para, por exemplo, produzir uma resposta

humoral específica e/ou celular específica (por exemplo, de células T1) do antígeno em um indivíduo. A resposta imunológica produzida pode ser uma resposta a um antígeno em um indivíduo normal, ou pode servir para melhorar a resposta imunológica existente (por exemplo, como em um reforço).

Em determinadas configurações, a composição adjuvante PIKA e uma composição imunogênica compreendendo o adjuvante PIKA e o composto antigênico pode ser secada a frio (liofilizada) para uma estabilidade a longo prazo e armazenagem em forma sólida. O método de liofilização é conhecido pelos especialistas na técnica. A reconstituição de uma composição imunogênica contendo PIKA e um composto antigênico demonstrou um nível consistente de eficácia (vide Exemplo 16).

A composição imunogênica pode ser preparada como um injetável, solução líquida, suspensão ou emulsão. A preparação das formulação de uma composição imunogênica desejada é geralmente descrita em Novas Tendências e Desenvolvimentos em Vacinas, editada por Voller et al., University Park Press, Baltimore, Md., USA, 1978. A composição imunogênica da presente invenção pode ser empregada na forma de cápsulas, soluções líquidas, emulsões, suspensões ou elixires para administração oral ou em forma de líquido estéreis como soluções, emulsões ou suspensões. Qualquer carreador inerte é preferivelmente usado, como a salina, ou salina tamponada fosfatada, ou qualquer carreador cujos compostos usados no método da presente invenção apresentem propriedades de solubilidade apropriadas para os métodos da presente invenção.

A composição imunogênica da presente invenção pode ser administrada em indivíduos através de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Em determinadas configurações, a composição imunogênica pode ser administrada parenteralmente, por injeção intramuscular, intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea, ou por inalação. Em outras configurações, a composição imunogênica pode ser aplicada por via retal, vaginal, nasal, oral,

oftálmica, tópica, transdérmica ou intradérmica. Quando a forma de administração for através de injeção, o composto antigênico encapsulado pode permanecer no local da aplicação por até 2 semanas, formando assim um depósito de antígeno que possibilitará uma liberação consistente ou liberação pulsátil *in vivo*. O referido sistema de liberação pode permitir formulações imunogênicas de uma única aplicação a ser produzida por compostos antigênicos que, de outra forma, exigiriam múltiplas injeções para produzir uma resposta imunológica.

Em caso de administração parenteral em uma solução aquosa, por exemplo, a solução deverá ser apropriadamente protegida, se necessário, e o diluente líquido deverá ser antes tornado isotônico com suficiente salina ou glicose. Essas soluções aquosas em particular são especialmente apropriadas para administração intravenosa e intraperitoneal. Nesta conexão, o meio aquoso estéril que pode ser empregado será divulgado aos especialistas da técnica através da presente revelação. O meio de injeção, por exemplo, que poderá ser usado na presente invenção incluem um tampão com ou sem agente de dispersão e/ou preservativos, e óleos comestíveis, óleo mineral, óleo de fígado de bacalhau, esqualene, mono-, di- ou triglicérides, e suas misturas.

A quantidade exata necessária das referidas composições variam de indivíduo para indivíduo, dependendo das espécies, idade, peso e condições gerais individuais, da gravidade da doença, infecção ou condição de tratamento e prevenção, do composto específico usado, da forma de administração e similares. A quantidade apropriada poderá ser determinada por uma pessoa de habilidade ordinária na técnica usando apenas testes rotineiros com as orientações aqui fornecidas. Após a administração inicial, os indivíduos podem receber uma ou diversas imunizações de reforço adequadamente espaçadas.

A revelação acima descreve de forma geral a presente invenção. Os Exemplos a seguir irão ajudar a compreender a presente invenção. Esses

Exemplos são descritos apenas com a finalidade de ilustrar e não pretendem limitar o escopo da invenção. Alterações na forma e substituição por equivalentes são contempladas na medida em que as circunstâncias permitem ou disponibilizam recursos. Embora termos específicos tenham sido aqui empregados, sua finalidade é apenas possibilitar a compreensão descritiva e não estabelecer limites.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA PIKA E AV-PICKCa.

Este exemplo ilustra como o peso molecular foi determinado para o adjuvante de PIKA em comparação com Av-PICKCa.

A eletroforese em gel de agarose é conhecida pelos especialistas da técnica, de modo que apenas as particularidades desta invenção serão aqui descritas. O gel de agarose usado na presente invenção possui uma concentração de 1,5% de agarose. Os marcadores moleculares são 100bp DNA *ladders* de 100bp a 1000bp correspondendo à faixa de peso molecular de $6,6 \times 10^4$ a $6,6 \times 10^5$ Daltons. As amostras de carga são de 4 ul a 1 mg/ml. A Figura 1 mostra um quadro representativo do resultado das amostras no gel de agarose de acordo com as instruções deste parágrafo. Os 5 (cinco) diferentes lotes testados mostraram uma ampla faixa de distribuição de seus pesos moleculares. Os limites superiores de seus pesos moleculares foram de $2,3 \times 10^5$ Daltons para Av-PICKCa a $5,28 \times 10^5$ Daltons para PIKA.

EXEMPLO 2. IMUNE EFICÁCIA DA PIKA COMPARADA COM Av-PICKCa.

Este exemplo mostra a diferença entre a potência de Av-PICKCa com peso molecular máximo de 230.000 Daltons e amostras de PIKA com peso molecular máximo de até 528.000 Daltons.

Três lotes do adjuvante de PIKA de diferentes pesos moleculares e um lote com moléculas com peso molecular correspondendo ao de Av-PIKA foram combinados com o antígeno rábico purificado inativado de células renais de criceto (HKC-IPRA). As composições resultantes foram submetidas ao teste de eficácia de NIH.

O teste de NIH é um estudo comparativo amplo e rigoroso entre a vacina anti-rábica sob investigação e uma vacina anti-rábica padrão. O camundongo vacinado foi infectado com uma cepa de vírus rábico vivo e sua taxa de sobrevivência foi medida. Os diferentes grupos de camundongos foram inoculados com diferentes diluições da vacina anti-rábica. Uma comparação de taxas de sobrevivência entre os grupos de camundongos expostos à vacina padrão e experimental determina a potência da vacina experimental (Técnicas Laboratoriais em Raivas, Editada por F X Meslin, M M Kaplan H Koprowski, 4th Edition, ISBN 92 4 1544 1).

A eficácia de cada vacina combinada foi normalizada com relação à vacina não combinada padrão, sendo que a eficácia da não combinada foi designada como 1, e a eficácia relativa foi designada como o número de vezes em que a eficácia da combinada foi superior à da não combinada. A Tabela 1 resume os resultados. Conforme pode ser visto na Tabela 1, quanto maior o peso molecular do adjuvante de PICKCa, maior a eficácia do aumento da titulação da vacina anti-rábica.

Tipo de Adjuvante	Antígeno	Número da Amostra	Limite Superior do Peso Molecular do Adjuvante	ED ₅₀	Potência (IU/ml)
PIKA	HKC-IPRA	20000304	5,28 x 10 ⁵	2,10	5,00
PIKA	HKC-IPRA	20000907	4,62 x 10 ⁵	2,00	3,98
PIKA	HKC-IPRA	990202	3,96 x 10 ⁵	1,98	3,80
Av-PICKCa	HKC-IPRA	000703	2,30 x 10 ⁵	1,88	3,00
	HKC-IPRA	Controle de Vacina		1,40	1,00

EXEMPLO 3. COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE INTERFERON ENTRE PIKA E Av- PICKCa.

Este exemplo mostra a diferença na habilidade de produzir interferon entre as amostras de Av-PICKCa com peso molecular máximo de

230.000 Daltons e amostras de PIKA com peso molecular máximo de até 1.200.000 Daltons.

Dois lotes de PIKA com limites superiores de peso molecular de $1,2 \times 10^6$ Daltons e $4,6 \times 10^5$ Daltons foram comparados com um lote de Av-PICKCa com limite superior do peso molecular de $2,3 \times 10^5$ Daltons.

Composições de PIKA e Av-PICKCa foram combinadas com um antígeno rábico purificado inativado de células renais de criceto (HKC-IRPA). As composições foram injetadas subcutaneamente no camundongo. Após duas horas, foi determinada a presença de interferon em cada camundongo. O procedimento geral para a medição de interferon é conhecido pelos especialistas da técnica. Resumindo, em uma placa de 96 cavidades, cada cavidade foi inoculada com células L929 a 0,15 ml/cavidade com aproximadamente 30.000 células. Após 3 (três) dias, quando as células cresceram para a confluência, as cavidades foram adicionadas às amostras séricas (0,1 ml/cavidade), sendo que o soro foi diluído de 1:20 a 1:640. Três cavidades foram disponibilizadas para cada amostra diluída. As cavidades foram incubadas durante a noite a uma temperatura de 37°C. As amostras séricas foram eliminadas. Partículas do vírus de estomatite vesicular VSV foram usadas para detectar a produção de interferon. A Tabela 2 mostra a produção de interferon induzida pelas misturas. Conforme pode ser visto na Tabela 2, quanto maior o peso molecular das amostras de PIKA, melhor a produção de interferon induzida.

Tabela 2
Relação entre peso molecular e produção de interferon.

Tipo de Adjuvante	Número Do lote	Faixa superior do peso molecular em Daltons	Número do lote de HKC-IPRA	Relação PIKA: HKC-IPRA	Titulação da Produção de Interferon
PIKA	20010601	$1,20 \times 10^6$	20001205	4:1	868,6
PIKA	200009-7	$4,62 \times 10^5$	20001205	4:1	530,6
Av-PICKCa	000703	$2,30 \times 10^5$	20001205	4:1	46,4

EXEMPLO 4. ESTUDO CLÍNICO DE VACINA HUMANA DE 1996 (COM EFEITOS COLATERAIS TÓXICOS).

Este exemplo mostra que o adjuvante de PICKCa quando combinado com a vacina produz efeitos colaterais de nível inaceitável quando administrado em humanos.

O objetivo do estudo foi avaliar a segurança e resposta imunológica de uma vacina anti-rábica que compreende o adjuvante de PICKCa a uma concentração de 11,95 mg/ml e massa molar de 69.700 (nota: a massa molar não é equivalente a Daltons neste caso, vide Exemplo 5) e o antígeno rábico natural inativado de células renais de criceto (HKC-ICRA). Os resultados e conclusões do estudo clínico acima não tinham sido anteriormente divulgados ao público.

Os 40 pacientes que participaram deste estudo foram divididos em dois grupos de 20 pessoas. Cada grupo recebeu 5 (cinco) doses de 2ml administrados intramuscularmente no dia 1, dia 3, dia 7 e dia 30. Um grupo recebeu o antígeno rábico com adjuvante de PICKCa e o outro grupo recebeu o antígeno rábico com um adjuvante de alum.

Do ponto de vista de segurança, verificou-se a temperatura corporal e os sintomas sistêmicos e locais após 24 horas, 48 horas e 72 horas de cada injeção. As observações foram as seguintes:

Tabela 3

Efeitos Adversos após a injeção de HKC-ICRA com Alum ou PICKCa.

Efeito Colateral	Grupo	Número de Voluntários	Número com Efeito Adverso
Local	PICKCa + HKC-ICRA	20	6
	Alum + HKC-ICRAx5	20	2
Sistêmico	PICKCa + HKC-ICRA	20	4
	Alum + HKC-ICRAx5	20	0

Efeitos adversos sistêmicos incluídos: febre (1), exantema (2), dor

nas juntas (2), gânglio linfático (1), edema de garganta (1). Efeitos adversos locais inclusos: pele avermelhada no local da injeção (6)

5 Pesquisa subsequente feita pelo inventor atribuiu os efeitos colaterais observados à dimensão das moléculas do adjuvante (vide Exemplos 5 e 6).

EXEMPLO 5. RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE PICKCa E SEU PESO MOLECULAR.

Este exemplo mostra que o aumento na concentração do adjuvante de PICKCa resulta em uma composição com maior peso molecular.

10 PICKCa pode ser produzido em diferentes concentrações. Considerou-se que o PICKCa por ser um complexo de polímeros poderia existir em diferentes formas quando preparado em diferentes concentrações. O espalhamento a laser foi usado para esta finalidade. O espalhamento a laser tem sido amplamente usado para determinar a massa molar ponderal média
15 (Mw) e o raio da rotação (Rg). Os instrumentos são comercialmente disponíveis e o processo é conhecido por especialistas da técnica. A Tabela 4 abaixo mostra que o peso molecular de PICKCa observado por espalhamento a laser está correlacionado à sua concentração.

Tabela 4	
Peso molecular observado por espalhamento a laser.	
Concentração de PICKCa (mg/ml)	Massa molar ponderal média
11,95	$6,97 \times 10^4$
2,00	$7,30 \times 10^3$
1,00	$2,00 \times 10^3$

20 **EXEMPLO 6. RELAÇÃO ENTRE PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE PICKCa E PESO MOLECULAR DA VACINA.**

Este exemplo mostra a correlação entre o aumento do peso molecular do adjuvante de PICKCa e o peso molecular resultante da composição que inclui o adjuvante de PICKCa e antígeno rábico natural

inativado de células renais de criceto.

Suspeitava-se também que a concentração da pré-combinação de amostras de PICKCa poderia afetar os antígenos das vacinas. Amostras de PICKCa foram combinadas com antígeno rábico natural inativado de células renais de criceto. O espalhamento a laser foi usado para esta finalidade. O espalhamento a laser tem sido amplamente usado para determinar a massa molar ponderal média (Mw) e o raio da rotação (Rg). Os instrumentos são comercialmente disponíveis e o processo é conhecido por especialistas da técnica. A Tabela 5 mostra que o aumento das concentrações da pré-combinação de PICKCa resultou no aumento de Mw das vacinas rábicas.

Tabela 5		
Relação entre a concentração de pré-combinação de PICKCa e Mw de vacinas rábicas.		
Concentração de PICKCa (mg/ml)	Massa molar ponderal média	Raio da rotação
11,95	29,6 x 10 ⁴	17,2 x 10 ²
4,00	22,2 x 10 ⁴	15,0 x 10 ²
2,00	13,8 x 10 ⁴	11,8 x 10 ²
1,00	5,60 x 10 ⁴	7,55 x 10 ²
1,00	5,29 x 10 ⁴	6,50 x 10 ²

EXEMPLO 7. TESTE DE TOXICIDADE DA PIKA.

Este exemplo mostra a característica de segurança do adjuvante de PIKA quando há restrição quanto ao peso molecular máximo.

Um teste de toxicidade foi conduzido de acordo com as disposições do Padrão Nacional de Medicamentos da China (WS1-XG-050-2000). Resumindo, 5 (cinco) camundongos com peso corporal de aproximadamente 18 a 22 gramas foram intravenosamente inoculados com 0,5 ml/camundongo de solução de cloreto de sódio contendo 0,3 mg de adjuvante de PIKA com

peso molecular superior de aproximadamente 525.000 a 1.000.000 Daltons. O camundongo inoculado foi observado por 7 dias e pesado ao final da observação. A Tabela 6 resume os resultados que comprovaram que o peso molecular de adjuvante de PIKA poderia atingir $1,0 \times 10^6$ Daltons sem toxicidade aparente.

Tabela 6
Teste de toxicidade do adjuvante de PIKA.

Lote nº	Limite superior do peso molecular (Daltons)	Peso corporal pré-teste do camundongo (g)	Quantidade de injeção na veia do rabo	Estado do camundongo ao final do teste	Peso corporal pós-teste do camundongo (g)	Obs.
20000304	$5,25 \times 10^5$	18-19	0,5 ml/camundongo	saudável	23-26	satisfatório
20010103	$5,20 \times 10^5$	18-19	0,5 ml/camundongo	saudável	22-25	satisfatório
20010816	$5,20 \times 10^5$	18-19	0,5 ml/camundongo	saudável	23-25	satisfatório
20010511	$1,00 \times 10^6$	18-20	0,5 ml/camundongo	saudável	24-26	satisfatório

EXEMPLO 8. PIKA EM ESTUDO DE TOXICIDADE DA COMPOSIÇÃO DA VACINA.

O objetivo desta experiência é validar a segurança do adjuvante de PIKA.

10 O adjuvante de PIKA (peso molecular 66.000 a 660.000 Daltons) foi combinado com o antígeno rábico purificado inativado de células renais de criceto (HKC-IPRA) com a proporção de PIKA:HKC-IPRA de 4:1.

15 A composição PIKA e HKC-IPRA da vacina foi comparada com a vacina anti-rábica purificada inativada (IPRV) comercialmente disponível que inclui um adjuvante de alum.

Os camundongos receberam 5 (cinco) doses da composição da vacina no dia 0, dia 3, dia 7, dia 14 e dia 28. A dose administrada foi equivalente a aproximadamente 300 vezes a dose para adulto humano sob

regime de imunização rábica humana normal.

Os resultados da toxicidade encontram-se na tabela 7 abaixo:

Tabela 7						
Observações sobre a segurança após a administração da vacina anti-rábica						
Formulações	Efeito	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 14	Dia 28
HKC-IPRA + PIKA	Alergia	0/20	0/20	0/20	0/20	2/20
HKC-IPRA + PIKA	morte	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
IPRV (incluindo Alum)	Alergia	0/20	0/20	0/20	5/20	?
IPRV (incluindo Alum)	morte	0/20	0/20	0/20	0/20	7/20

Chave: (Ocorrência observada)/(número total)

A conclusão a que se chega é que a combinação de PIKA/HKC-

5 IPRA é mais segura que o IPRV comercialmente disponível.

EXEMPLO 9: USO SEGURO DO ADJUVANTE DE PIKA EM HUMANOS.

Em 2002, 5 (cinco) voluntários foram imunizados com a
composição PIKA (peso molecular 66.000 a 660.000 Daltons) e o antígeno
rábico purificado inativado de células renais de criceto (HKC-IPRA). Os
10 voluntários receberam a composição da vacina no dia 0, dia 3, dia 7, dia 14 e
dia 30.

Os efeitos colaterais sistêmicos ou locais foram observados em cada
um dos pacientes após as vacinações.

A potência da vacina foi medida usando o teste padrão de NIH e os
15 resultados encontram-se na tabela 8 abaixo:

Tabela 8		
Observações da potência da vacina anti-rábica		
Dia	ED50	Anticorpo de neutralização IU/ml
0	0	0
14	> 1,9	> 1,84
45	2,35	5,17

Os resultados indicam que a composição da vacina de PIKA e HKC-
IPRA induz uma resposta imunológica específica e produz os anticorpos de

neutralização protetora.

EXEMPLO 10. TESTE DE PÓS-EXPOSIÇÃO (IMUNIDADE MEDIADA POR CÉLULAS).

O teste de pós-exposição é a prova mais definitiva de que a vacina possui habilidade de erradicar os patógenos do corpo do hospedeiro após a infecção. Assim sendo, é indicação de resposta imunológica mediada por células induzida por vacina.

Nos testes de pós-exposição os camundongos foram inoculados com cepa selvagem de vírus rábicos e subseqüentemente inoculados com o antígeno rábico purificado inativado de células renais de criceto (HKC-IPRA) em combinação com adjuvante de PIKA (peso molecular variando de $1,65 \times 10^5$ a $1,2 \times 10^6$ Daltons), ou HKC-IPRA em combinação com adjuvante de hidróxido de alumínio (alum), uma vacina anti-rábica, purificada, de células vero (PVRV) comercialmente disponível ou soluções salinas tamponadas fosfatadas (PBS). Os resultados mostram de forma conclusiva que o adjuvante de PIKA melhorou as taxas de sobrevivência, veja a tabela 9.

Tabela 9		
Teste de desafio pós-exposição		
9.1 Taxa de morte após tratamento		
Grupos	Dose letal pré-determinada 80%	Dose letal pré-determinada 50%
PIKA + HKC-IPRA	2/20	0/20
Alum + HKC-IPRA	10/20	9/20
PVRV	16/20	3/20
Controle (PBS)	15/20	14/20
9.2 Taxa de sobrevivência após tratamento		
Grupos	Dose letal pré-determinada 80%	Dose letal pré-determinada 50%
PIKA + HKC-IPRA	90,00%	100,00%
Alum + HKC-IPRA	50,00%	55,00%
PVRV	20,00%	85,00%
Controle (PBS)	25,00%	30,00%

Os camundongos infectados com a injeção subcutânea de vírus rábicos foram tratados com a vacina após 6 horas, 1 dia, 2 dias, e 3 dias a

partir da inoculação.

EXEMPLO 11. PRODUÇÃO DE INTERFERON-GAMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA MEDIADA POR CÉLULAS ESPECÍFICAS DO ANTÍGENO.

5 A produção de interferon-gama é um indicador da atividade da imunidade mediada por células.

Neste experimento, amostras sanguíneas foram tomadas de pacientes do estudo e dois indivíduos de controle. Os pacientes voluntários receberam vacina anti-rábica PIKA, que continham PIKA (peso molecular variando de 66.000 a 660.000 Daltons) e antígeno rábico purificado inativado de células renais de criceto (HKC-IPRA) 2,5 anos antes da coleta das amostras de sangue.

Os resultados da figura 2 ilustram a diferença significativa no interferon-gama produzido pelos pacientes do estudo quando comparado com os indivíduos de controle.

15 Os monócitos isolados das amostras sanguíneas foram incubados com o mesmo HKC- IPRA usado no estudo original. Após 3 dias da incubação, os sobrenadantes sem células foram colhidos e os interferons-gama dos sobrenadantes foram avaliados por ELISPOT específico de citocina. Foi observado o efeito dose dependente.

20 As conclusões das observações acima foram:

- a vacina anti-rábica que inclui o adjuvante de PIKA da invenção possui habilidade para induzir a produção de interferon-gama e, por implicação, produzir uma resposta imunológica mediada por células.
- 25 • a resposta do interferon-gama é específica (ou seja, a resposta foi direcionada ao antígeno rábico em oposição à reação não específica). Se a resposta do interferon-gama não fosse específica, não haveria variação no nível da produção de interferon-gama no sangue do paciente vacinado quando a
30 concentração do antígeno estimulante foi aumentada.

EXEMPLO 12: TESTE DE EFICÁCIA DA PIKA.

O objetivo desta experiência é demonstrar a habilidade da PIKA em produzir interferon-gama e interleucina 12 (IL-12).

Amostras de esplenócitos de camundongo saudável normal foram incubados por um período de três dias na presença de PIKA (peso molecular variando de 66.000 a 660.000) em um ambiente limpo. Ao final do período o nível de citocinas nos sobrenadantes foi determinado pelos testes ELISA específicos para interferon-gama e IL-12(p40). Os resultados do experimento são apresentados na tabela 10 abaixo:

PIKA ug/ml	IFN-gama pg/ml	IL-12P40 pg/ml
0	3	0
0,4	23	91
2	22	98
10	30	134
50	179	186
100	559	N/A
250	1340	N/A

A conclusão a que se chega a partir da experiência acima é que a PIKA permite uma produção dose dependente de interferon-gama e citocinas IL-12 e como tal induz uma resposta imunológica mediada por células.

Em uma experiência posterior, 4 (quatro) camundongos receberam 500ug/camundongo de PIKA (peso molecular variando de 66.000 a 660.000 Daltons) por injeção peritoneal. Uma solução tamponada fosfatada foi usada como teste de controle negativo. 5 (cinco) horas após a injeção, uma amostra de sangue foi retirada e o soro preparado. O nível sérico de citocinas foi determinado pelos testes ELISA específicos para IL-12(p40) e interferon-gama. Os resultados do experimento são apresentados na tabela 11 abaixo:

Grupo	IFN-gama pg/ml	IL-12P40 pg/ml
PBS	4	2
PIKA	410	40

A conclusão a que se chega a partir da experiência acima é que a

PIKA é eficaz na estimulação de resposta imunológica mediada por célula.

EXEMPLO 13: USO DA PIKA COM ANTÍGENO RÁBICO PURIFICADO INATIVADO DE CÉLULAS VERO.

O objetivo desta experiência é avaliar a eficácia da PIKA em
5 combinação com uma vacina anti-rábica, purificada, de células vero (PVRV).

A PIKA, com peso molecular variando de 66.000 a 660.000 Daltons, foi combinada com PVRV, uma forma da vacina anti-rábica. O teste de NIH foi usado para avaliar a potência da composição resultante da vacina. Os resultados foram apresentados na tabela 12 abaixo:

Tabela 12			
Resultados do Teste de NIH de PIKA e vacina anti-rábica purificada e inativada de células vero.			
Composição da vacina	Antígeno	Adjuvante	Potência da composição (IU/ml)
PVRV	0,02 IU/ml	n/a	0,46
PRVR + PIKA	0,02 IU/ml	PIKA	3,68

10 A conclusão a que se chega é que a PIKA aumenta a potência da vacina anti-rábica purificada inativada de células vero.

EXEMPLO 14. DOSE DE ANTÍGENO.

Esta experiência demonstra a exigência de uma quantidade mínima de antígeno rábico purificado inativado de células renais de criceto (HKC-
15 IPRA) presente na composição em conjunto com o adjuvante de PIKA (peso molecular variando de 66.000 a 660.000 Daltons) para produzir um nível de resposta imunológica substancialmente aumentado.

Maior quantidade de antígeno rábico foi adicionada à constante de 0,1 mg de adjuvante de PIKA. A potência foi medida usando-se o teste de
20 potência de NIH padrão da vacina anti-rábica. Após o aumento inicial da potência previsto, um notável e excepcional aumento foi observado antes da

estabilização da potência, conforme esperado com a adição do antígeno. (veja a tabela 13).

Tabela 13		
Potência da vacina com quantidades aumentadas de antígeno rábico purificado inativado de células renais de criceto.		
HKC-IPRA (IU)	HKC-IPRA + 0,1 mg PIKA (IU)	Aumento marginal na potência
0,25	0,42	-
0,51	1,43	3,88
1,01	2,73	2,60
1,40	6,07	8,56
2,07	19,78	20,46
2,91	21,38	1,90

O aumento marginal na potência é o aumento observado na potência da vacina HKC-IPRA/PIKA com a adição de 1 IU de HKC-IPRA.

5 A conclusão a que se chega é que uma mínima presença de antígeno é necessária antes que a resposta imunológica substancial seja induzida. Além disso, antígeno excessivo além desse ponto de gatilho produz apenas um retorno incremental marginal na potência.

EXEMPLO 15. PROPORÇÃO DE ADJUVANTE DO ANTÍGENO.

10 Esta experiência mostra a mistura ideal do antígeno rábico purificado inativado de células renais de criceto (HKC-IPRA) com o adjuvante de PIKA (peso molecular variando de 66.000 a 660.000).

15 Várias quantidades de antígeno foram misturadas a várias quantidades de adjuvante com PBS adicionada para assegurar um volume geral consistente. A potência das vacinas resultantes foi determinada usando o

teste de potência de NIH. Os resultados encontram-se na tabela 14.

Uma consideração aos resultados do teste indica que a combinação de vacina ideal é a da PIKA com o antígeno na proporção de pelo menos 3 para 1.

Amostras	HKC-IPRA (ml)	PIKA (ml)	PBS (ml)	Proporção (PIKA:HKC-IPRA)	ED50	Potência (IU/ml)
A	0,20	0,80	-	4,0 a 1	2,65	7,84
B	0,20	0,70	0,10	3,5 a 1	2,46	5,20
C	0,20	0,60	0,20	3,0 a 1	2,40	4,22
D	0,20	-	0,80	0 a 1	1,85	1,43
Padrão			na	na	2,52	6,70

5 EXEMPLO 16. ARMAZENAMENTO LIOFILIZADO DE PIKA E PIKA COMBINADA COM UMA VACINA ANTI-RÁBICA.

Este exemplo mostra que a PIKA é estável na forma liofilizada.

A tecnologia de liofilização tem sido usada para armazenamento a longo prazo de vacinas anti-rábicas por até três anos. O inventor pretendeu
 10 testar se o armazenamento liofilizado da PIKA (com peso molecular variando de 66.000 a 660.000) e vacinas anti-rábicas contendo PIKA seria vantajoso. As seguintes composições foram usadas para teste de armazenamento liofilizado: i) PIKA não esfriada adicionada ao antígeno rábico purificado inativado de células renais de criceto (HKC-IPRA) liofilizado reconstituído,
 15 ii) composição de PIKA liofilizada reconstituída mais HKC-IPRA, iii) vacina anti-rábica comercial liofilizada reconstituída (sem adição de PIKA) e iv) vacina anti-rábica comercial não esfriada.

A Tabela 15 mostra que as vacinas anti-rábicas contendo PIKA e

PIKA liofilizada são vacinas anti-rábicas ideais para armazenamento a longo prazo.

Tabela 15			
Efeitos do armazenamento liofilizado sobre a potência das vacinas anti-rábicas.			
Amostra	ED50	Potência relativa	IU/ml
i) vacina anti-rábica liofilizada diluída em PIKA	2,89	2,34	15,71
ii) vacina anti-rábica contendo PIKA liofilizada diluída em PBS	3,00	3,00	20,23
iii) vacina anti-rábica comercial liofilizada diluída em PBS	1,85	0,21	1,43
iv) vacina anti-rábica padrão não esfriada	2,52	1,00	6,70

A presente invenção foi descrita com referência à configurações específicas, assim sendo, fica entendido que as configurações são ilustrativas e que o escopo da invenção não está, portanto, limitado. Configurações alternativas da presente invenção ficarão evidentes aos especialistas na técnica a qual a presente invenção pertence. As referidas configurações alternativas são consideradas como pertencendo ao espírito e escopo da presente invenção. Portanto, o escopo da presente invenção é descrito pelas reivindicações anexas e é substanciado pela descrição precedente.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição adjuvante polinucleotídica compreendendo um ácido poliriboinosínico - poliribocitidílico (PIC), um antibiótico e um íon positivo, caracterizada pelo fato de que a composição contém moléculas da composição adjuvante polinucleotídica heterogêneas quanto ao peso molecular, sendo que o peso molecular varia de aproximadamente 66.000 a 1.200.000 Daltons ou a dimensão varia de aproximadamente 6,4 a 24,0 Svedbergs onde;

- o antibiótico é a canamicina, neomicina, antraciclina, sulfato de butirosina, gentamicina, higromicina, amicacina, dibecacina, nebramicina, metrizamida, puromicina, estreptomicina ou estreptozocina;

- o íon positivo é o cálcio, cádmio, lítio, magnésio, cério, césio, cromo, cobalto, deutério, gálio, iodo, ferro ou zinco; sendo que o íon positivo é na forma de sais inorgânicos ou complexos orgânicos;

- a fonte de íons positivos é o cloreto, carbonato, fluoreto, hidróxido, fosfatos ou sulfato de cálcio;

2. Composição adjuvante da reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a composição adjuvante polinucleotídica possui peso molecular variando aproximadamente de 300.000 a 1.200.000 Daltons ou dimensão molecular variando aproximadamente de 12,8 a 24,0 Svedbergs.

3. Composição adjuvante da reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a composição adjuvante polinucleotídica possui peso molecular variando aproximadamente de 66.000 a 660.000 Daltons ou dimensão molecular variando aproximadamente de 6,4 a 18,3 Svedbergs.

4. Composição adjuvante da reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a composição adjuvante polinucleotídica possui peso molecular variando

aproximadamente de 300.000 a 660.000 Daltons ou dimensão molecular variando aproximadamente de 12,8 a 18,3 Svedbergs.

5. Composição adjuvante da reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a composição adjuvante polinucleotídica possui peso molecular médio igual ou superior a 150.000 Daltons ou dimensão molecular média igual ou superior a 9,3 Svedbergs.

6. Composição adjuvante da reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a composição adjuvante polinucleotídica possui peso molecular médio igual ou superior a 250.000 Daltons ou dimensão molecular média igual ou superior a 11,8 Svedbergs.

7. Composição adjuvante da reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a composição adjuvante polinucleotídica possui peso molecular médio igual ou superior a 350.000 Daltons ou dimensão molecular média igual ou superior a 15,3 Svedbergs.

8. Composição adjuvante das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que o antibiótico é o sulfato de canamicina e o íon positivo é fornecido pelo cloreto de cálcio.

9. Kit compreendendo uma composição adjuvante de qualquer uma das reivindicações de 1 a 8 e um composto antigênico.

10. Composição imunogênica compreendendo uma composição adjuvante polinucleotídica de qualquer uma das reivindicações de 1 a 9 e um antígeno.

11. Composição imunogênica da reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a fonte do antígeno é um animal humano, não humano, planta, bactéria, fungo, vírus, parasita ou câncer.

- 12.** Composição imunogênica da reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que o antígeno é o antígeno rábico.
- 13.** Composição imunogênica da reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que o antígeno é um antígeno rábico purificado inativado.
- 14.** Composição imunogênica da reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a presença do antígeno rábico purificado inativado de células renais de criceto é superior a 1 Unidade Internacional.
- 15.** Composição imunogênica da reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a proporção da composição adjuvante polinucleotídica para antígeno rábico purificado inativado de células renais de criceto é superior a 3 para 1.
- 16.** Composição imunogênica de qualquer uma das reivindicação 1 a 15 caracterizada pelo fato de que a composição imunogênica compreende um adjuvante capaz de produzir uma resposta imunológica mediada por células e/ou humoral específica combinada melhorada.
- 17.** Composição adjuvante ou imunogênica de qualquer uma das reivindicação 1 a 16, caracterizada pelo fato de que a composição imunogênica, ou a composição adjuvante contida na composição imunogênica é na forma sólida ou líquida ou em solução ou em suspensão.
- 18.** Composição adjuvante ou imunogênica de qualquer uma das reivindicação 1 a 17, caracterizada pelo fato de que a composição imunogênica e/ou a composição adjuvante é liofilizada.
- 19.** Uso da composição adjuvante polinucleotídica de qualquer uma das reivindicações 1 a 18 para a preparação de um medicamento para aumentar a resposta imunogênica de um hospedeiro.

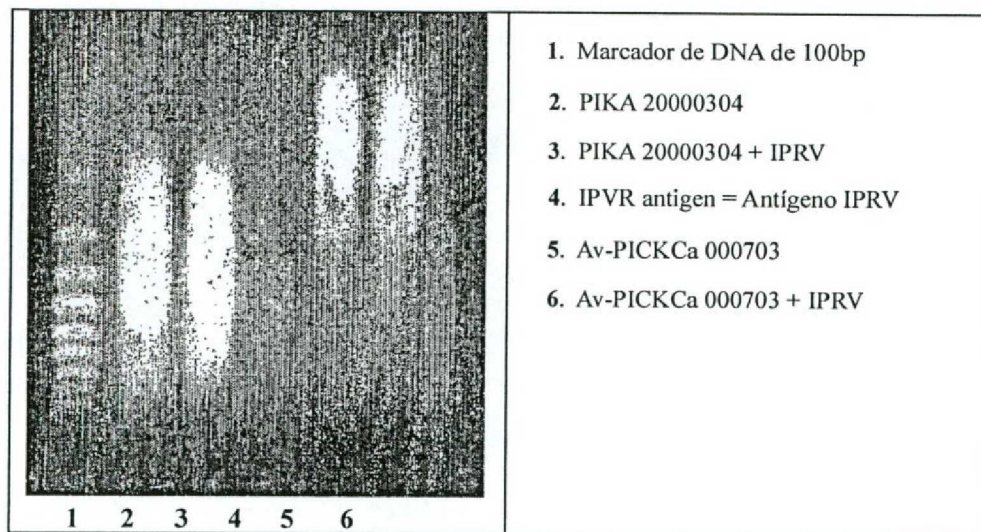


FIG. 1

Produção de Interferon-gama in vitro

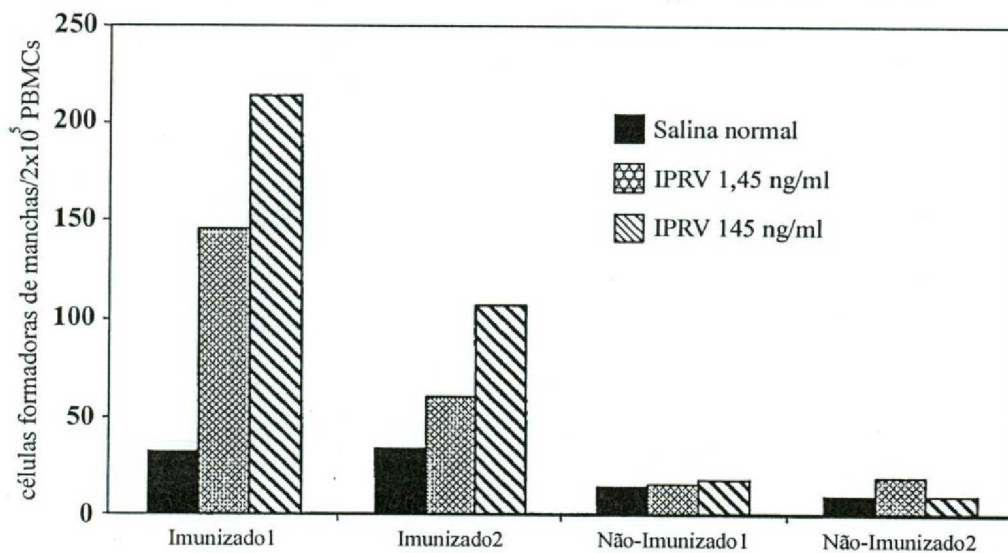


FIG. 2