

(11) Número de Publicação: **PT 1109574 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 39/02 (2007.10) **A61K 39/245** (2007.10)
A61K 39/12 (2007.10)

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

(22) Data de pedido: 1999.09.08	(73) Titular(es): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS, S.A. RUE DE L'INSTITUT 89 1330 RIXENSART BE
(30) Prioridade(s): 1998.09.11 GB 9819898	
(43) Data de publicação do pedido: 2001.06.27	(72) Inventor(es): MONCEF MOHAMED SLAOU BE PIERRE G. VANDEPAPELIERE BE
(45) Data e BPI da concessão: 2008.04.16 114/2008	(74) Mandatário: PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VACINA CONTRA DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMITIDAS**

(57) Resumo:

RESUMO

"VACINA CONTRA DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMITIDAS"

É descrito um método de administração de uma vacina a mulheres para prevenir ou evitar infecções associadas com patogénicos que causam doenças sexualmente transmitidas. A vacina compreende um ou mais antigénios para a prevenção ou tratamento de doenças sexualmente transmitidas, por exemplo, uma glicoproteína D de HSV ou um seu fragmento imunológico, e um adjuvante, especialmente, um adjuvante indutor de TH-1. É também descrita a utilização dos componentes da vacina para a formulação de uma composição de vacina para a prevenção ou tratamento de doenças sexualmente transmitidas em indivíduos do sexo feminino.

DESCRIÇÃO

"VACINA CONTRA DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMITIDAS"

A presente invenção refere-se a um ou mais antigénios para a prevenção de doenças sexualmente transmitidas e a sua utilização na formulação de uma vacina, para administração a indivíduos humanos do sexo feminino, para a prevenção de infecções associadas com patogénicos que causam doenças sexualmente transmitidas. A invenção refere-se também a um método de administração da vacina a mulheres para evitar infecções associadas com patogénicos que causam doenças sexualmente transmitidas.

Os patogénicos que causam doenças sexualmente transmitidas (DST) são conhecidos e existe uma necessidade premente de vacinas eficazes para evitar estes estados.

Por vezes as doenças sexualmente transmitidas são causadas por um ou mais patogénicos. As vacinas de combinação, capazes de evitar um ou mais DST são, deste modo, também necessárias.

Straus *et al.* (*Lancet* 1994 343: 1460-1463) descrevem um ensaio de vacinação controlado por placebo com glicoproteína D recombinante do vírus herpes simplex do tipo 2 para imunoterapia do herpes genital.

Thoelen *et al.* (*Vacina* 1998 16: 708-714) descrevem a segurança e imunogenicidade de uma vacina para a hepatite B formulada com um novo sistema adjuvante.

Straus *et al.* (*Journal of Infectious Diseases* 1997 176: 1129-1134) descreve imunoterapia de herpes genital recorrente com as glicoproteínas D e B do vírus herpes simplex recombinante do tipo 2, e proporciona os resultados de um ensaio de vacinação controlado por placebo.

O documento WO92/16231 descreve uma vacina compreendendo a glicoproteína HSV D ou um seu fragmento imunológico em conjunto com lípido A monofosforilo de 3-O-desacilado (3D-MPL) e um veículo adequado.

O documento US 5776468 descreve composições de vacina compreendendo pequenas partículas de 3D-MPL, incluindo uma vacina compreendendo uma glicoproteína D de HSV ou um seu fragmento imunológico.

A presente invenção proporciona a utilização de uma glicoproteína D de HSV ou um seu fragmento imunológico e um adjuvante na preparação de uma vacina para administração a um indivíduo humano do sexo feminino HSV1-/2_ para a prevenção da doença de herpes genital.

De um modo preferido, o adjuvante é um adjuvante indutor de TH-1.

Os adjuvantes adequados para utilização na invenção incluem os bem conhecidos na técnica de formulação de vacinas. Por "adjuvante indutor de TH-1" entende-se um adjuvante que é um estimulador preferencial da resposta das células TH1.

Um sinal reconhecido de que a resposta de TH1 foi estimulada é a produção intensificada de citocinas do tipo TH1, e. g., IFN- γ e IL-2. A secreção de IFN- γ está associada com respostas protectoras contra patogénicos intracelulares, incluindo parasitas, bactérias e vírus. A activação de leucócitos por IFN- γ estimula a morte de patogénicos intracelulares e aumenta a expressão de receptores Fc. A citotoxicidade directa pode também ocorrer, especialmente em sinergismo com linfotoxina (outro produto das células TH1). A IFN- γ é também um indutor e um produto das células NK, que são importantes efectores inatos de protecção. As respostas do tipo TH1, através de IFN- γ ou outros mecanismos, proporcionam ajuda preferencial para isotipos de imunoglobulinas IgG2a de murino.

Em contraste, as respostas do tipo TH-2 estão associadas com mecanismos humorais e a secreção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e factor-beta de necrose tumoral.

Os adjuvantes que são capazes de estimulação preferencial da resposta celular de TH1 são descritos nos Pedidos Internacional de Patente N° WO 94/00153 e WO 95/17209.

O Lípido A monofosforilo 3-De-O-acilado (3D-MPL) é um destes adjuvantes. Isto é conhecido do documento GB 2220211 (Ribi). Quimicamente, é uma mistura de lípido A monofosforilo 3-De-O-acilado com 4, 5 ou 6 cadeias aciladas e é preparado por Ribi Immunochem Montana. Uma forma preferida de "partícula pequena" do lípido A monofosforilo 3-De-O-acilado é divulgada no documento EP 0 689454B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA).

Nesta "pequena partícula" de 3-DMPL, as partículas de 3D-MPL são suficientemente pequenas para serem esterilizadas por

filtração através de uma membrana de 0,22 micron (como descrito na Patente Europeia número 0689454).

Outro adjuvante preferido que pode ser utilizado na presente invenção compreende QS21, uma fracção de Hplc não tóxica derivada da casca de Quiluaia Saponaria Molina. Opcionalmente isto pode ser misturados com lípido A monofosforilo 3-De-O-acilado (3D-MPL), opcionalmente em conjunto com um veículo.

O método de produção de QS21 é revelado (como QS21) na patente US N° 5057540 e está disponível em Aquilla Pharmaceuticals.

As formulações de adjuvante não reactogénico contendo QS21 foram descritas previamente (documento WO 96/33739). Foi demonstrado que estas formulações compreendendo QS21 e colesterol eram adjuvantes de estimulação TH1 bem sucedidos, quando formulados em conjunto com um antigénio. Estas composições de vacina que fazem parte da presente invenção pode incluir a combinação de QS21 e colesterol.

Outros adjuvantes que são estimuladores preferenciais da resposta de células TH1 incluem oligonucleótidos imunomoduladores, por exemplo, sequências CpG não metiladas como revelado no documento WO 96/02555.

As combinações de diferentes adjuvantes estimulantes de TH1, tais como as aqui mencionadas, são também contempladas como proporcionando um adjuvante que é um estimulador preferencial da resposta de células TH1. Por exemplo, o QS21 pode ser formulado em conjunto com 3D-MPL. A proporção de QS21:3D-MPL estará

tipicamente na ordem de 1:10 a 10:1; de um modo preferido, 1:5 a 5:1 e, frequentemente, substancialmente 1:1. O intervalo preferido para sinergia óptima é 2,5:1 a 1:1 de 3D MPL:QS21.

De um modo preferido, um veículo está também presente na composição de vacina de acordo com a invenção. O veículo pode ser uma emulsão óleo-em-água, ou um sal de alumínio. Podem também ser utilizados outros sais minerais como um veículo, tais como sais de cálcio, ferro ou zinco. Outros veículos incluem polifosfazeno, lipossomas e ISCOMS.

As emulsões óleo-em-água não tóxicas, contêm, de um modo preferido, um óleo não tóxico, e. g., esqualano ou esqualeno, um emulsionante, e. g. Tween 80, num veículo aquoso. O veículo aquoso pode ser, por exemplo, soro fisiológico tamponado com fosfato. Uma emulsão óleo-em-água preferida compreende um óleo metabolizável, tal como esqualeno, alfa tocoferol e Tween 80. Adicionalmente, a emulsão óleo-em-água pode conter span 85 e/ou lecitina.

Tipicamente, para administração a humanos, QS21 e 3D MPL estarão presentes numa vacina no intervalo de 1 µg-500 µg, tal como 10-100 µg, de um modo preferido, 10 µg-50 µg por dose. Tipicamente, o óleo-em-água compreenderá de 2 a 10% de esqualeno, de 2 a 10% de alfa tocoferol e de 0,3 a 3% de tween 80. De um modo preferido, a proporção de esqualeno:alfa tocoferol é igual ou inferior a 1, uma vez que proporciona uma emulsão mais estável. O Span 85 pode também estar presente ao nível de 1%. Em alguns casos, pode ser vantajoso que as vacinas da presente invenção contenham ainda um estabilizador.

Uma formulação de adjuvante particularmente potente envolvendo QS21, 3D-MPL e tocoferol numa emulsão óleo-em-água é descrita no documento WO 95/17210.

Num aspecto preferido, o hidróxido de alumínio (alúmen) ou fosfato de alumínio serão incluídos na composição de vacina que é utilizada ou preparada de acordo com a invenção.

Num aspecto particularmente preferido, os antigénios na composição de vacina utilizados ou preparados de acordo com a invenção são combinados com 3D-MPL e alúmen.

As vacinas empregues na presente invenção podem, se desejado, compreender moléculas de adjuvante de fórmula geral (I):



em que, n é 1-50, A é uma ligação ou -C(O)-, R é alquiloC₁₋₅₀ ou FenilalquiloC₁₋₅₀.

Uma forma de realização da presente invenção consiste de uma formulação de vacina compreendendo um éter de polioxietileno de fórmula geral (I), em que n está entre 1 e 50, de um modo preferido, 4-24, de um modo muito preferido, 9; o componente R é C₁₋₅₀, de um modo preferido, alquiloC_{4-C20} e de um modo muito preferido, alquiloC₁₂, e A é uma ligação. A concentração dos éteres de polioxietileno devem estar no intervalo 0,1-20%, de um modo preferido, de 0,1-10%, e de um modo muito preferido, no intervalo 0,1-1%. Os éteres de polioxietileno são seleccionados a partir do seguinte grupo: éter de polioxietileno-9-laurilo,

éter de polioxietileno-9-estearilo, éter de polioxietileno-8-estearilo, éter de polioxietileno-4-laurilo, éter de polioxietileno-35-laurilo e éter de polioxietileno-23-laurilo. Os éteres de polioxietileno, tais como, éter de polioxietilenolaurilo são descritos no Índice Merck (12^a ed:entrada 7717).

O HSV-2 é o agente etiológico primário do herpes genital. HSV-1 é o agente causador de herpes labial. Em conjunto, estes vírus são caracterizados pela sua capacidade para induzir doenças agudas e para estabelecer uma infecção latente, primariamente em células neuronais dos gânglios.

O documento WO 92/16231 proporciona mais informação de fundo sobre herpes genital e descreve uma vacina que pode ser utilizada para tratar pessoas susceptíveis a infecções HSV compreendendo glicoproteína D de HSV ou um seu fragmento imunológico em conjunção com lípido de monofosforil A 3-O-desacilado e um veículo adequado.

A descrição do documento WO 92/16231 proporciona detalhes da glicoproteína D, seus fragmentos imunológicos, e 3-DMPL e métodos para o obter. A descrição descreve alguns testes promissores de uma vacina candidata em modelos animais, mas não são dados resultados em humanos.

Num aspecto preferido, a utilização de acordo com a invenção refere-se à prevenção de infecções com HSV-2.

A vacina que pode ser utilizada na presente invenção compreende glicoproteína D ou um seu fragmento imunológico que é tipicamente de HSV-2.

A glicoproteína D está localizada na membrana viral e é também encontrada no citoplasma de células infectadas (Eisenberg R.J. *et al.*; *J of Virol* 1980 35 428-435). Compreende 393 aminoácidos incluindo um péptido sinal e possui um peso molecular de aproximadamente 60 kD. De todas as glicoproteínas de envelope de HSV esta é provavelmente a melhor caracterizada (Cohen *et al.* *J. Virology* 60 157-166). *In vivo* sabe-se que desempenha um papel central na ligação viral às membranas celulares. Para além disso, a glicoproteína D demonstrou ser capaz de induzir anticorpos neutralizantes *in vivo* (Eing *et al.* *J. Med. Virology* 127:59-65). Todavia, o vírus HSV-2 latente pode ainda ser reactivado e induzir recorrência da doença apesar da presença de um título elevado de anticorpos neutralizantes nos soros dos doentes.

Como descrito no documento WO 92/16231, uma forma de realização preferida deste é uma glicoproteína D de HSV-2 truncada de 308 aminoácidos que compreende os aminoácidos 1 a 306 da glicoproteína que ocorre naturalmente com a adição de asparagina e glutamina na extremidade C-terminal da proteína truncada, desprovida da sua região de âncora na membrana. Esta forma da proteína inclui o péptido sinal que é clivado para produzir uma proteína de 283 aminoácidos madura. A produção de uma tal proteína em células de ovário de Hamster Chinês foi descrita no documento EP-B-139417.

A forma truncada madura, utilizada de um modo preferido, na formulação de vacinas dentro do âmbito da invenção pode ser designada gD2t recombinante (rgD2t) ou simplesmente (como aqui, abaixo) gD2t.

O antigénio de HSV pode ser conjugado quimicamente, ou de outro modo, com um veículo particulado, como descrito no documento WO 92/16231.

Num aspecto preferido, a vacina para utilização na invenção compreende gD2t, 3-DMPL (especialmente 3-DMPL de partícula pequena) e hidróxido de alumínio (alúmen).

As vacinas de combinação administradas ou preparadas de acordo com a presente invenção conterão uma quantidade imunoprotectora dos antigénios e podem ser preparadas e administradas através de técnicas convencionais.

A preparação da vacina é geralmente descrita em *New Trends and Developments in Vaccines*, editado por Voller *et al.*, University Park Press, Baltimore, Maryland, E.U.A. 1978. A encapsulação em lipossomas é descrita, for exemplo, por Fullerton, Patente U.S. 4235877. A conjugação de proteínas com macromoléculas é revelada, por exemplo, por Likhite, Patente U.S. 4372945 e por Armor *et al.*, Patente U.S. 4474757.

A quantidade de antigénio em cada dose de vacina é seleccionada como uma quantidade que induz uma resposta imunoprotectora ou terapêutica sem efeitos colaterais adversos significativos em vacinas típicas. Essa quantidade irá variar dependendo de qual imunogénio específico é empregue. Geralmente, é esperado que cada dose compreenda 1-1000 µg de proteína, de um modo preferido, 2-100 µg, de um modo muito preferido, 4-40 µg. Uma quantidade óptima para uma vacina particular pode ser investigada através de estudos convencionais envolvendo a observação de títulos de anticorpo e outras respostas nos

indivíduos. Após uma vacinação inicial, os indivíduos podem receber um reforço dentro de cerca de 4 semanas.

A quantidade de antigénio em cada dose de vacina é uma quantidade que induz uma resposta imunoprotectora ou terapêuticamente eficaz sem efeitos colaterais adversos significativos em vacinas mulheres típicas.

Geralmente é esperado que cada dose irá compreender 1-1000 µg de antigénio, de um modo preferido, 2-100 µg, de um modo muito preferido, 4-40 µg. O indutor adjuvante de TH-1, por exemplo, 3-DMPL, estará normalmente presente num intervalo de 10-200 µg, de um modo preferido, 25-75 µg, especialmente cerca de 50 µg por dose.

A quantidade de veículo pode variar e pode ser seleccionada de acordo com o conhecimento de um especialista na técnica. Se for utilizado hidróxido de alumínio (alúmen) ou fosfato de alumínio, a quantidade empregue deverá geralmente estar no intervalo 100-1000 µg, por exemplo, 250-750 µg, de um modo preferido, cerca de 500 µg por dose de vacina.

Quantidades típicas de cada componente na vacina são antigénio (20 µg), alúmen (500 µg) e um adjuvante, especialmente um adjuvante indutor de TH-1, tal como 3-DMPL (50 µg).

Num aspecto preferido, a vacina para utilização na invenção compreende gD2t, 3-DMPL (especialmente 3-DMPL de partícula pequena) e hidróxido de alumínio (alúmen).

Num regime preferido, a vacina pode ser fornecida a intervalos de 0, 1 e 6 meses. Outros regimes de dosagem,

incluindo doses de reforço, podem também ser utilizados. A vacina pode ser administrada intramuscularmente.

A preparação de uma vacina de acordo com a invenção pode ser realizada através de técnicas convencionais, tal como descrito no documento WO 92/16231. O método envolve, tipicamente, misturar um ou mais antigénios derivados de, ou associadas com, uma DST com um adjuvante, especialmente um adjuvante indutor de TH-1, e opcionalmente um veículo como aqui descrito acima. A composição de vacina resultante pode ser utilizada para administração a indivíduos do sexo feminino de acordo com o método da invenção, especialmente mulheres sexualmente activas que sofrem de, ou estão em risco de contrair uma DST.

Geralmente, as mulheres estarão num intervalo de idade de 12-70 anos, mais usualmente adolescentes e mulheres de 60 ou menos, por exemplo, 14-60, tipicamente 18-45 como no estudo descrito abaixo. Num aspecto, um grupo de mulheres adequado inclui aquelas que sofrem de, ou estão em risco de contrair infecção de herpes genital. A utilização da invenção pode, por exemplo, ser aplicada em companheiros seronegativos saudáveis de indivíduos com doença de herpes genital.

A invenção é ilustrada, sem limitação, pelos exemplos seguintes, apresentando resultados quando uma vacina de herpes foi administrada a indivíduos do sexo feminino. Podem ser obtidos resultados semelhantes com vacinas contra outras DST, tais como HPV e com vacinas de combinação ou polivalentes contra mais do que uma DST, especialmente vacinas de combinação compreendendo HSV-2 gD ou fragmentos imunológicos deste, tais como gD2t as aqui descrito acima.

EXEMPLO 1 - CONCEPÇÃO DO ESTUDO

Vacina sob estudo Vacina candidata para Herpes simplex de SmithKline Beecham Biologicals (gD2t-20µg) com Alúmen (500 µg) e 3-DMPL (50 µg).

Título Um estudo duplamente cego aleatório controlado com placebo para avaliar a eficiência de vacina candidata para Herpes Simplex de SmithKline Beecham Biologicals (gD2t) com 3-DMPL para evitar doença com herpes genital em companheiros saudáveis de indivíduos com doença de herpes genital.

**Indicação/
população de
estudo** Adultos saudáveis voluntários, homens e mulheres, com idades de 18 a 45 anos com marcadores serológicos negativos de infecção com Herpes Simplex (HSV-1 e -2) e cujo companheiro tem doença de herpes genital clínico.

Objectivos do estudo

Primários

Comparar com placebo, durante o período de 17 meses com início um mês após a segunda vacinação, a eficiência protectora da vacina de gD-Alúmen-3-DMPL para evitar a doença clínica de herpes genital.

Secundários

Comparar com placebo, começando um mês após a segunda vacinação, a eficiência protectora de vacina de gD-Alúmen-3-DMPL para evitar infecção com herpes genital.

Comparar com placebo após o curso de vacinação completa, a eficiência protectora da vacina de gD-Alúmen-3-DMPL para evitar infecção com herpes genital.

Comparar com placebo, após o curso de vacinação completa, a eficiência protectora da vacina de gD-Alúmen-3-DMPL para evitar infecção com herpes genital durante um período de vigilância clínica prolongada.

Comparar com placebo, após o curso de vacinação completa, a eficiência protectora da vacina de gD-Alúmen-3-DMPL para evitar doença de herpes genital.

Comparar com placebo, após o curso de vacinação completa, a eficiência protectora da vacina de gD-Alúmen-3-DMPL para evitar doença clínica de herpes genital durante um período de vigilância clínica prolongada.

Avaliar, começando um mês após a segunda vacinação, o tempo de ocorrência da doença em cada grupo.

Avaliar, começando um mês após a segunda vacinação, o tempo de ocorrência da infecção em cada grupo.

Avaliar, em cada grupo, o número de casos típicos e atípicos de doença de herpes genital.

Avaliar a gravidade da doença primária em ambos os grupos.

Avaliar a resposta imunitária humoral e celular (excluindo indivíduos de centros de estudos iniciados após 1 de Julho de 1995) da vacina.

Determinar a correlação serológica ou imunológica com a eficiência protectora (excluindo indivíduos de centros de estudo iniciado após 1 de Julho de 1995).

No caso de doença ou infecção primária, avaliar o número de recorrências subsequentes nos dois grupos.

Avaliar a segurança e reactogenicidade da vacina candidata para herpes simples de SmithKline Beecham Biologicals (com 3-DMPL) em indivíduos seronegativos para HSV saudáveis.

Avaliar o número de cases de doença de herpes oro-labial (ou não genital).

Comparar com placebo, começando um mês após a segunda vacinação, a eficiência protectora de gD-Alúmen-3-DMPL para evitar sinais suspeitos de herpes genital e sintomas associadas quer com a seroconversão de Transferência de Western em antígenos não de vacina ou com a detecção de ADN de HSV num esfregaço genital para PCR.

Avaliar a incidência da doença de herpes genital e infecção HSV em recipientes da vacina durante o período de extensa vigilância clínica.

Concepção do estudo

Estudo duplamente cego, aleatório, controlado com placebo.

Horário de Vacinação:0-1-6 meses.

Período inicial de vigilância - 17 meses para cada indivíduo começando 1 mês após a segunda vacinação.

Período de vigilância prolongado - 24 meses para cada indivíduo (da visita no mês 19 até à visita no mês 43)

Fase A (duplamente cego, recipientes de vacina e placebo) - termina quando o último indivíduo registado completa o período inicial de vigilância (cerca do tempo que o estudo não é cego para análise).

Fase B (aberto, apenas recipientes de vacina) - começa quando o último indivíduo registado completa o período inicial de vigilância (visita no mês 19) e termina quando o último indivíduo registado completa a visita do mês 43.

Porque pode haver um período de vários meses entre a data que o último indivíduo registado completa o período de vigilância inicial e a data em que o estudo é totalmente não cego, para análise, (devido ao tempo necessário para codificar e limpar todos os resultados do estudo comparados durante o período de vigilância inicial e a fase A do período de vigilância prolongado), a parte inicial da fase B do período de vigilância prolongada pode incluir ambos os recipientes de vacina e placebo.

- 2 grupos: 1. gD2t-Alúmen-3-DMPL
 Alúmen-3-DMPL como placebo

Esquema da Concepção do Estudo HSV-007 - períodos de Estudo:
Fase de vacinação (V); Vigilância Inicial* (inicial f/u*); Fase
de Vigilância Prolongada A; Fase de Vigilância Extensa B.

*Nota: O "período de vigilância inicial" modificado inclui agora
os meses 2-19

Número de indivíduos serão registados no estudo 800
casais para permitir pelos menos
640 indivíduos avaliáveis.

Ponto final de eficiência primária Durante o período de 17 meses,
começando um mês após a segunda
vacinação (meses 2-19), o ponto
final da eficiência primária será
como se segue:

Prevenção da doença:

Uma comparação entre os dois grupos do número de indivíduos
com pelo menos um sintoma da doença compatível da doença de
herpes genital E quer uma cultura positiva concomitante OU
aparência de anticorpos com antígenos de não vacina por
transferência de Western em seis meses e detecção local positiva
de ADN de herpes simplex pela Reacção da Polimerase em Cadeia
(PCR).

	Sintoma Clínico	Cultura	Anticorpos contra antigénios de não vacina	PCR
Doença	+	+	+/-	NA
	+	-	+	+

NA: Não Aplicável

Pontos finais de eficácia secundária

1) Prevenção de infecção:

Será feita uma comparação (entre os grupos de vacina e de placebo), do número de indivíduos que desenvolvem anticorpos contra antigénios de não vacina (seroconversão) e de indivíduos que desenvolvem a doença (cultura comprovada).

Este ponto final será avaliado durante os seguintes períodos:

Período inicial de vigilância (meses 2-19)

Meses 7-19

Fase A da vigilância prolongada (meses 2-19)

Período inicial e fase A da vigilância prolongada combinada. Meses 7-19 e fase A da vigilância prolongada combinada.

A análise dos dados da fase A do período de vigilância prolongado incluirá todos os eventos que ocorram após cada visita do mês 19 do indivíduo e o final da fase A (quando o último indivíduo registado completa a visita no mês 19).

Definição do caso

		Sintoma clínico	Cultura	Anticorpos contra antigénios de não vacina	PCR
Infecção	doença	+	+	+/-	NA
Infecção	doença	+	-	+	+
infecção		+/-	NA	+	NA

NA: Não Aplicável

2) Prevenção da doença entre os meses 7-19

Uma comparação com placebo após o curso de vacinação completa (meses 7-19) do número de indivíduos com, pelo menos, um sintoma compatível da doença de herpes genital E quer uma cultura simultânea positiva OU aparecimento de anticorpos contra antigénios de não vacina por Transferência de Western e detecção local positiva de ADN de herpes simplex por Reacção da Polimerase em Cadeia (PCR).

3) Prevenção da doença durante a fase A do período de vigilância prolongado

Durante a fase A do período de vigilância prolongado, a comparação será realizada entre os dois grupos do número de indivíduos com, pelo menos, um sintoma compatível da doença de herpes genital E quer uma cultura simultânea positiva OU o aparecimento de anticorpos contra

antigénios de não vacina por Transferência de Western e detecção local positiva de ADN de herpes simplex pela Reacção da Polimerase em Cadeia (PCR).

Adicionalmente, este ponto final será também avaliado durante o novo período de vigilância inicial (meses 2-19) e fase A do período de vigilância prolongado combinado e também para os meses 7-19 e fase A da vigilância prolongada combinada.

- 4) Avaliar durante o período de 17 meses começando um mês após a segunda vacinação, em cada grupo, o tempo de ocorrência da doença de herpes genital.
- 5) Avaliar durante o período de 17 meses começando um mês após a segunda vacinação, em cada grupo, o tempo de ocorrência da infecção com herpes genital.
- 6) Avaliar em cada grupo o número de casos da doença clínica típica de herpes genital e de doença de herpes genital atípica.

As definições do caso são descritas no ponto final primário.

- 7) Avaliar em cada grupo o local individual do doente e os sinais gerais e sintomas de doença genital HSV e a sua duração.
- 8) Avaliar a resposta humoral (anticorpos anti-gD2 por ELISA e anticorpos neutralizantes anti-HSV) e celular (linfoproliferação, secreção de interferão gama) à

vacina (excluindo indivíduos dos centros de estudos iniciados após 1 de Julho 1 de 1995).

- 9) Se é demonstrada eficiência clínica, os marcadores serológicos e imunológicos serão avaliados extensivamente utilizando os soros e Linfócitos de Sangue Periférico armazenados quando escalados, numa tentativa para determinar a correlação entre a eficiência protectora e os parâmetros laboratoriais (excluindo indivíduos dos centros de estudo iniciados após 1 de Julho de 1995).
- 10) No caso de doença primária ou infecção, avaliar o número de recorrências subsequentes do herpes genital em cada grupo.
- 11) A reactogenicidade local e geral e a segurança serão avaliadas após cada vacinação registando os sinais locais e gerais e sintomas, após cada dose e as experiências adversas durante o curso do estudo. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos serão verificados na linha de base e após a última vacinação.

Durante o período de vigilância prolongado, todas as experiências adversas sérias relatadas pelos recipientes da vacina serão registadas.
- 12) Avaliar o número de casos clínicos de herpes genital de não-doença, incluindo doença de herpes oro-labial, em cada grupo.

- 13) Comparar com placebo, durante o período de vigilância de 17 meses, começando um mês após a segunda vacinação, o número de recipientes de vacina que desenvolvem sinais de herpes genital e sintomas associados com quer com a seroconversão em antigénios de não vacina por transferência de Western (dentro de um período de seis meses desde o início dos sinais ou sintomas de herpes genital) ou com a detecção do ADN de HSV num esfregaço genital por PCR.
- 14) Durante a fase B do período de vigilância prolongado, o número de recipientes de vacina que desenvolveram anticorpos contra antigénios de não vacina (seroconversão) e de indivíduos que desenvolvem a doença (cultura provada), serão analisados em relação ao intervalo desde a administração da última vacinação. Estes resultados serão utilizados para calcular a taxa de ataque da doença de herpes genital e infecção.

EXEMPLO 2

A análise do ponto final primário é baseada na comparação de taxas de ataque entre os grupos de vacina e placebo como descrito no RAP. A análise dos pontos finais secundários é baseada quer na comparação de taxas de ataque ou na comparação de tempo para ocorrência de pontos finais de doença ou infecção, como descrito abaixo.

Os testes estatísticos são de dois lados e realizados utilizando software SAS e um nível α de 0,05. Deve ser notado que muitas análises de estatística são relatadas, mas para os

pontos finais secundários a taxa de erro (α) não está sob controle. Uma vez que não foram realizados ajustes no α para os pontos finais secundários, os valores de p devem ser interpretados cuidadosamente e apenas descritivos.

Populações analisadas para a Eficácia da Vacina

São realizadas análises de eficácia em duas populações de indivíduos: a população de intenção-para-tratar (ITT) e a população de acordo-com-protocolo (ATP). O grupo do ATP é também aqui referido abaixo como o grupo por-protocolo (PP).

A análise da população de acordo-com o-protocolo é a análise primária. A definição da população ATP (ou PP) é definida pelo período do estudo em consideração:

1) No período entre os meses 2-19, a população ATP consiste em indivíduos:

- que cumprem todos os critérios de elegibilidade de protocolo
- que receberam três doses de vacina/placebo
- ou que receberam duas doses de vacina/placebo e para os quais o evento considerado (doença ou infecção) ocorreu antes da visita de 6 meses
- para os quais o evento considerado (doença ou infecção) não ocorreu antes do início do período de 2-19 meses.

2) Durante o período entre os meses 7-19, a população ATP consiste nos indivíduos:

- que cumprem todos os critérios de elegibilidade do protocolo
- que receberam três doses de vacina/placebo
- para os quais o evento considerado (doença ou infecção) não ocorreu antes do início do período dos meses 7-19.

A análise da população ITT é considerada como a análise secundária. Esta análise inclui todos os indivíduos que receberam, pelo menos, uma dose de vacina de estudo e possuem, pelo menos, uma avaliação na vacina.

O objectivo das duas análises é assegurar que as violações do protocolo, abandonos ou exclusões de indivíduos não estão relacionados com o tratamento e não conduzem a qualquer enviesamento na selecção nos resultados de eficácia.

As populações a serem incluídas nas análises de imunogenicidade e segurança serão totalmente descritas no relatório final do estudo.

Períodos de Avaliação

Os períodos de avaliação durante os quais as análises são realizadas incluem:

- meses 2-19 (população ATP)
- meses 7-19 (população ATP)
- meses 0-19 (população ITT)

Os resultados seleccionados são apresentados abaixo, em conjunto com um sumário das conclusões globais do estudo.

Tabela 1a. Ajuste do efeito da vacina na ocorrência da doença de herpes genital pela população do género-ITT

Termos ajustados no modelo	Desvio	Graus de liberdade	Valor de p
Grupo de tratamento	320,5561	845	
Grupo de tratamento, género	317,2083	844	0,067
Grupo de tratamento, género e interacção	312,0443	843	0,023

Tabela 1b. Ajuste do efeito da vacina na ocorrência da infecção com herpes genital pela população do género-ITT

Termos ajustados no modelo	Desvio	Graus de liberdade	Valor de p
Grupo de tratamento	510,8654	845	
Grupo de tratamento, género	494,9266	844	<0,001
Grupo de tratamento, género e interacção	491,5551	843	0,066

**Distribuição da Doença de Herpes Genital e Casos de Infecção
com HSV por Grupo de Tratamento**

Tabela 2a. Casos de Doença de Herpes Genital por Grupo de Tratamento - Homens e Mulheres

Intervalo	Intenção-de-tratar (N=847)		Por protocolo*	
	Vacina (425)	Placebo (422)	Vacina	Placebo
M 0-2	2	7		
M 2-7	9	8		
M 7-19	4	9	3 (349)	7 (349)
M 2-19	13	17	12 (371)	16 (369)
M >19	1	0		
Total	16	24		

*Para cada intervalo, o número de indivíduos avaliáveis por protocolo é apresentado entre ()

Tabela 2b. Casos de Doença de Herpes Genital por Grupo de Tratamento - Apenas Homens

Intervalo	Intenção-de-tratar (N=579)		Por protocolo*	
	Vacina (288)	Placebo (291)	Vacina	Placebo
M 0-2	2	2		
M 2-7	6	5		
M 7-19	3	3	2 (240)	2 (247)
M 2-19	9	8	8 (252)	8 (261)
M >19	1	0		
Total	12	10		

*Para cada intervalo, o número de indivíduos avaliáveis por protocolo é apresentado entre ()

Tabela 2c. Casos de Doença de Herpes Genital por Grupo de Tratamento - Apenas Mulheres

Intervalo	Intenção-de-tratar (N=268)		Por protocolo*	
	Vacina (137)	Placebo (131)	Vacina	Placebo
M 0-2	0	5		
M 2-7	3	3		
M 7-19	1	6	1 (109)	5 (102)
M 2-19	4	9	4 (119)	8 (108)
M >19	0	0		
Total	4	14		

*Para cada intervalo, o número de indivíduos avaliáveis por protocolo é apresentado entre ()

Tabela 3a. Casos de Infecção com Herpes Genital por Grupo de Tratamento - Homens e Mulheres

Intervalo	Intenção-de-tratar (N=847)		Por protocolo*	
	Vacina (425)	Placebo (422)	Vacina	Placebo
M 0-2	2	10		
M 2-7	17	13		
M 7-19	11	16	10 (349)	16 (349)
M 2-19	28	30	26 (371)	29 (369)
M >19	5	2		
Total	35	41		

*Para cada intervalo, o número de indivíduos avaliáveis por protocolo é apresentado entre ()

Tabela 3b. Casos de Infecção com Herpes Genital por Grupo de Tratamento - Apenas Homens

Intervalo	Intenção-de-tratar (N=579)		Por protocolo*	
	Vacina (425)	Placebo (422)	Vacina	Placebo
M 0-2	2	2		
M 2-7	9	8		
M 7-19	6	6	5 (240)	6 (247)
M 2-19	15	14	13 (252)	14 (261)
M >19	3	0		
Total	20	16		

*Para cada intervalo, o número de indivíduos avaliáveis por protocolo é apresentado entre ()

Tabela 3c. Casos de Infecção com Herpes Genital por Grupo de Tratamento - Apenas Mulheres

Intervalo	Intenção-de-tratar (N=268)		Por protocolo*	
	Vacina (137)	Placebo (131)	Vacina	Placebo
M 0-2	0	8		
M 2-7	8	5		
M 7-19	5	10	5 (109)	10 (102)
M 2-19	13	15	13 (119)	15 (108)
M >19	2	2		
Total	15	25		

*Para cada intervalo, o número de indivíduos avaliáveis por protocolo é apresentado entre ()

Análise de Eficácia Preliminar

Ponto final de eficácia primária

Durante o período de 17 meses, começando um mês após a segunda vacinação (meses 2-19), o Ponto final de eficácia primária será como se segue:

Prevenção da doença:

Uma comparação entre os dois grupos do número de indivíduos com, pelo menos, um sintoma compatível da doença de herpes genital E quer uma cultura simultânea positiva OU o aparecimento de anticorpos contra antigénios de não vacina através de Transferência de Western, dentro de seis meses e detecção local positiva de ADN de herpes simplex pela Reacção da Polimerase em Cadeia (PCR).

Tabela 4a. Prevenção da Doença de Herpes Genital - Homens e Mulheres

Intervalo	População	Eficiência (95% CI)
Todos	ITT	33,8 (-22,8, 64,3%)
M 2-19	PP	25,4% (-55,5, 64,2%)

Tabela 4b. Prevenção da Doença de Herpes Genital - Apenas Homens

Intervalo	População	Eficiência (95% CI)
Todos	ITT	-21,2 (-176,2, 46,8%)
M 2-19	PP	3,6% (-171,7, 60,5%)

Tabela 4c. Prevenção da Doença de Herpes Genital - Apenas Mulheres

Intervalo	População	Eficiência (95% CI)
Todos	ITT	72,7% (19,1, 90,8%)
M 2-19	PP	54,6% (-46,4, 85,9%)

Pontos finais de eficiência secundária

1) Prevenção da infecção:

Será realizada uma comparação (entre os grupos de vacina e placebo), do número de indivíduos que desenvolveram anticorpos contra antigénios de não vacina (seroconversão) e de indivíduos

que desenvolveram doença (cultura provada) durante o período inicial de vigilância (meses 2-19).

Tabela 5a. Prevenção da Infecção com Herpes Genital - Homens e Mulheres

Intervalo	População	Eficiência (95% CI)
Todos	ITT	15,2 (-30,4, 44,0%)
M 2-19	PP	25,4% (-48,4, 46,4%)

Tabela 5b. Prevenção da Infecção com Herpes Genital - Apenas Homens

Intervalo	População	Eficiência (95% CI)
Todos	ITT	-26,3 (-138,8, 33,2%)
M 2-19	PP	3,8% (-100,5, 53,9%)

Tabela 5c. Prevenção da Infecção com Herpes Genital - Apenas Mulheres

Intervalo	População	Eficiência (95% CI)
Todos	ITT	42,6% (-3,9, 68,3%)
M 2-19	PP	21,3% (-57,7, 60,8%)

2) Prevenção da infecção:

Será realizada uma comparação (entre os grupos de vacina e placebo), do número de indivíduos que desenvolveram anticorpos contra antigénios de não vacina (seroconversão) e de indivíduos que desenvolveram a doença (cultura provada) durante os meses 7-19.

Tabela 6a. Prevenção da Infecção com Herpes Genital - Homens e Mulheres

Intervalo	População	Eficiência (95% CI)
M 7-19	PP	37,5% (-35,8, 71,2%)

Tabela 6b. Prevenção da Infecção com Herpes Genital - Apenas Homens

Intervalo	População	Eficiência (95% CI)
M 7-19	PP	14,2% (-177,3, 73,5%)

Tabela 6c. Prevenção da Infecção com Herpes Genital - Apenas Mulheres

Intervalo	População	Eficiência (95% CI)
M 7-19	PP	53,2% (-32,2 83,4%)

3) Prevenção da doença entre os meses 7-19

Uma comparação com placebo após o curso de vacinação completa (meses 7-19) do número de indivíduos com pelo menos um sintoma compatível da doença de herpes genital E quer uma cultura simultânea positiva OU o aparecimento de anticorpos contra antigénios de não vacina através de Transferência de Western e detecção local positiva de ADN de herpes simplex pela Reacção da Polimerase em Cadeia (PCR).

Tabela 7a. Prevenção da Doença de Herpes Genital - Homens e Mulheres

Intervalo	População	Eficácia (95% CI)
M 7-19	PP	57,1 % (-64,4, 88,8%)

Tabela 7b. Prevenção da Doença de Herpes Genital - Apenas homens

Intervalo	População	Eficácia (95% CI)
M 7-19	PP	-2,9% (-624,7, 85,4%)

Tabela 7c. Prevenção da Doença de Herpes Genital - Apenas Mulheres

Intervalo	População	Eficácia (95% CI)
M 7-19	PP	81,3% (-57,5, 97,8%)

Para avaliar o tempo de ocorrência da doença de herpes genital durante o período de 17 meses com início um mês após a segunda vacinação, em cada grupo

O tempo de ocorrência da doença de herpes genital para a população ITT é apresentado nas figuras 1a (homens e mulheres), 1b (apenas homens) e 1c (apenas mulheres). As análises da eficácia do tempo de ocorrência da doença de herpes genital para a população ITT são apresentadas nas tabelas 8a (homens e mulheres), 8b (apenas homens) e 8c (apenas mulheres). O tempo de ocorrência não foi analisado por protocolo de populações (meses 2-19) uma vez que foi observada uma diferença precoce na sobrevivência sem a doença entre os receptores de vacina e de placebo antes do mês 2.

Nota: a análise do tempo de ocorrência exclui os casos de doença de herpes genital que ocorreram após o mês 19.

Tabela 8a. Prevenção da Doença de Herpes Genital por Tempo de Ocorrência - Homens e Mulheres

Intervalo	População	Valor de p (Teste de Log Rank)	Eficácia (95% CI)
M 0-19	ITT	0,1432	37,96% (-18,27, 67,45%)

Tabela 8b. Prevenção da Doença de Herpes Genital por Tempo de Ocorrência - Apenas homens

Intervalo	População	Valor de p (Teste de Log Rank)	Eficácia (95% CI)
M 0-19	ITT	0,8025	-11,54% (-162,55, 52,63%)

Tabela 8c. Prevenção da Doença de Herpes Genital por Tempo de Ocorrência - Apenas Mulheres

Intervalo	População	Valor de p (Teste de Log Rank)	Eficácia (95% CI)
M 0-19	ITT	0,013	73,24% (18,69, 91,19%)

Sumário e conclusões após análise detalhada dos resultados do ensaio

Características demográficas e avaliação de factores de risco

Em geral, dos 847 indivíduos inscritos (425 de vacina e 422 de placebo), 697 indivíduos (344 de vacina e 353 de placebo) completaram o estudo até ao mês 19. Cento e cinquenta indivíduos (150) desistiram do estudo; nenhuma das desistências resultou de um evento adverso grave.

Trezentos e setenta (370) indivíduos no grupo de vacina e 369 no grupo de placebo foram avaliáveis nos meses 2-19 da

população ATP. Os grupos de tratamento foram equilibrados para todas as características demográficas e a selecção dos cumpridores do protocolo para a análise da população ATP não resultou na introdução de desvios pelos grupos de tratamento.

Os factores de risco que podem ter impacto na taxa de aquisição da doença de herpes genital ou infecção foram avaliados e incluíam a duração do relacionamento antes da entrada no estudo, o intervalo de tempo até à separação do parceiro fonte, a frequência da relação sexual (na linha de base e durante o período de estudo da eficácia), e a frequência de utilização de preservativos (na linha de base e durante o período de estudo de eficácia).

Estes resultados indicam que os grupos da vacina e de placebo estavam equilibrados na linha de base para todos os factores de risco e o equilíbrio foi mantido durante o estudo. A semelhança do perfil da população ITT com o da população ATP em termos de factores de risco, também confirma que a eliminação dos não cumpridores ao protocolo não influenciou os grupos de tratamento.

As sub-análises por género indicam que em cada grupo de género, os factores de risco que podem ter impacto na aquisição da doença de herpes genital ou infecção são equilibrados pelo grupo de tratamento.

Análise primária do ponto final da eficácia

A análise primária do ponto final da eficácia não demonstra a eficácia da vacina contra o herpes genital numa população

combinada de homens e mulheres consortes seronegativos saudáveis de indivíduos com doença de herpes genital.

Os resultados da análise primária de ponto final de eficácia estão resumidos como se segue:

- 1) A eficácia relativa da vacina na população geral (mês 2-19 ATP) é 25,4 % (95 % CI:-55,5, 64,2; $p = 0,449$). A eficácia relativa da vacina para a população ITT é 37,9% (95% CI:-16,6, 67,0; $p = 0,143$).
- 2) Uma interação estatisticamente significativa por gênero na análise da eficácia da população ITT ($p=0,03$).
- 3) Uma análise separada por gênero apresenta uma eficácia da vacina de 54,2 % no mês 2-19 da população de mulheres ATP (95% CI:-47,7, 85,8; $p = 0,238$) e uma eficácia da vacina estatisticamente significativa de 72,7% (95% CI:19,1, 90,8; $p = 0,014$) na população de mulheres ITT. Na população masculina, não existe evidência da eficácia da vacina. No mês 2-19 para a população ATP de homens a eficácia da vacina é 3,6% (95% CI:-171, 60,5) e -11,1%, (95% CI; -157,6, 52,1) na população ITT masculina.

Foram investigadas várias covariadas de linha de base para determinar se estas podiam influenciar os resultados da eficácia: gênero, idade, frequência de utilização de preservativos na linha de base, frequência da relação sexual e duração de relacionamentos antes do início do estudo. A tendência para a eficácia da vacina foi associada com o gênero feminino, idade acima dos 30 anos, utilização não frequente de

preservativo, relação sexual de frequência inferior à média e duração mais curta de relacionamentos. Estas observações aplicaram-se a ambas as populações ATP e ITT.

Análise secundária do ponto final da eficácia

Prevenção da doença de herpes genital (mês 7-19)

Após 3 doses da vacina (entre os meses de estudo 7-19), foi observada uma eficácia da vacina de 81,1% (95 % CI:-58.9, 97.8) para a prevenção da doença de herpes genital em mulheres ($p = 0,111$). Não foi observada tendência para a eficácia em homens durante o período de observação dos meses 7-19 (-2,9% de eficácia da vacina, 95% CI:-624,7, 85,4; $p = 0,99$). Esta tendência para eficácia da vacina na população ATP de mulheres dos meses 7 - 19 é consistente com a observação da eficácia da vacina em mulheres na análise ITT do ponto final primário.

Prevenção da infecção por HSV

Foi efectuada uma comparação entre os grupos da vacina e de placebo quanto à eficácia da vacina em prevenir a infecção por HSV. Globalmente, não existia eficácia da vacina contra infecção por HSV. Contudo, consistente com as análises do ponto final da doença, foi sugerida uma tendência para a eficácia da vacina contra a infecção por HSV em mulheres na população ITT (eficácia da vacina de 46,0%, 95% CI:-2,1, 71,4; $p = 0,072$) e população ATP no mês 7-19 (eficácia da vacina de 52,8%, 95% CI:-33,4, 83,3; $p = 0,184$).

Tempo de ocorrência de herpes genital

O tempo de ocorrência da doença de herpes genital foi calculado do início do estudo até a ocorrência da doença. A análise principal foi efectuada pelo teste de logrank; as curvas de Kaplan-Meier foram desenhadas para cada grupo. Em mulheres (população ATP mês 2-19), a separação das curvas que denotam a ocorrência de casos de doença é evidente a partir de aproximadamente nove meses com casos de doença a continuar a ocorrer no grupo de placebo. A eficácia da vacina é estimada em 53,6% (95% CI:-54,2, 86,0) em mulheres. Na população feminina ITT em que a separação das curvas de vacina e placebo é evidente desde o mês 0, é estimada uma eficácia da vacina estatisticamente significativa de 73,2% (95% CI:18,7, 91,2; $p=0,013$). Não é observada eficácia na população masculina. De novo, os resultados da análise do "tempo de ocorrência" são consistentes com a análise primária do ponto final.

Gravidade da doença de herpes Genital

Os parâmetros incluindo, duração das lesões, duração dos sintomas por episódio, número de sintomas por episódio e intensidade do sintoma por episódio foram utilizados para avaliar a gravidade da doença em ambos os grupos de tratamento. Na população ATP combinada meses 2-19, a duração de sintomas por episódio é, significativamente, mais longa no pequeno número de casos que ocorrem no grupo da vacina ($p = 0,031$). Os dados da gravidade específica para o género revelam também que nas mulheres, existe um maior número estatisticamente significativo de lesões por doença de herpes genital por episódio ($p = 0,010$)

no grupo da vacina. Estas observações sugerem que embora a vacinação possa evitar a doença moderada a grave no grupo da vacina, não é evitada pela vacinação a doença com manifestações mais graves.

Conclusões gerais

A análise demonstra que embora possa existir uma tendência para a eficácia da vacina contra o herpes genital, a análise primária do ponto final não demonstra a eficácia da vacina numa população combinada de indivíduos homens e mulheres consortes saudáveis seronegativos com doença de herpes genital. Contudo, uma sub-análise separada por grupo de género, com base na observação da interacção entre os géneros, apresenta,, surpreendentemente uma tendência para uma eficácia da vacina em mulheres que é estatisticamente significativa na população ITT. Não existe evidência de eficácia da vacina na população masculina.

REFERÊNCIAS ADICIONAIS

1. Washington AE, Johnson RE e Sanders LL. *Chlamydia trachomatis* infections in the United States: what are they costing us. *JAMA* 1987, 257, 2070-2072.
2. Grayston JT e Wang SP. New knowledge of *Chlamydiae* and the diseases they cause. *The Journal of Infectious Diseases* 1975, 132:87-105.

3. Grayston JT, Wang SP, Yeh LJ, e Kuo CC. Importance of reinfection in the pathogenesis of trachoma. *Reviews of Infectious Diseases* 1985, 7, 717-725
4. Morrison RP, RJ Belland, K Lyng e HD Caldwell. Chlamydial disease pathogenesis. The 57-kD Chlamydial hypersensitivity antigen is a stress response protein. *J. Exp. Med.* 1989, 170, 1271-1283
5. Blander SJ e Amortegui AJ. Mice immunized with a chlamydial extract have no increase in early protective immunity despite increased inflammation following genital infection by the mouse pneumonitis agent of *Chlamydia trachomatis*. *Infec. Immun.* 1994, 62, 3617-3624. µg
6. Wang SP, Kuo CC, Barnes RC, Stephens RS e Grayston JT. Immunotyping of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibodies. *The Journal of Infectious Diseases* 1985, 152, 791-800.
7. Bavoil P, Ohlin A, e Schachter J. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 1984, 44, 479-485.
8. Hatch TP, Miceli M, Sublett JE. Synthesis of disulfide-bonded outer membrane proteins during development cycle of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. *J. Bacteriol.* 1986, 165, 379-385.
9. Stephens RS, R Sanchez-Pescador, EA Wagar, C Inouye e MS Urdea. Diversity of *Chlamydia trachomatis* Major Outer Membrane Protein genes. *J. Bacteriol.* 1987, 169, 3879-3885.

10. Yuan Y, Zhang YX, Watkins NG, e Caldwell HD. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer mebrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars. *Infect. Immun.* 1989, 57, 1040-1049.
11. Baehr W, Zhang YX, Joseph T, Su H, Nano FE, Everett EK e Calwell HD. Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1988, 85, 4000-4004
12. Lucero ME e Kuo CC. Neutralization of *Chlamydia trachomatis* cell culture infection by serovar-specific monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 1985, 50, 595-597
13. Zhang YX, Stewart S, Joseph T, Taylor HR e HD Caldwell. Protective monoclonal antibodies recognize epitopes located on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J. Immunol.* 1987, 138, 575-581.
14. Peterson E, Zhong G, Carlson E e de la Maza LM. Protective role of magnesium in the neutralization by monoclonal antibodies of *Chlamydia trachomatis* infectivity. *Infect. Immun.* 1988, 56, 885-891.
15. Zhang YX, Stewart SJ e Caldwell HD. Protective monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis* serovar and serogroup-specific major outer membrane protein determinants. *Infect. Immun.* 1989, 57, 636-638
16. Allen JE, RM Loksley e RS Stephens. A single peptide from the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*

elicits T cell help for the production of antibodies to protective determinants. *J. Immunol.* 1991, 147, 674-679

17. Su H, RP Morrison, NG Watkins e HD Caldwell. Identification and characterization of T helper cell epitopes of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J. Exp. Med.* 1990, 172, 203-212

18. Manning DS e SJ Stewart. Expression of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1993, 61, 4093-4098.

19. Koehler JE, Birkelund S e Stephens RS. Overexpression and surface localization of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 1992, 6, 1087-1094

20. Pickett MA, ME Ward e IN Clarke. High level expression and epitope localization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* serovar L1. *Molecular Microbiology* 1988, 2, 681-685.

21. Taylor HR, J Whittum-Hudson, J Schachter, HD Caldwell e RA Prendergast. Oral immunization with chlamydial major outer membrane protein (MOMP). *Investigative Ophthalmology and visual Science* 1988, 29, 1847-1853

22. Batteiger BE, RG Rank, PM Bavoil e LSF Soderberg. Partial protection against genital reinfection by immunization of guinea-pig with isolated outer membrane proteins of the chlamydial agent of guinea-pig inclusion conjunctivitis. *Journal of General Microbiology* 1993, 139, 2965-2972.

23. Tuffrey M, F Alexander, W Conlan, C Woods e M Ward. Heterotypic protection of mice against chlamydial salpingitis and colonization of the lower genital tract with a human serovar F isolate of *Chlamydia trachomatis* by prior immunization with recombinant L1 major outer-membrane protein. *Journal of General Microbiology* 1992, 138, 1707-1715.
24. Tuffrey M, P Falder, J Gale e D Taylor-Robinson. Salpingitis in mice induced by human strains of *Chlamydia trachomatis*. *Br. J. exp. Path.* 1986, 67, 60S-616.
25. Tuffrey M, P Falder, J Gale, R Quinn e D Taylor-Robinson. Infertility in mice infected genitally with a human strain of *Chlamydia trachomatis*. *Br. J. exp. Path.* 1986, 78, 251-260
26. Ramsey KH, LSF Soderberg e RG Rank. Resolution of Chlamydial genital infection in B-cell deficient mice and immunity to reinfection. *Infect. Immun.* 1988, 56, 1320-1325.
27. Rank RG, LSF Soderberg e AL Barron. Chronic chlamydial genital infection in congenitally athymic nude mice. *Infect. Immun.* 1985, 48, 847-849
28. Igietseme JU e RG Rank. Susceptibility to reinfection after a primary chlamydial genital infection is associated with a decrease of antigen-specific T cell in the genital tract. *Infect. Immun.* 1991, 59, 1346-1351
29. Igietseme JU, KH Ramsey, DM Magee, DM Williams TJ Kincy e RG Rank. Resolution of murine chlamydial genital infection by the

adoptive transfer of a biovar-specific, TH1 Lymphocyte clone.
Regional Immunology 1993, 5, 317-324.

30. Igietseme JU, DM Magee, DM Williams e RG Rank. Role for CD8+ T cell in antichlamydial immunity defined by chlamydial-specific T-lymphocyte clones. *Infect. Immun.* 1994, 62 , 5195-5197.

Lisboa, 29 de Maio de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de uma glicoproteína D de HSV ou um seu fragmento imunológico e um adjuvante na preparação de uma vacina para administração a um indivíduo humano do sexo feminino HSV1-/2- para a prevenção da doença do herpes genital.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o adjuvante é um adjuvante indutor de TH-1.
3. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a glicoproteína D de HSV é uma glicoproteína truncada.
4. Utilização de acordo com a reivindicação 3, em que a glicoproteína truncada é gD2 de HSV e é desprovida da região âncora C-terminal (gD2t).
5. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que a vacina inclui ainda um antigénio derivado de HPV.
6. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que o antigénio ou combinação de antigénios é formulado com um veículo adequado.
7. Utilização de acordo com a reivindicação 6, em que o veículo é hidróxido de alumínio (alúmen), fosfato de alumínio ou uma emulsão óleo-em-água.

8. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações anteriores em que o adjuvante é o adjuvante indutor de TH-1 e 3D-MPL.
9. Utilização de acordo com a reivindicação 8, em que as partículas de 3D-MPL são suficientemente pequenas para serem esterilizadas por filtração através de uma membrana de 0,22 micron.
10. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que a formulação de vacina compreende gD2t (1-1000 µg), 3D-MPL (10-200 µg) e um sal de alumínio (100-1000 µg).
11. Utilização de acordo com reivindicação 10, em que a formulação de vacina compreende gD2t (20 µg), 3D-MPL (50 µg) e alúmen (500 µg).
12. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que a formulação de vacina é administrada a, ou preparada para administração a indivíduos do sexo feminino em intervalos de 0, 1 e 6 meses.
13. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que a formulação de vacina é administrada intramuscularmente.

Lisboa, 29 de Maio de 2008

Fig. 1 Tempo da ocorrência da doença do herpes genital (população ITT; meses 0-19) - Homens e Mulheres





