



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

(11) PI 0912811-5 B1

(22) Data do Depósito: 17/09/2009

(45) Data de Concessão: 03/08/2021



(54) Título: VACINA MONOBACTERIANA

(51) Int.Cl.: A61K 35/74; A61K 39/102; A61P 11/06; A61K 9/28; A61P 11/00.

(30) Prioridade Unionista: 17/09/2008 US 61/097,729.

(73) Titular(es): HUNTER IMMUNOLOGY PTY LIMITED.

(72) Inventor(es): MARGARET DUNKLEY; ROBERT CLANCY.

(86) Pedido PCT: PCT IB2009007303 de 17/09/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/032141 de 25/03/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 15/02/2011

(57) Resumo: VACINAS DE HAEMOPHILUS INFLUENZAE NÃO-TIPÁVEIS E SEUS USOS. A presente invenção refere-se a vacinas de Haemophilus influenzae não-tipáveis e seus usos no tratamento de doenças pulmonares, tais como doença pulmonar obstrutiva crônica e asma. O presente pedido de patente refere-se também a novas cepas de Haemophilus influenzae úteis para o tratamento de doenças pulmonares, como doença pulmonar obstrutiva crônica e asma.

"VACINA MONOBACTERIANA"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a vacinas de *Haemophilus influenzae* não-tipáveis e seus usos no tratamento de doenças pulmonares, tais como doença pulmonar obstrutiva crônica e asma. O presente pedido de patente refere-se também a novas cepas de *Haemophilus influenzae* úteis para o tratamento de doenças pulmonares, como doença pulmonar obstrutiva crônica e asma.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), em grande parte, por razão da inalação da fumaça do tabaco é a principal causa de morbidade e mortalidade sendo a quarta causa mais comum de morte no Mundo (Lung Disease Data (2008). American Lung Association). De acordo com estimativas do National Heart, Lung and Blood Institute, em 2007, o custo anual nos EUA para DPOC foi da ordem de 42,6 bilhões de dólares, incluindo 26,7 milhões gastos diretamente em tratamentos de saúde (Lung Disease Data (2008). American Lung Association). O insucesso do tratamento médico instituído para melhorar substancialmente os resultados tem sido decepcionante e novas estratégias de gestão são necessárias. (Global Initiative for COPD (2006). Global Strategy for the Diagnosis, Management & Prevention of COPD, que pode ser encontrado no web site da Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease). A patologia de base da DPOC inclui um estreitamento das pequenas vias aéreas e destruição do parênquima pulmonar, resultados que, pelo menos em parte, são consequência de um processo inflamatório. Exacerbações agudas recorrentes estão ligadas à piora da obstrução do fluxo aéreo e do estado de saúde, possivelmente porque refletem a inflamação intrabronquial mais

intensa. A causa desta resposta inflamatória é complexa, mas, em parte, inclui a colonização bacteriana da mucosa intrapulmonar do brônquio, que foi danificada pela inalação de material tóxico (Sethi, 2006, *Chest* 129:223-224).

5 Exacerbações agudas são eventos críticos na história natural da DPOC e são mais comuns em doenças graves. As exacerbações agudas reduzem a qualidade de vida, aceleram o declínio da função pulmonar, e são os principais determinantes de hospitalização e morte (Global Initiative for COPD, 2006; Niewoehner, 10 2006, *Am. J. Med.* 119(10 Suppl. 1):38- 45; Wedzicha & Seemungal, 2007, *Lancet* 370(9589):786-96; Sethi, 2006, *Chest* 129:223-224; Anzueto, 2007, *Clin. Chest Med.* 28(3):609-16, vii; and Look et al., 2006, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3(6):482-3). Uma vez que os pacientes são hospitalizados com uma exacerbação, eles permanecem com alto risco 15 de reinternação ou morte (Sin & Tu, 2001, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164(4):580-4).

A prevenção das exacerbações na DPOC é uma das principais metas da administração (Global Initiative for COPD Guidelines, 2002; Celli & MacNee, 2004, *Eur. Respir. J.* 23(6):932- 46; 20 O'Donnell et al., 2007, *Can. Respir J.* 14 Suppl. B:5B-32B), com a prevenção ou redução no número de exacerbações, tendo aparentemente efeitos benéficos sobre o curso clínico da doença a longo prazo e sobre a qualidade de vida dos pacientes (Burge et al., 2000, *BMJ* 320(7245): 1297-303; Calverley et al., 2003, *Chest* 124(4): 1350-6; 25 Vincken et al., 2002, *Eur. Respir. J.* 19(2):209-16; and Casaburi et al., 2002, *Eur. Respir J.* 19(2):217-24).

A asma é uma condição inflamatória crônica das vias aéreas caracterizada pela obstrução reversível das vias respiratórias, e tem sido tradicionalmente classificada como extrínseca (devida à reação

alérgica a alérgenos inalados, tais como pólen e ácaros) ou intrínseca (não devida à alergia clássica), cujo mecanismo é desconhecido. A asma extrínseca é também referida como asma "alérgica", enquanto que a asma intrínseca também é referida como asma "não-alérgica" ou "idiopática".

Em contraste com a DPOC, a asma é uma condição tipicamente crônica que envolve geralmente o sistema respiratório, na qual as vias aéreas, ocasionalmente, se contraem, se inflamam, e são revestidas com uma quantidade excessiva de muco, frequentemente em resposta a um ou mais ativadores. Estes episódios podem ser desencadeados por coisas como a exposição a um estimulante ambiental, que pode ser um alérgeno, fumaça ambiental do tabaco, ar frio ou quente, perfume, pêlos de animais, ar úmido, exercício ou esforço ou estresse emocional. Em crianças, os desencadeadores mais comuns são doenças virais, como aquelas que causam o resfriado comum. Este estreitamento das vias aéreas provoca sintomas como chiado, falta de ar, desconforto torácico e tosse. A constrição das vias aéreas reage aos broncodilatadores. Entre os episódios, a maioria dos pacientes sente-se bem, mas pode ter sintomas leves e pode permanecer com falta de ar após exercícios, por períodos de tempo mais longos do que indivíduos não afetados. Os sintomas da asma, que podem variar de leves a gravíssimos, podem, geralmente, ser controlados com uma combinação de drogas e mudanças ambientais.

Em um estudo recentemente relatado baseado em indivíduos diagnosticados com asma, a asma foi classificada com base nas diferenças na contagem de eosinófilos e neutrófilos no escarro (Simpson *et al.*, 2006, *Respirology* 11:54-61). Os indivíduos do estudo foram divididos em diferentes subtipos de asma com base na presença destes tipos de células em comparação com indivíduos saudáveis.

Vários subtipos de asma foram identificados, incluindo a asma neutrofílica (> 61% de neutrófilos) e a asma eosinofílica (> 1,01% de eosinófilos). O grupo com asma neutrofílica compreendeu aproximadamente cerca de 20% do número total de asmáticos. O estudo também relatou neutrofilia persistente na maioria destes indivíduos, acima de ambos os intervalos, tanto de curto prazo (quatro semanas) como de longo prazo (média 5,3 anos), entre as amostragens, apesar da ausência de relato de infecção do trato respiratório durante o mês antecedente à avaliação. Embora se tenha descoberto que os indivíduos com asma têm níveis mais elevados de bactérias intracelulares e macrófagos que indivíduos saudáveis, não foram encontradas diferenças significativas entre asmáticos neutrofílicos e outros grupos de asma. Sem dúvida os níveis de bactérias encontrados foram considerados menores que aqueles consistentes das infecções bacterianas agudas, e o relatório concluiu não haver evidência de infecção bacteriana que explicasse o processo inflamatório da asma neutrofílica.

A bronquite é uma inflamação dos brônquios (vias aéreas de médio porte) nos pulmões. A bronquite crônica (BC) não é necessariamente causada por uma infecção e geralmente é parte da síndrome de DPOC. A BC é definida clinicamente como uma tosse persistente que produz escarro (catarro) e muco, durante pelo menos três meses em dois anos consecutivos.

A *Haemophilus influenzae* não-tipável (HiNT) é a bactéria patogênica mais comum associada à bronquite crônica (BC) (Sethi and Murphy, 2001, *Clin. Microbiol. Rev.* 14:336-363). A HiNT pode ser encontrada nas vias aéreas superiores (por exemplo, nariz, ouvido médio, garganta e seios da face) de pacientes saudáveis e pacientes com BC (Sethi and Murphy, 2001, *Clin. Microbiol. Rev.* 14:336-363) bem

como em vários locais do trato respiratório, incluindo o lúmen, aderindo às células epiteliais da mucosa no interstício da submucosa (Moller *et al.*, 1998, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:950-56). Estudos da BC não-obstrutiva e obstrutiva têm observado que grande proporção de

5 pacientes têm uma infecção persistente com HiNT (Murphy *et al.*, 2004, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170:266-72).

Tanto HiNT como *Staphylococcus aureus* anteriormente mostraram induzir a liberação de histamina não-mediada por IgE e mediada por IgE reforçada, dos mastócitos obtidos por lavagem

10 bronquioalveolar das vias respiratórias dos pacientes com BC. No caso da HiNT, tem sido relatado que a exotoxina pode ser responsável pelo aumento da liberação de histamina mediada por IgE (Clements *et al.*, 1990, *Allergy* 45: 10-17). Ficou demonstrado que as células do sistema imunológico isoladas de pacientes com BC durante exacerbações

15 agudas são sensíveis e hiperativas a bactérias do próprio paciente (Norn *et al.*, 1994, *Agents Actions* 41, Special Conference Issue 1994:C22-C23). Vários estudos também relataram anticorpos IgE específicos produzidos em resposta à infecção respiratória por fungos (por exemplo, *Aspergillus*) e vírus (por exemplo, vírus sincicial respiratório, vírus

20 parainfluenza (Welliver *et al.*, 1982, *J. Pediatrics* 101:889-96)) e bactérias (*S. pneumoniae* (Kjaergard *et al.*, 1996, *APMIS* 104:61-67; Tee and Pepys, 1982, *Clin. Allergy* 12:439-50; Pauwels *et al.*, 1980, *Allergy* 157:665-9) *S. aureus* (Rhode *et al.*, 2004, *Respir. Med.* 98:858-64; Tee and Pepys, 1982, *Clin. Allergy* 12:439-50), *Pseudomonas aeruginosa*

25 (Shen *et al.*, 1981, *Infect. Immun.* 32:967-68) e *Mycoplasma pneumonia* (Seggev *et al.*, 1996, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 77:67-73). Anticorpos IgE específicos para HiNT também têm sido identificados no soro de pacientes com BC (Kjaergard *et al.*, 1996, *APMIS* 104; 61-67;

Tee and Pepys, 1982, *Clin. Allergy* 12:439-50) e fibrose cística (Tee and Pepys, 1982, *Clin. Allergy* 12:439-50).

Em um estudo de pacientes com asma brônquica, anticorpos IgE para HiNT foram encontrados em 29% dos pacientes.

- 5 Anticorpos para HiNT e/ou *Streptococcus pneumoniae* estavam também presentes em 22% dos pacientes sem outras hipersensibilidades a mediadas por IgE. No entanto, altos níveis de anticorpos IgE bacterianos foram encontrados em pacientes com anticorpos IgE demonstráveis para vários antígenos inalantes (sugerindo um fenótipo
- 10 alérgico) (Pauwels *et al.*, 1980, *Allergy* 157:665-9). Embora tenha sido levantada a hipótese de que as infecções bacterianas podem desempenhar um papel na indução e exacerbação da asma extrínseca, foi considerado que a exacerbação da asma é predominantemente desencadeada por infecção viral. De fato o efeito clínico de vacinas
- 15 bacterianas no tratamento da asma tem sido questionado, levando a recomendações internacionais da Organização Mundial de Saúde (OMS) de que as vacinas bacterianas não têm nenhum papel no tratamento da asma moderna.

- Apesar da enorme quantidade de pesquisas voltadas para a
- 20 intervenção terapêutica e o tratamento da asma, a condição continua a ser um grande problema, custoso e crescente nas sociedades ocidentalizadas.

- A citação ou identificação de qualquer referência neste pedido não devem ser interpretadas como uma admissão de que tal
- 25 referência se encontre disponível como estado da técnica ao presente pedido.

Uma nova forma de imunoterapia foi desenvolvida, envolvendo a administração oral de *Haemophilus influenzae* (HiNT) não-típável inativados, para estimular o sistema comum da mucosa. A

proteção contra exacerbações agudas na DPOC foi associada à redução na densidade de HiNT no escarro. Estes estudos iniciais utilizaram um HiNT isolado pouco caracterizado. Uma combinação de ensaios para seleção foi utilizada para identificar um HiNT isolado (que, salvo
5 indicação em contrário, é referido aqui como intermutação dos HiNT-164, HI-164, 164 isolado ou linhagem 164), que induziu uma ampla proteção cruzada.

A Depositante surpreendentemente descobriu que a vacinação com HI-164 é eficiente no tratamento da asma e reduz a
10 necessidade da terapia anti-asmática.

Conforme acordado, o presente pedido é destinado para as vacinas contendo HI-164 e linhagens similares de HiNT e seus usos no tratamento de doenças envolvendo episódios agudos de colonização do sistema da mucosa, como por exemplo o sistema de mucosa das vias
15 aéreas inferiores. O presente pedido é também dirigido às vacinas contendo HI-164 e linhagens similares de HiNT, e seus usos no tratamento de doenças pulmonares, como asma, DPOC e bronquite crônica que não esteja associada à DPOC. Em certas modalidades da invenção, a vacina é monobacteriana compreendendo uma ou mais
20 linhagens de HiNT e/ou uma ou mais frações imunogênicas das ditas espécies de HiNT.

As linhagens de HiNT úteis nas vacinas do presente pedido são caracterizadas por uma combinação de qualquer (por exemplo, dois, três, quatro, cinco, seis ou todas) das seguintes características:

- 25 (1) Falta do gene de cápsula B;
(2) Ser biotipo I;
(3) Falta do gene β -lactamases;
(4) Crescer de forma aeróbica;

- (5) Ser capaz de provocar uma resposta específica IgA do *Haemophilus influenzae* na mucosa, refletida pelo aumento de pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 50%, pelo menos 70%, pelo menos 100%, ou outro estatisticamente significante em IgA específico de *Haemophilus influenzae* na saliva;
- (6) Ser capaz de estimular células T específicas de *Haemophilus influenzae* em placas de Peyer, sendo refletido pelo aumento de pelo menos de 10%, pelo menos 20%, pelo menos 50%, pelo menos 70%, pelo menos 100%, ou outro aumento estatisticamente significativo na produção de linfocinas por células T pelas placas de Peyer, em resposta à exposição ao *Haemophilus influenzae*;
- (7) Codifica uma proteína 2 da membrana externa, que exhibe pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% pelo menos 99% , pelo menos 99,5% ou 100% de identidade de sequências com a proteína 2 da membrana externa de HiNT-164;
- (8) Codifica uma proteína 26 de membrana externa, que exhibe pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99 %, pelo menos 99,5% ou 100% de identidade de sequência com a proteína 26 da membrana externa de HiNT-164;
- (9) Expressa uma proteína 2 de membrana externa, que funcione como uma corrida de eletroforese em gel unidimensional de poliacrilamida;
- (10) Expressa uma proteína 2 de membrana externa, que tem um pI de 9,1 - 9,3, mais preferivelmente um pI de 9,2;
- (11) Expressa destacadamente em um gel bidimensional de um extrato celular integral, pelo menos 5, pelo menos 10, ou pelo menos 15 das proteínas listadas na Tabela 11A;
- (12) Expressa, destacadamente, em um gel bidimensional de um extrato celular integral, pelo menos duas ou pelo menos três das proteínas listadas na Tabela 11B;

(13) Expressa destacadamente em um gel bidimensional de um extrato celular integral pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco, pelo menos sete, ou pelo menos dez das proteínas listadas na Tabela 11A, mas que não constem na Tabela 11C;

- 5 (14) Expressa destacadamente em gel bidimensional de um extrato celular integral pelo menos três, pelo menos quatro, ou pelo menos cinco das proteínas listadas na Tabela 11A e Tabela 11D.

Como aqui utilizado, o termo "expressa destacadamente uma proteína em gel bidimensional" indica que a proteína está presente
10 em um ponto suficiente para extração e análise de MALDI em gel bidimensional.

Além disso, o presente pedido provê regimes terapêuticos para pacientes com DPOC e asma.

Em algumas incorporações, os regimes terapêuticos para
15 asma incluem (1) testar um paciente, por exemplo, um paciente que apresente sintomas de asma, para (a) um nível elevado de neutrófilos na saliva, (b) a presença de um microrganismo no escarro ou saliva, e/ou (c) anticorpos específicos para o HiNT e (2) administrar uma vacina do presente pedido em um paciente positivos para um, dois ou para todos
20 os três parâmetros. Em algumas realizações, a vacina administrada compreende uma, duas ou mais linhagens de HiNT do presente pedido e/ou uma fração imunogênica de linhagens de HiNT do presente pedido.

A vacina do presente pedido pode ser uma vacina polivalente, ou de preferência, uma vacina monobacteriana.

25 Em certas modalidades, a vacina da presente invenção, pode estar na forma de comprimido, dito comprimido compreendendo um núcleo que contém a referida população ou a dita fração de membrana e um revestimento entérico em torno do referido núcleo.

Na vacina do presente pedido o peso do núcleo é de 400 mg a 500 mg.

Na vacina do presente pedido as bactérias mortas ou a fração de membrana constitui 7,5% a 15% do peso do núcleo do mencionado comprimido.

Na vacina do presente pedido as bactérias mortas ou a fração de membrana constitui aproximadamente 10% do referido núcleo do mencionado comprimido.

Na vacina da atual invenção o dito revestimento subentérico resulta em 2% a 3% do peso do núcleo.

Na vacina do presente pedido o referido revestimento entérico resulta em 10% a 12% do peso do núcleo.

Qualquer discussão acerca de documentos, ações, materiais, equipamentos, artigos ou algo parecido que tenha sido incluído na presente especificação é exclusivamente com a finalidade de proporcionar um contexto para o presente pedido. Não é para ser tomado como uma aceitação de que uma ou todas estas questões façam parte do estado da técnica ou constituam um conhecimento geral comum, no campo relevante para o presente pedido como se existisse antes da data de prioridade deste pedido.

As características e vantagens do presente pedido tornar-se-ão ainda mais evidentes a partir da seguinte descrição detalhada das realizações do mesmo.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 mostra as curvas de crescimento de HiNT-164 e uma cepa de referência para o meios de cultura diferentes.

A figura 2 descreve os dados de clearance das bactérias resultantes de diferentes regimes de vacinação com HiNT-164 em ratos machos Dard Agouti.

As figuras 3A e 3B demonstram os níveis médios de bactérias em camundongos imunizados com doses variadas de HiNT-164.

A figura 4 apresenta a resposta média proliferativa de linfócitos de linfonodos mesentéricos de ratos imunizados com o HiNT-
5 164.

As figuras 5A-5C descrevem a proliferação de linfócitos em seres humanos em resposta à vacinação com o HI-164. A figura 5A demonstra a proliferação periférica de linfócitos séricos em 1µg de antígeno de HI-164 *in vitro*. A figura 5B expõe a proliferação periférica
10 de linfócitos sérica em 10 µg de antígeno de HI-164 *in vitro*. A figura 5C exibe a proliferação periférica de linfócitos sérica em PHA *in vitro*.

A figura 6 mostra a lisozima da saliva (média ± SEM) em seres humanos após vacinação com HI-164.

A figura 7 exibe o efeito da vacinação de seres humanos
15 com o HI-164 em níveis IgG séricos.

A figura 8 apresenta um gráfico que mostra o número médio de HiNT isolados no gargarejo de um grupo de estudo de indivíduos humanos com doses de placebo.

A figura 9 é um gráfico que apresenta os níveis de IgG séricos específicos de HiNT em indivíduos humanos no grupo placebo e no grupo de tratamento imunizado com uma vacina oral de HiNT mortos.
20

A figura 10 é um gráfico que exibe os níveis IgG de saliva específicos de HiNT em seres humanos no grupo do placebo e no grupo
25 de tratamento imunizado com uma vacina oral de HiNT mortos.

A figura 11 revela os resultados da eletroforese em gel unidimensional de extratos de HI-164 e HI-166.

A figura 12 demonstra os resultados do gel unidimensional de extratos de vários isolados/linhagens de *Haemophilus influenzae*.

As figuras 13A-13D mostram os resultados da eletroforese em gel bidimensional de vários isolados/linhagens de *Haemophilus influenzae*, sendo a figura 13A um HI-164, preparado 2 crescido em placa, a figura 13B um HI-166, preparado 1, crescido em placa, a figura 13C. HI-167, preparado 1 crescido em placa e a figura 13D. HI-164, preparação da proteína de membrana externa (PME).

DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção provê vacinas baseadas no HiNT para o tratamento de doenças pulmonares, como asma e DPOC.

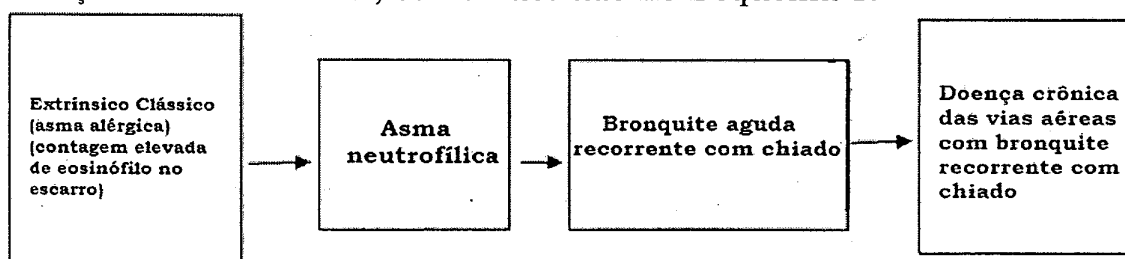
10 O paciente não precisa ter uma infecção de HiNT para se beneficiar das vacinas do presente pedido. Assim, em certos aspectos, um paciente a quem a vacina do presente pedido é administrada não tem uma infecção por HiNT ou marcadores indicativos de uma infecção por HiNT (por exemplo, anticorpos específicos HiNT). Em outros
15 aspectos, o paciente é positivo para uma infecção por HiNT ou tem marcadores indicativos de uma infecção por HiNT.

Como, em certas modalidades, a vacina do presente pedido é capaz de elicitar uma resposta imune não-específica contra outras bactérias que não o HiNT, um paciente pode ser positivo para outras
20 bactérias que não a infecção por HiNT ou tem marcadores indicativos de infecção por outras bactérias que não HiNT. Em modalidades específicas, a bactéria é uma ou mais das seguintes: *Staphylococcus aureus*; uma linhagem tipável de *Haemophilus influenzae*; *Streptococcus pneumoniae*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Mycoplasma pneumoniae*; *Haemophilus parainfluenzae*; β -Haemolytic *Streptococcus* spp.; α -Haemolytic *Streptococcus* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Klebsiella pneumoniae*; *Serratia marcescens*; *Enterobacter cloacae*; *Chlamydia pneumoniae*; e *Moraxella catarrhalis*.

O paciente a quem a vacina é administrada em conformidade com o presente pedido será normalmente um ser humano, embora a vacina também possa ser administrada a qualquer modelo adequado de asma em mamíferos.

5 Parâmetros adicionais e alternativos para um paciente a quem a vacina do presente pedido é administrada são discutidos abaixo.

Convencionalmente em estudos de asma, cuidados foram tomados para o estudo de grupos distintos e, geralmente, indivíduos com asma claramente definida (por exemplo, asma extrínseca clássica) são separados dos outros grupos (por exemplo, aqueles com doenças das vias aéreas relacionadas ao fumo), levando a estudos realizados em grupos definidos de pacientes asmáticos isolados de outros grupos de asmáticos. Todavia, esta é uma classificação artificial e, ao contrário, sendo mais realista para visualizar a asma como um espectro de doenças das vias aéreas, como ilustrado no Esquema 1.



Esquema 1: Espectro da doença de asma

Várias diferentes observações tem sido feitas com relação a estas diversas manifestações clínicas da asma. Em resumo, estas podem ser resumidas da seguinte forma:

- A indução de anticorpos IgE a antígenos inalados (por exemplo, os pólenes) dá origem a asma alérgica clássica em que o alérgeno-específico IgE se liga aos mastócitos causando degranulação dos mastócitos e

liberação de mediadores tais como a histamina, que dão origem a sintomas alérgicos.

- A colonização das vias aéreas danificadas e infecção viral intermitente podem conduzir o fluxo de neutrófilos para os brônquios (bronquite aguda) (geralmente associada com chiado – que se imagina seguir a "inflamação" dos brônquios).
- Fumar acarretando danos nos pulmões pode tornar o sujeito propenso a infecções das vias aéreas.

No entanto, muitos indivíduos asmáticos com asma clinicamente diagnosticados são "mistos" em relação a esses componentes e propõe-se que este espectro da doença de asma possa ser harmonizado pelo reconhecimento de que diferentes caminhos patogênicos podem levar à asma e que estas vias possam coexistir. Em particular, sem ser limitada pela teoria, é defendido pela Depositante que a causa dominante do chiado em muitos asmáticos sem demonstrável hipersensibilidade aos alérgenos clássicos (por exemplo, testes negativos para anticorpos IgE contra a poeira doméstica, pólenes e afins, e/ou a quem tenha elevada contagem de eosinófilos) é uma reação mediada de anticorpos IgE à colonização e/ou recorrente exposição a microrganismos em conjunção com a capacidade do microrganismo para induzir e ativar os neutrófilos. Especificamente, as vacinas baseadas em microrganismos podem reduzir a carga do microrganismo correspondente às pequenas vias aéreas, e proporcionar um tratamento eficaz para a chamada "asma intrínseca".

Em outros aspectos, e também sem ser limitado pela teoria, acredita-se que alguns pacientes que são passíveis de tratamento por parte das vacinas do presente pedido são alérgicos às bactérias e têm anticorpos IgE. Acredita-se também que, em tais indivíduos podem existir interações entre as bactérias e o estado de alergia a outros

alérgenos que contribuem para o estado asmático. Assim, em certos aspectos, as vacinas do presente pedido são usadas para tratar um paciente que seja um asmático alérgico.

Mais amplamente, o benefício das vacinas do presente
5 pedido pode ser obtido por aqueles pacientes que exibem um ou mais parâmetros indicativos de exposição a um microrganismo que é capaz de colonizar as vias aéreas, tais como níveis elevados de neutrófilos (com ou sem níveis elevados de eosinófilos), na saliva, infecção frequente com o microrganismo como, por exemplo, indicado pela
10 presença do microrganismo no escarro ou saliva e/ou anticorpos específicos para o microrganismo, e os pacientes com vias respiratórias danificadas, tais como em decorrência do tabagismo (doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)) ou bronquite crônica (especialmente aqueles pacientes que apresentam sibilância). Reconhece-se, por exemplo, que
15 pacientes com vias respiratórias danificadas são altamente propensos à infecção/colonização por microrganismos patogênicos. Assim como os danos às vias aéreas classicamente seguem o tabagismo, a asma extrínseca também pode danificar as vias aéreas (por isso, posterior ocorrência de tosse e expectoração associadas à infecção das vias
20 respiratórias). O benefício pode também ocorrer em pacientes asmáticos com mecanismos combinados (por exemplo, sujeitos atópicos com anticorpos IgE a um microrganismo que coloniza as vias aéreas), e no tratamento da asma e dos sintomas de asma em geral, como resultado da diminuição ou impedimento de indução da produção de IgE
25 resultante da exposição a uma vacina que tenha como alvo o microrganismo.

Os níveis de anticorpos podem ser medidos em amostras de sangue, soro, plasma, escarro ou saliva usando qualquer protocolo de ensaio convencionalmente conhecido e adequado, incluindo, ensaio

imunoenzimático (ELISA) ou outros imunoensaios. O anticorpo testado pode ser selecionado a partir de um ou mais entre IgA, IgM, IgG e IgE e subclasses dos mesmos, tais como o IgG1 e/ou IgG3. Os anticorpos IgE e/ou IgE totais específicos para um microrganismo que coloniza as vias aéreas geralmente será medido em amostra de escarro ou saliva. Os níveis de neutrófilos também podem ser medidos na saliva ou escarro usando qualquer ensaio convencionalmente conhecido e apropriado, incluindo a avaliação microscópica após coloração de células. Da mesma forma, qualquer método adequado conhecido no estado da arte pode ser empregado para determinar a contagem/nível de microrganismos da infecção. Os níveis de anticorpos, os níveis de neutrófilos e contagens de HiNT podem ser comparados com o(s) nível(is) de referência correspondente(s) derivado(s) dos asmáticos extrínsecos clássicos (por exemplo, exibindo eosinofilia e/ou hiper-responsividade) ou, por exemplo, um controle não-asmáticos ou outro grupo de referência indicado. Métodos estatísticos para diferenciar grupos de asma são descritos em, por exemplo, Simpson *et al.*, 2006, *Respirology* 11:54-61.

Em certos aspectos, os pacientes aos quais as vacinas do presente pedido são administradas podem ou não ter DPOC e/ou sintomas associados à DPOC, como a bronquite crônica e o enfisema.

A DPOC é uma doença lenta e progressiva das vias aéreas que é caracterizada pela perda gradual da função pulmonar. Pacientes com DPOC, que inclui bronquite crônica e enfisema, frequentemente requerem tratamento de emergência e internações, por vezes, durante os períodos de exacerbação da doença. A DPOC leva à obstrução crônica do fluxo respiratório, que é definida como uma redução persistente da taxa de fluxo de ar através dos pulmões quando a pessoa respira para fora (expira). Sintomas tais como chiado e falta de ar são aliviados

quando a obstrução do fluxo de ar diminui, revertendo o espasmo da musculatura lisa brônquica, a inflamação e o aumento das secreções.

Assim, em certos aspectos, um paciente a quem a vacina da presente invenção é administrada pode ter um ou mais dos seguintes
5 sintomas: bronquite crônica, enfisema, tosse crônica, produção excessiva de expectoração, baixos níveis de oxigênio no sangue, severa e incapacitante falta de ar, reduzido fluxo de ar através dos pulmões, espasmo da musculatura lisa brônquica, inflamação brônquica, e aumento das secreções brônquicas (incluindo *plugs* mucosos).

10 A DPOC severa é geralmente classificada em dois estereótipos – o *pink puffer* (soprador rosado) e o *blue bloater* (cianótico pletórico). A maioria dos pacientes com DPOC avançada têm características de ambos os estereótipos. O *pink puffer* é tipicamente um paciente asmático, enfisematoso com o peito em formato de barril
15 que exibe respiração com lábios semicerrados e não tem cianose ou edema. Normalmente, esse paciente utiliza os músculos extratorácicos para respirar, produz mínimo escarro, e experimenta pouca flutuação no nível diário da dispnéia. A mobilidade diafragmática encontra-se reduzida, e os sons da respiração e do coração são distantes. O tórax
20 em barril é inespecífico, pois idosos geralmente têm aumentada a complacência pulmonar e maior volume pulmonar de repouso. O *blue bloater* é tipicamente acima do peso, cianótico e edematoso e tem uma tosse crônica produtiva. *Blue bloaters* idosos são raros, porque os *blue bloaters* geralmente têm *cor pulmonale*, que leva rapidamente à morte se
25 não tratada adequadamente. Em certos aspectos, um doente a quem as vacinas do presente pedido são administradas apresentam a característica de um *pink puffer* e/ou de um *blue bloater*.

A hipóxia crônica (redução do suprimento de oxigênio para o corpo, apesar do fluxo sanguíneo através do corpo), a hipertensão e

hipertrofia ventricular esquerda são condições relacionadas que podem ser sintomáticas da DPOC ou coincidentes com a DPOC. Assim sendo, em certos aspectos, o paciente a quem a vacina da presente invenção é administrado tem hipóxia crônica, hipertensão arterial e/ou hipertrofia do ventrículo esquerdo.

A fibrose cística é um exemplo de um transtorno pulmonar obstrutivo, que resulta em bronquiectasia e declínios progressivos da capacidade pulmonar. Assim, em certos aspectos, o paciente a quem a vacina do presente pedido é administrada pode ter fibrose cística.

Em certos aspectos, o paciente é positivo para um gene ou outro marcador associado à DPOC (ver, por exemplo, US 20080108079 A1 e US 20080044843 A1, respectivamente, cada qual aqui incorporada por referência na sua totalidade). O paciente positivo para um ou mais genes ou marcadores pode ou não apresentar sintomas da DPOC, ou seja, as vacinas dos presentes pedidos podem ser administradas antes ou após o início dos sintomas da DPOC.

Em certos aspectos, o paciente a quem as vacinas do presente pedido são administradas não tem asma. Em uma modalidade específica, o paciente não tem asma extrínseca. Em outra modalidade específica, o paciente não tem asma intrínseca.

De acordo com o presente pedido, o tratamento da asma engloba o tratamento de pacientes já diagnosticados como tendo qualquer forma de asma em qualquer estágio clínico ou manifestação; o atraso no início ou na evolução ou agravamento ou deterioração dos sintomas ou sinais de asma; prevenção e/ou redução da severidade dos ataques de asma noturnos e/ou diurnos, melhora da capacidade pulmonar; prevenção da redução na capacidade pulmonar de pacientes asmáticos; impedir ou limitar a exacerbações adversas; impedir ou limitar internações por sintomas de asma; e/ou reduzir ou limitar a

necessidade de antibióticos, esteróides, broncodilatadores ou outras medicações.

Vantajosamente, a administração de uma vacina de acordo com uma ou mais realizações do presente pedido pode levar a uma
5 redução no nível de anticorpos IgE e/ou uma redução dos sintomas ou gravidade da asma (por exemplo, a asma intrínseca ou neutrofílica) no paciente.

De acordo com o presente pedido, o tratamento da DPOC engloba o tratamento de pacientes já diagnosticados como tendo
10 qualquer forma de DPOC em qualquer estágio clínico ou manifestação; o atraso no início ou na evolução ou agravamento ou deterioração dos sintomas ou sinais de DPOC; prevenir e/ou reduzir a gravidade dos episódios de sibilância e/ou a diminuição da respiração; a melhoria da capacidade pulmonar, impedindo uma redução na capacidade
15 pulmonar de pacientes; prevenir ou limitar as exacerbações adversas; impedir ou limitar internações por sintomas da DPOC e/ou reduzir ou limitar a necessidade de antibióticos, esteróides, broncodilatadores ou outras medicações.

A vacina pode ser administrada de acordo com qualquer
20 regime adequado para gerar uma resposta imune eficaz contra uma infecção pelo microrganismo. A vacina do presente pedido pode ser administrada em dose única ou, quando necessário ou desejado, a dose inicial pode ser seguida por um reforço de vários dias, semanas, meses ou anos seguidos à dose inicial.

25 Em uma modalidade exemplar, uma dose única da vacina pode ser administrada uma vez por ano antes do inverno. Opcionalmente, uma ou mais doses "booster" (de reforço) da vacina administrada com um intervalo de algumas semanas ou meses podem igualmente ser dadas. Alternativamente, um número de doses da vacina

podem ser administradas ao longo de várias semanas a fim de gerar uma resposta imune eficaz contra a infecção e/ou colonização por um microrganismo que seja capaz de colonizar as vias aéreas, tal como o HiNT.

- 5 Cada dose administrada a um paciente pode consistir de uma dose unitária (conforme descrito abaixo), ou mais ou menos. A dosagem específica eficaz para uso terapêutico vai depender, por exemplo, do componente imunogênico da vacina (como descrito abaixo), o peso e estado geral de saúde do paciente, o julgamento do médico que
- 10 prescreve, e o modo de entrega proposto, e a natureza da vacina (por exemplo, cápsulas, pó, líquidos, aerossol, comprimidos, comprimidos entericamente revestidos, etc.)

- As vacinas do presente pedido podem ser administradas utilizando qualquer rota de administração, incluindo, mas não limitado
- 15 a, por exemplo, subcutânea, intravenosa, intramuscular ou intradérmica, embora a administração pela mucosa seja a preferida. As rotas de administração pela mucosa incluem, mas não limitadas a administração oral, retal e nasal. Os preparativos para as administrações pela mucosa são convenientes em várias formulações,
- 20 como descritos abaixo. A via de administração pode variar durante o curso do tratamento.

- A vacina utilizada em um método do presente pedido normalmente conterá HiNT isolado(s) (por exemplo, formol-morto) totalmente mortos ou inativos (por exemplo, atenuados) de acordo com
- 25 o presente pedido. No entanto, o antígeno, solúvel ou particulado, compreendendo ou sendo constituído por membrana celular externa e/ou antígenos de superfície do microrganismo podem ser utilizados da mesma forma, ou em vez de, HiNT totalmente morto.

O antígeno solúvel e/ou particulado pode ser preparado pela lise de isolado(s) HiNT mortos ou viáveis. Uma fração para uso na vacina pode ser então preparada por centrifugação, filtração e/ou outras técnicas apropriadas conhecidas no estado da arte. Qualquer
5 método que atinja o nível necessário de rompimento celular pode ser aplicado, incluindo sonicação ou dissolução utilizando surfactantes adequados e agitação, e a combinação de tais técnicas. Quando a sonicação é empregada, o isolado pode ser submetido a uma série de etapas de sonicação, a fim de obter o grau desejado de rompimento
10 celular ou geração de matéria solúvel e/ou particulada de um tamanho específico ou tamanho de faixa.

Em modalidades específicas, os componentes imunogênicos são células mortas e/ou uma fração imunogênica de espécies de HiNT da presente invenção.

15 A falta de um gene de β -lactamases é uma característica opcional das linhagens de HiNT do presente pedido. β -lactamases são enzimas produzidas por algumas bactérias e são responsáveis pela sua resistência aos antibióticos β -lactâmicos como as penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, ertapenemos e carbapenêmicos. Os
20 antibióticos β -lactâmicos são tipicamente usados para tratar um amplo espectro de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Como a expressão de β -lactamases pode resultar em resistência a antibióticos, a presença de um gene de β -lactamases não é geralmente preferencial durante a fabricação e administração de agentes patogênicos mortos
25 como o HiNT. A falta de um gene de β -lactamases permite que o organismo seja controlado com antibióticos β -lactâmicos em caso de necessidade durante a fabricação ou um evento adverso em um paciente.

O *Haemophilus influenzae* não-tipável HI-164 isolado, depositado conforme disposições do Tratado de Budapeste, com o National Measurement Institute in Melbourne, na Austrália, em 13 de agosto de 2008, sob nº. V08/021002, como é particularmente adequado para uso em vacinas do presente pedido. Outra linhagem adequada é o isolado *Haemophilus influenzae* não-tipável HI-167, depositado conforme disposições do Tratado de Budapeste, com o Instituto Nacional de Medidas de Melbourne, na Austrália, em 13 de agosto de 2008 e atribuído com o nº. V08/021003.

Em uma ou mais incorporações, a fração de membrana celular externa ou proteína(s) da membrana da cepa HiNT selecionada(s) será(m) utilizada(s) como componente imunogênico de uma vacina do presente pedido.

Proteínas e peptídeos imunogênicos de HiNT tem sido descritos. Em uma realização específica, uma fração de proteína de membrana externa (PME) de HiNT ou proteína PME é usada como um componente imunogênico de uma vacina do presente pedido. As PMEs de HiNT incluem a PME P6, uma lipoproteína de 16-kDa altamente conservada (Nelson *et al.*, 1988, *Infect Immun* 56: 128-134), que é alvo de anticorpos bactericidas humanos e induz a proteção tanto em modelos humanos quanto animais. Na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), foi demonstrado que a PME P6 evoca uma resposta proliferativa linfocitária que está associada à proteção relativa contra a infecção por HiNT (Abe *et al.*, 2002, *Am. J. Respir Crit Care Med* 165: 967 -71). Consequentemente, a PME P6 ou quaisquer outras adequadas proteínas de HiNT da membrana externa, polipeptídeos (por exemplo, P2, P4 e P26) ou peptídeos antigênicos dessas proteínas podem convenientemente ser usados como os componentes imunogênicos das vacinas do presente pedido, seja de forma isolada e purificada ou como

um componente de uma fração celular, como, por exemplo, uma fração PME.

Em uma incorporação, a proteína ou peptídeo imunogênico é PME P26 ou um fragmento imunogênico dos mesmos. Em outra
5 incorporação, a proteína ou peptídeo imunogênico é PME P2 ou um fragmento imunogênico do mesmo. Em realizações específicas, a vacina compreende (1) uma proteína PME P26 ou fragmento imunogênico do mesmo, que tenha pelo menos 99% ou pelo menos 99,5% de identidade de sequência com a proteína PME P26 do HiNT-164, e/ou (2) uma
10 proteína PME P2 ou fragmento imunogênico da proteína, que tenha pelo menos 99% ou pelo menos 99,5% de identidade de sequência com a proteína PME P2 de HiNT-164.

Uma vacina da presente invenção tipicamente compreende as células do componente imunogênico selecionado (ou seja, HiNT
15 isolado(s) e/ou frações celulares e/ou proteínas e/ou peptídeos isolados ou purificados), num total de cerca de 0,1% a 100% p/p da composição da vacina, mais preferencialmente, de 1% a 50% p/p da composição da vacina.

Para todas as vacinas de células mortas, a dose unitária
20 será tipicamente na faixa de cerca de 10^9 até cerca de 10^{12} células mortas, mais preferencialmente, de cerca de 10^9 até cerca de 10^{11} de células mortas, e mais preferencialmente ainda, cerca de 10^{10} a mais ou menos 10^{11} de células mortas.

No caso das vacinas feitas de frações celulares de HiNT, a
25 dose unitária será fracionada a partir de cerca de 10^9 a aproximadamente 10^{14} de células, mais preferencialmente, fracionada cerca de 10^{10} até cerca de 10^{13} de células, e mais preferivelmente fracionada de cerca de 10^{10} até mais ou menos 10^{12} de células.

Para vacinas contendo proteínas purificadas ou isolada e fragmentos de peptídeos, a dose unitária é geralmente 50-75 mg, 75-100 mg, 100-125 mg, 125-150 mg, 150-175 mg, 175 - 200 mg ou mais.

5 A dosagem ideal da vacina pode ser determinada pela administração de doses diferentes para diferentes grupos de mamíferos de teste, antes de infectar os animais, posteriormente, em cada grupo, com o microrganismo, e determinar o nível de dosagem necessária para conseguir a satisfatória remoção do patógeno.

10 Uma vacina do presente pedido pode incluir também um ou mais carreadores e/ou adjuvantes farmacêuticamente aceitáveis. Os adjuvantes exemplares que podem ser utilizados são detalhados abaixo. Normalmente, embora não exclusivamente, a formulação preferida da vacina oral é sem adjuvante.

15 Métodos atuais para preparar as formulações da vacina do presente recurso serão conhecidos ou aparentes para os técnicos no assunto e estão descritos em detalhes em publicações como a *Remington's Pharmaceutical Science*, 15th ed. Mack Publishing Company, Easton, Pensilvânia (1980).

20 As vacinas do atual pedido são geralmente providas em composições com carreadores farmacêuticamente aceitáveis. Vários carreadores farmacêuticamente aceitáveis são bem conhecidos no estado da técnica. Conforme utilizado neste documento, "carreadores farmacêuticamente aceitáveis" inclui qualquer material que, quando combinado com um ingrediente ativo de uma composição, permite que o
25 ingrediente mantenha a atividade biológica e, de preferência não cause reações no sistema imunológico do indivíduo.

Em geral, as vacinas podem ser preparadas de diversas formas, tais como grânulos, comprimidos, pílulas, supositórios, cápsulas (por exemplo, adaptadas para administração oral), *microbeads*,

microesferas, lipossomas, suspensões, pomadas, loções e similares. A vacina em si pode ser uma vacina liofilizada ou "*freeze-dried*" reconstituída, utilizando um tampão ou um fluido fisiologicamente aceitável. A vacina também pode conter um ou mais agentes anti-
5 aglomerantes, conservantes, como o timerosal, ou que sejam de outra forma apropriada para o modo de administração proposto, estabilizadores, tais como aminoácidos e moléculas de açúcar, agentes edulcorantes como a sacarose, lactose ou sacarina, surfactantes, agentes tampão de pH e modificadores de pH que podem ser o hidróxido
10 de sódio, ácido clorídrico, fosfato monossódico e/ou fosfato dissódico, um carreador farmacêuticamente aceitável, tal como soro fisiológico, solventes e meios de dispersão e preparações isotônicas.

A vacina é vantajosamente apresentada para administração oral, por exemplo, em um formato liofilizado encapsulado ou em
15 comprimidos. É reconhecido que o componente imunogênico de uma vacina da atual invenção, quando administrado por via oral, é, de preferência, protegido da digestão. Isso pode ser feito misturando ou embalando o componente imunogênico em um veículo adequadamente resistente, como um lipossoma, ou dentro de um revestimento entérico.
20 Os preparativos também podem ser fornecidos em liberação controlada ou de outras formas de liberação retardada.

Preferencialmente, a formulação oral é na forma de uma cápsula ou comprimido. Essas cápsulas e comprimidos podem ser providos de um revestimento entérico que inclua, por exemplo,
25 Eudragate "S"TM, Eudragate "L"TM, acetato de celulose, ftalato de celulose ou hidroxipropilmetil celulose. Outros veículos adequados para a formulação de cápsulas ou comprimidos incluem agentes de ligação (por exemplo, amido de milho pregelatinizado, polivinil pirrolidona ou hidroxipropilmetil celulose); cargas (por exemplo, lactose, celulose

microcristalina ou hidrogenofosfato de cálcio), lubrificantes (por exemplo, estearato de magnésio, talco ou sílica); desintegrantes (por exemplo, fécula de batata ou amido glicolato de sódio) e agentes umectantes (por exemplo, lauril sulfato de sódio). Os comprimidos
5 podem ser revestidos por métodos conhecidos na técnica. Os preparativos para a administração oral podem ser convenientemente formulados para proverem liberação controlada do componente imunogênico.

Estas cápsulas e comprimidos podem ser usados, tal como,
10 ou, alternativamente, material liofilizado que pode ser reconstituído antes da administração, por exemplo, como uma suspensão.

Como uma alternativa às cápsulas e aos comprimidos, a vacina oral pode ser na forma líquida, por exemplo, soluções, xaropes ou suspensões, ou pode ser apresentada como um medicamento para
15 reconstituição com água ou outro veículo apropriado antes do uso. Tais preparações líquidas podem ser preparadas por meios convencionais com aditivos farmacêuticamente aceitáveis como agentes de suspensão (por exemplo, o xarope de sorbitol, derivados de celulose ou de gorduras hidrogenadas comestíveis), agentes emulsionantes (por exemplo, lecitina
20 ou acácia), veículos não-aquosos (por exemplo, óleo de amêndoa, ésteres graxos ou óleos vegetais fracionados) e conservantes (metil, ou propil-p-hidroxibenzoatos ou ácido sórbico, por exemplo).

A fim de proteger o componente imunogênico da vacina da acidez gástrica, uma preparação de bicarbonato de sódio pode ser
25 vantajosamente administrada antes de cada administração da vacina.

A vacina pode também ser formulada para administração por inalação ou injeção.

Salvo contrário, qualquer meio convencional ou agente que seja incompatível com o componente imunogênico de uma vacina da

presente invenção ou método de administração proposto e uso dessas vacinas que podem ser empregados em métodos de realização pela presente invenção são especificamente abrangidos.

Agentes ativos suplementares para estimular a resposta imunológica, incluindo, por exemplo, os microrganismos probióticos, frações e produtos biológicos e citocinas apropriadas, também podem ser incluídos na vacina.

Uma vacina do atual pedido, opcionalmente, compreende um ou mais adjuvantes. Exemplos de adjuvantes adequados são aqui apresentados abaixo.

Os adjuvantes adequados incluem adjuvantes de sal mineral ou adjuvantes de gel de sal mineral. Tais adjuvantes de sal mineral e gel de sal mineral incluem, mas não estão limitados a: hidróxido de alumínio (ALHYDROGEL, REHYDRAGEL), gel de fosfato de alumínio, hidroxifosfato de alumínio (ADJU-PHOS) e fosfato de cálcio. Outros adjuvantes adequados incluem adjuvante imunoestimulador. Tal classe de adjuvantes inclui, mas não estão limitados a: citocinas (por exemplo, a interleucina-2, interleucina-7, IL-12, fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), γ -interferon, β -interleucina-1 (β -IL-1) e IL-1 (peptídeo 3 (3 *peptide*) ou peptídeo (*Sclavo peptide*), lipossomas contendo citocina, glicosídeos triterpenóides ou saponinas (por exemplo, QuilA e QS-21, também vendido sob a marca STIMULON, ISCOPREP), derivados de dipeptídeo Muramil (MDP), tais como, N-acetil-L-muramil-L-treonil-D-Isoglutamina (Treonil-MDP, vendidos sob a marca TERMURTIDE), GMDP, N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-Isoglutamina, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitatoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina, fosfatidiletanolamina tripeptídeo muramil (MTP-PE), dinucleotídeos CpG não-metiladas e oligonucleotídeos, tais como o DNA de bactérias e

fragmentos dos mesmos, LPS, monofosforil lipídeo A (3D MLA vendido sob a marca MPL), e polifosfazenos. No entanto, outros adjuvantes adequados incluem partículas adjuvantes, incluindo, todavia não limitado a, emulsões, por exemplo, Adjuvante Completo de Freund, 5 Adjuvante incompleto de Freund, esqualeno ou formulações esqualano adjuvante óleo-em-água, como SAF e MF59, por exemplo, preparado com copolímeros em bloco, tais como L-121 (poloxipropileno/polioxipolietileno) vendidos sob a marca PLURONIC L-121, lipossomas, Virossomos, coquelatos e complexo estimulante 10 imunológico, que é vendido sob a marca ISCOM. No entanto, outros adjuvantes adequados são os adjuvantes microparticulados, tais como, mas não limitados a: poliésteres biodegradáveis e biocompatíveis, homo e copolímeros de ácido láctico (PLA) e ácido glicólico (PGA), micropartículas de poli (ácido láctico-co-glicolídeos) (PLGA), polímeros 15 que se auto-associam (partículas de poloxamer), polímeros solúveis (polifosfazenos), e partículas do tipo vírus (VLPs), tais como particulados de proteína recombinante, por exemplo, o antígeno de superfície da hepatite B (HbsAg).

Uma classe preferível de adjuvantes são os adjuvantes de 20 mucosa, incluindo, porém não limitados a enterotoxina termo-lábil de *Escherichia coli* (LT), cólera holotoxina (CT) e subunidade B da toxina da cólera (CTB) do *Vibrio cholerae*, toxinas mutantes (por exemplo, LTK63 e LTR72), micropartículas e lipossomas polimerizados.

Em alguns aspectos, o adjuvante é um adjuvante que ativa 25 uma resposta imunológica de Th1. Preferencialmente, o adjuvante não inicia uma resposta imune Th2, embora os adjuvantes que ativam uma resposta imune Th2 estejam contidos no escopo do presente pedido.

As vacinas do presente pedido podem ser formuladas de uma forma adequada. Em geral, as vacinas da presente invenção podem

ser administradas por via oral, nasal, nasofaríngea, parenteral, entericamente, gastricamente, topicamente, por via transdérmica, subcutânea, intramuscular, em comprimidos, sólidos, em pó, em forma de líquidos, aerossóis, local ou sistemicamente, com ou sem carreadores
5 adicionais.

Uma vacina do presente pedido pode ser administrada como uma cápsula ou comprimido, na forma de pó seco ou de líquido. A administração pode, por exemplo, ser realizada por injeção (por exemplo, subcutânea, ou intravenosa), oralmente, tal como, por
10 dosagem unitária (por exemplo, comprimido, cápsula ou forma de dose líquida), ou por inalação.

Em algumas modalidades, uma vacina da presente invenção é administrada de uma forma que permite ao componente imunogênico alcançar um tecido linfóide, sendo preferível um tecido
15 linfóide secundário, e mais ainda um tecido linfóide associado à mucosa. Em certas realizações, o tecido linfóide associado à mucosa é o BALT (tecido linfóide associado ao brônquio), NALT (tecido linfóide associado ao nariz), LALT (tecido linfóide associado à laringe) ou GALT (tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal). Mais
20 preferencialmente, será administrada por meio de um comprimido entericamente revestido para permitir a liberação do componente imunogênico da vacina para as placas de Peyer, as quais são agregados de tecido linfóide que são predominantemente encontrados na porção inferior do íleo, e outro tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal
25 (GALT) no intestino do paciente.

A seguir estão descritos os métodos combinatórios em que as vacinas do presente recurso podem ser utilizadas. Os métodos combinatórios da atual realização envolvem a administração de pelo menos dois agentes a um paciente, dos quais o primeiro é uma vacina

visando um microrganismo, de acordo com a presente invenção, e o segundo é um agente terapêutico secundário.

Os métodos da terapia combinatória do presente pedido podem resultar em um maior efeito adicional, proporcionando 5 benefícios terapêuticos quando nem a vacina nem o segundo agente terapêutico for administrado em uma quantidade que individualmente seja eficaz no tratamento da asma.

Nos métodos atuais, a vacina e o segundo agente terapêutico podem ser administrados concomitantemente ou 10 sucessivamente. Conforme utilizado aqui, a vacina e o segundo agente terapêutico são compreendidos como administrados concomitantemente se forem administrados ao paciente no mesmo dia, por exemplo, simultaneamente, ou com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 horas de intervalo. Em contraste, a vacina e o segundo agente terapêutico são entendidos como 15 administrados sucessivamente se forem administrados ao paciente em dias diferentes, por exemplo, a vacina e o segundo agente terapêutico podem ser administrados em intervalos de 1 dia, 2 dias, ou 3 dias, uma semana, duas semanas ou mensais. Nos métodos do atual pedido, a administração da vacina pode preceder ou suceder à administração do 20 segundo agente terapêutico.

Como exemplo não-limitante, a vacina e o segundo agente terapêutico podem ser administrados concomitantemente, durante um período de tempo, seguido por um segundo período em que a administração da vacina e do segundo agente terapêutico é alternada.

25 Devido aos efeitos potencialmente sinérgicos de administrar uma vacina e um segundo agente terapêutico, esses agentes podem ser administrados em quantidades que, se um ou ambos dos agentes for administrado isoladamente, não seja(m) eficaz(es) no tratamento da asma e DPOC.

A maioria das pessoas com asma persistente usa uma combinação de medicamentos controles em longo prazo e medicação de alívio imediato, através de um inalador de portátil. Os sintomas da asma desencadeados por alérgenos transportados pelo ar, como o *pólen* ou pelos de animais, também são tratados com medicamentos antialérgicos.

Portanto, os agentes terapêuticos secundários adequados incluem medicamentos controlados de longo prazo, medicamentos de alívio rápido, e antialérgicos.

Exemplos de medicamentos de controle em longo prazo incluem, mas não estão limitados a (1) corticosteróides inalantes como a fluticasona (por exemplo, Flovent DiskusTM), budesonida (por exemplo, PulmicortTM), triancinolona (por exemplo, AzmacortTM), flunisolida (por exemplo, AerobidTM), e beclometasona (por exemplo, QvarTM); (2) β -2 agonistas de longa ação (LABAs), tais como o salmeterol (por exemplo, Serevent DiskusTM e formoterol (por exemplo, Foradil AerolizerTM, OxisTM, PerformistTM e BrovanaTM); (3) antagonistas muscarínicos de longa ação, tais como o tiotrópio (por exemplo, SpirivaTM) e o ipratrópio (por exemplo, AtroventTM); (4) modificadores de leucotrienos como o montelucaste (por exemplo, SingulairTM), zafirlucaste (por exemplo, AccolateTM) e zileuton (por exemplo, Zyflo CRTM); (5) inibidores de mastócitos tais como cromolyn (por exemplo, IntalTM) e nedocromil (por exemplo, TiladeTM); (6) teofilina.

Exemplos de medicamentos de alívio imediato incluem (1) β -2 agonistas de curta ação (SABAs), tais como albuterol ou sulfato de albuterol (por exemplo, tal como é vendido sob a marca XopenexTM e VentolinTM), (2) antagonistas muscarínicos de ação curta, e (3) corticosteróides orais e intravenosos, como a prednisona, a metilprednisolona, o furoato de mometasona (por exemplo, tal como é

vendido sob a marca Asmanex™) e ciclesonida (por exemplo, Aerobid™/Alvesco™).

Exemplos de medicamentos antialérgicos incluem (1), imunoterápicos, (2) anti-histamínicos (por exemplo, Claritin™ e Zyrtec™) e (3) anticorpos monoclonais anti-IgE, tais como o omalizumabe (Xolair™). Exemplos de mucolíticos incluem, contudo não limitados a Bronchitol™ (um inalador de manitol) e Mucomyst™ (um inalador de acetilcisteína).

Em determinadas ações, o segundo agente terapêutico é um produto de combinação, ou seja, um produto que contém mais de um ingrediente ativo. Exemplos de produtos de combinação adequada incluem Symbicort™ (uma combinação de formoterol e budesonida); Combivent (uma combinação de atrovent e albuterol) e Advair™ ou Seretaide™ (uma combinação de salmeterol e fluticasona); uma combinação de um agonista(s) β -adrenérgico de longa ação, como indacaterol com mometasona; e uma combinação de β -2 agonista de longa duração, como formoterol com mometasona.

BRONCODILATADORES – Os medicamentos que ajudam a liberar as vias aéreas são um pilar do tratamento da DPOC. Broncodilatadores são mais comumente na maioria das vezes administrados em uma forma inalada através de um inalador de dose medida (MDI), inalador de pó seco (DPI), ou nebulizador. É importante usar o inalador corretamente para liberar a dose certa de medicação para os pulmões, e não na boca. Qualquer dos broncodilatadores descritos acima podem ser usados em combinação com as vacinas HiNT do presente pedido para o tratamento da DPOC.

VACINAS - Em algumas modalidades, o segundo agente terapêutico é uma vacina, como por exemplo, uma vacina contra o pneumococo, que ajuda a evitar um tipo de pneumonia, ou uma vacina

contra a gripe, que em geral é administrada antes da temporada de gripe, normalmente final do outono ou início do inverno.

AGENTES ANTIVIRAIS - Para pacientes com DPOC que adquiram gripe, medicamentos antivirais podem ser prescritos.

- 5 Medicamentos antivirais também podem ser recomendados para pessoas com DPOC que não tenham sido vacinados contra a gripe e estejam em risco de contrai-la. Deste modo, em certos aspectos, o segundo agente terapêutico é um agente antiviral.

- 10 ANTIBIÓTICOS - Os antibióticos são de algum benefício em pessoas com infecção respiratória bacteriana que piore os sintomas da DPOC. Um médico pode pedir um exame de escarro (do escarro nos pulmões), para determinar se os antibióticos são necessários em uma situação particular. Assim, em certos aspectos, o segundo agente terapêutico é um antibiótico.

- 15 OXIGÊNIO - Pacientes com DPOC avançada podem ter baixos níveis de oxigênio no sangue. Esta condição, conhecida como hipoxemia, pode ocorrer, mesmo se a pessoa não sentir falta de ar ou outros sintomas. O nível de oxigênio pode ser medido com um dispositivo colocado no dedo (oxímetro de pulso) ou com um exame de sangue (gasometria arterial). Os pacientes com hipoxemia podem ser
- 20 inseridos na terapia de oxigênio, a qual pode melhorar a sobrevida e a qualidade de vida, dependendo do grau a que o nível de oxigênio no sangue reduziu. Logo, em alguns aspectos, o segundo agente terapêutico é o oxigênio.

- 25 TERAPIA DE REPOSIÇÃO PARA DEFICIÊNCIA α -1-ANTITRIPSINA - Pessoas com α -1-antitripsina como um contribuinte para sua DPOC podem ser tratadas com α -1-antitripsina purificada, que é preparada a partir de sangue concentrado doado. Portanto, em certas modalidades, o segundo agente terapêutico é a α -1-antitripsina.

OUTRAS TERAPIAS – Alguns pacientes com DPOC podem receber outros tratamentos, incluindo: suporte ventilatório não invasivo (o uso de uma máscara especial e máquina de respiração para melhorar os sintomas), ansiolíticos ou antidepressivos, ou medicamentos semelhantes à morfina para reduzir a falta da respiração. Essas terapias podem constituir o segundo agente terapêutico da presente invenção.

EXEMPLO 1: SELEÇÃO DE CEPAS DE *H. INFLUENZA* HI-164

1.1 Histórico

Uma série de isolados de HiNT, incluindo a linhagem IDs 164, 165, 167 e 168, foram coletados de 20 pacientes de uma clínica respiratória no Hospital John Hunter, em Newcastle, Austrália. Os isolados e isolados de outras pesquisas (cepa HiNT-166) foram caracterizados por condições de crescimento, biótipo, o sorotipo, a presença de um gene de cápsula B e a presença do gene de β -lactamases. Os resultados são apresentados na tabela 1 abaixo:

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO DE DIFERENTES ISOLADOS DE
HiNT

ID da linhagem	Condições de Crescimento	Biotipo	Serotipo	Gene de cápsula B	β -lactamase
HiNT-164	Aeróbico	I	Não-tipável	Negativo	Negativo
HiNT-165	Aeróbico	I	Não-tipável	Negativo	Positivo
HiNT-166	Aeróbico	I	Não-tipável	Positivo	Negativo
HiNT-167	Aeróbico	I	Não-tipável	Negativo	Negativo
HiNT-168	Anaeróbico	I	Não-	Negativo	Positivo

			tipável		
--	--	--	---------	--	--

Os isolados foram testados quanto à utilidade como componente ativo da vacina oral em um modelo roedor de infecção respiratória aguda. Os isolados também foram testados quanto à capacidade de estimular linfócitos humanos *in vitro* para secretar IFNy.

5 Com base nesses testes o isolado HiNT-164 foi selecionado como a linhagem HiNT para uso na vacina oral HI-164OV da *Hunter Immunology Ltd.* Este isolado tem propriedades que fazem dele uma escolha ideal para uso em uma vacina oral que proporciona proteção contra a infecção pelo *H. influenzae*.

10 Em ambos os exemplos e o restante da especificação, o termo "HI-164OV" refere-se a um comprimido de vacina compreendendo HI-164, ou seja, uma substância ativa de HiNT-164 liofilizado morto por formalina.

1.2 RESUMO DAS PROPRIEDADES DO HiNT-164

1.2.1 Identificação Microbiológica

Identificação do *H. influenzae*: Requer fatores de crescimento X e V. Identificação não-tipável (isto é, ausência de cápsula de qualquer tipo) e nenhuma expressão de cápsula B e nenhum gene B cápsula, nenhuma β -lactamase.

1.2.2 Características de Crescimento

Cresce bem em Oxoid™ (Caldo de Tripton de Soja (TSB)) suplementado com suplemento *Haemophilus* Test (HTM). Também cresce bem em Oxoid™ caldo "veggitone" com suplemento HTM.

25 A capacidade de vários meios de cultura para promover o crescimento do *H. influenzae* HiNT-164 e do ATCC 19418 foi analisada e os resultados comparados. O *H. influenzae* HiNT-164 e o *H. influenzae* ATCC19418 foram incubados em Erlenmeyers de 250 ml, contendo 100 ml de cada um deles:

- Caldo de Triptona de soja (Código CM129. Lote B.: 301377)
 - Caldo de Triptona de soja (CM129 Código Lote B.: 301377) mais Extrato de levedura (Oxoid Código L21, Lote Ch-B.: 856108)
 - *Veggitone* Peptona de Vegetais (Oxoid Código VG0100, Lote 335918)
- 5 - *Veggitone* Peptona de Vegetais (Oxoid Código VG0100, Lote 335918), além de extrato de levedura (Oxoid código L21, Lote Ch -B.: 856108).

Cada meio foi suplementado com suplemento *Haemophilus* Test (HTM), Oxoid Código SR158E. Lote B.: 312141. O crescimento foi a 37°C no ar ambiente, com cerca de 2 rotações dos frascos por segundo.

- 10 A fase estacionária foi alcançada após aproximadamente 11 horas de incubação.

Todos os meios utilizados suportaram o crescimento de ambas as linhagens de *H. influenzae*, com o mais nutritivo de TSB acrescido de extrato de levedura e suplemento HTM sendo esta a

- 15 formulação preferida. Os meios de cultura com base animal (TSB) e os meios à base de vegetais (Peptona de Vegetais) foram aproximadamente equivalentes em características de crescimento para os dois isolados.

- Com a preferida formulação do meio (TSB com Extrato de Levedura e suplemento HTM) as densidades ópticas para as ações das
- 20 cepas de *H. influenzae* HiNT-164 e ATCC 19418 ao longo do tempo foram aproximadamente equivalentes, com OD's a 595nm e 11 horas de incubação para *H. influenzae* HiNT-164 e ATCC 19418, sendo 0,590 e 0,525, respectivamente. Note que outros meios de cultura podem produzir resultados de crescimento semelhantes ou melhores. As curvas
- 25 de crescimento de HiNT-164 e ATCC 19418 são mostradas na figura 1.

Para produção em larga escala, o HiNT-164 pode ser cultivado em meio contendo $30 \pm 0,3$ g/L de caldo de triptona de soja; $5 \pm 0,05$ g/L de extrato de levedura e $0,20 \pm 0,01$ g/L de antiespumante e suplementado com dinucleotídeo adenina nicotinamida (NAD) a 15

mg/ml e hematina em 15 mg/ml. Os suplementos são adicionados em volumes de até 4 ml/L.

1.3 CAPACIDADE PARA INDUZIR PROTEÇÃO À INFECCÃO EM MODELOS

ROEDORES

5 Estes dados demonstram que o HiNT-164 morto tem a capacidade de estimular uma resposta imune protetora. A Depositante acredita que esta capacidade está relacionada com o padrão de expressão de antígenos bacterianos e/ou a existência de adjuvantes naturais e/ou a capacidade de captação para as placas de Peyer (que
10 está provavelmente relacionada com o tamanho das partículas e também, eventualmente, com as proteínas de adesão).

1.4 HI-164 PROTEGE CONTRA A INFECCÃO RESPIRATÓRIA AGUDA EM RATOS

Os ratos foram imunizados no dia 0 através de uma dose única de HiNT-164 morto por formalina de 3×10^7 , 3×10^8 , ou 3×10^9
15 (aqui referida como HI-164) liberado diretamente para o lúmen intestinal, ou seguido por uma dose oral no 14º dia ou duas doses por via oral nos dias 14 e 21 (ou seja, os ratos receberam uma, duas ou três doses). No dia 28 uma dose de reforço (com capacidade para aumentar a dose intestinal, mas sem a capacidade de proporcionar imunidade
20 protetora por conta própria) foi liberada para os pulmões por instilação na traquéia. Os ratos de controle para cada regime de imunização foram imunizados com placebo (PBS). No dia 35 os ratos foram infectados por instilação intra-traqueal de 5×10^8 de HiNT-164 vivos. Quatro horas depois, os ratos foram mortos para a amostragem. Os pulmões foram
25 lavados para proverem o fluido da lavagem bronco-alveolar (LBA) e o pulmão foi homogeneizado em PBS para fornecer um homogeneizado de pulmão (LH). Diluições em série do BAL e LH foram preparadas e as amostras de cada diluição colocadas em placas de ágar chocolate. As placas foram cultivadas durante a noite a 37°C em uma atmosfera de

5% de CO₂. As colônias na placa foram contados e o número de HiNT-164 (unidades formadoras de colônia, ou UFC) no BAL e LH calculado. O total de UFC de HiNT-164 no pulmão foi determinada. A média de UFC nos pulmões para os animais imunizados pela vacina e aqueles
5 imunizados com placebo foi calculado e o “clearance” (depuração) de bactérias providas por cada esquema de vacinação foi calculado em relação ao grupo controle pertinente. Os resultados são mostrados na figura 2. Uma boa depuração bacteriana foi obtida nos animais que receberam uma ou mais doses quando a dose foi 3×10^8 ou 3×10^9 . Uma
10 boa depuração bacteriana foi obtida nos animais que receberam duas ou três doses quando a dose foi 3×10^7 .

1.5 HiNT-164 PROTEGE CONTRA A INFECÇÃO RESPIRATÓRIA POR H. INFLUENZAE EM CAMUNDONGOS

Estes experimentos demonstram a capacidade do HiNT-164
15 para proteger camundongos, assim como ratos. É ainda demonstrado que a vacina é mais protetora em uma linhagem do rato que seja mais suscetível à infecção.

Os camundongos C57BL/6 e Balb/c foram imunizados por gavagem com PBS ou HiNT-164 mortos em PBS (tamanhos da dose
20 5×10^6 , 5×10^7 e 5×10^8) nos dias 0 e 14. Os camundongos foram reforçados por via intra-traqueal, com uma dose não imunizadora (5×10^5) de HiNT-164 mortos no dia 20 ou 21. Os camundongos foram infectados por via intra-traqueal com 1×10^7 de HiNT-164 vivos no dia 27 ou 28 e mortos 4 horas mais tarde para a amostragem. Níveis de Hi-164 vivos nos
25 pulmões foram medidos através do plaqueamento de diluições seriadas de fluido de lavagem bronco-alveolar (LBA) e de homogeneizado de pulmão (LH) em placas de ágar chocolate e cultura durante a noite a 37°C em 5% de CO₂. As colônias foram contadas, o número de HiNT-164 nas amostras originais de LBA e LH apurado e os níveis totais de

bactérias em cada pulmão de camundongos calculado. O nível médio de bactérias em cada grupo de ratos ($\pm$ EP) é mostrado nas figuras 3A e 3B. Camundongos C57BL/6 não imunizados apresentaram níveis mais altos de infecção do que os ratos Balb/c não-imunizados, indicando que

5 Balb/c tinha uma melhor proteção inata. No entanto, a vacina de HiNT-164 mortos foi altamente eficaz em camundongos C57BL/6, sugerindo que o mecanismo específico de proteção foi do tipo Th1 uma vez que foi demonstrado que os ratos C57BL/6 têm um fenótipo Th1 (isto é, respondem mais prontamente com uma resposta imunológica do tipo

10 Th1) e os camundongos Balb/c mais de um fenótipo Th2 (isto é, respondem mais prontamente com uma resposta tipo Th2).

1.6 CAPACIDADE DE PROTEÇÃO CRUZADA CONTRA OUTROS ISOLADOS DE *H. INFLUENZAE*

Este exemplo demonstra a ampla proteção cruzada provida

15 pela imunização com HiNT-164 mortos por formalina. Isso não foi previsto por Sethi e Murphy (Sethi & Murphy, 2002, *Clinical Microbiology Reviews* 14 (2):336-363) que veem a falta de conservação pela maioria das PME P2 como sendo a causa da aparente falta de proteção cruzada no homem.

20 Os ratos foram imunizados por via intra-traqueal nos dias 0 e 14 com uma vacina compreendendo 5×10^8 de HiNT-164 mortos em 50 μ l PBS. Os ratos foram posteriormente infectados no dia 21 com uma entre uma variedade de cepas de *H. influenzae* que eram cepas não tipáveis de biótipo diferente, ou cepas do tipo b. A Tabela 2 mostra que

25 foi proporcionada proteção contra todos os biótipos testados das linhagens não-tipáveis. A tabela 3 mostra que foi fornecida proteção também contra 2 de 3 cepas do tipo b testadas.

TABELA 2: % DE CLEARANCE (REMOÇÃO) DO HiNT

% de clearance de HiNT: (UFC em placebo – UFC no ativo) x 100/UFC em placebo									
Linhagem da Vacina	Linhagem de infecção (isolado de <i>H. influenza</i> não-tipável)								
	HI 289 Biotipo I HiNT- 166	Isolado 1 HiNT- 165	Isolado 2 HiNT- 164	Isolado 3 HiNT- 168	Isolado 4 HiNT- 167	ATCC 43041 Biotipo VII	ATCC 43095 Biotipo III	ATCC 35092 Biotipo VIII	ATCC 51997 Biotipo V
HI-164	87	82	87	91	83	74	85	78	89

TABELA 3: % DE CLEARANCE (REMOÇÃO) *H. INFLUENZAE* TIPO B

% de clearance de HiNT: (UFC em placebo – UFC no ativo) x 100/UFC em placebo			
Linhagem da Vacina	Linhagem de infecção (isolado de <i>H. influenza</i> não-tipável)		
	Hib 8719	ATCC 10211	ATCC 9795
HiNT-164	62%	0%	39%

1.7 INDUÇÃO DE RESPOSTAS IMUNES ESPECÍFICAS EM ROEDORES

Este exemplo demonstra que a vacinação com HiNT-164 mortos leva à indução de células T específicas HiNT, que são importantes na proteção do pulmão contra as infecções bacterianas.

Grupos de 5 ratos foram imunizados por instilação no lúmen intestinal (expostos por meio de laparotomia) no dia 0, de 0,5 ml de:

- 10 - PBS
- Espécimes HiNT-164 na dose de 5×10^8 em 500 µl PBS
- Espécimes HiNT-164 na dose de 5×10^9 em 500 µl PBS

Os animais foram sacrificados no 14º dia e linfonodos mesentéricos foram coletados para a preparação da suspensão de linfócitos e da cultura *in vitro* (em triplicata) com o antígeno HiNT-164 em 0,1, 1 e 10 µg/ml por 5 dias. Durante as últimas 6 horas de cultura os poços foram pulsados com ³H-timidina para detectar os linfócitos proliferando em resposta à estimulação do antígeno, e as culturas foram colhidas em esteiras filtrantes. As esteiras foram colocadas em sacos com cintilante e radioatividade (contagens por minuto) para cada poço de cultura, medidos em um β-contador. A figura 4 mostra a resposta média proliferativa de linfócitos em cada grupo de ratos. Isso demonstra que linfócitos específicos de HiNT-164 podem ser detectados nos linfonodos mesentéricos após a imunização com HiNT-164.

1.8 AUSÊNCIA DE TOXICIDADE DE ISOLADOS MORTOS EM ROEDORES

Estes estudos fornecem dados de toxicidade para HI-164OV, que sugerem que a vacina será segura para o homem.

Grupos de 12 ratos Sprague-Dawley foram tratados com PBS (placebo), uma dose terapêutica de ratos de 2,25 mg (correspondente a 5×10^9 células mortas), ou uma dose própria para humanos de 45 mg (correspondente a 1×10^{11} células mortas) da HI-164 substância ativa suspensa em PBS (lote de fabricação nº. VRI0401). A dosagem foi nos dias 0 e 14 e os ratos foram eutanasiados (overdose por barbitúricos) no 21º dia para exames *post-mortem* e coleta da amostra. Os parâmetros avaliados foram os seguintes:

- A avaliação clínica diária;
- O peso corporal por semana;
- O exame *post-mortem* (realizado pelo veterinário);
- Bioquímica do sangue;
- Hematologia do sangue;

- Histopatologia no coração, pulmão, fígado, baço, rins, estômago, pâncreas, duodeno, jejuno, íleo, cólon, linfonodos mesentéricos;
- A Bioquímica, Hematologia e a Histopatologia foram realizadas por Idexx Laboratories, Austrália.

5 Não foram encontradas diferenças entre os grupos de tratamento ativo e o grupo placebo para qualquer um destes parâmetros.

1.9 CAPACIDADE DE ESTIMULAR CÉLULAS T HiNT-ESPECÍFICAS NO SANGUE

HUMANO

10 Este estudo sugere que as células T de *Haemophilus influenzae* específicas no sangue humano reconhecem o HiNT-164 e podem secretar citocinas, como a γ -IFN como resposta. A γ -IFN também está envolvida no mecanismo de proteção através do qual a γ -IFN ativa as células fagocíticas (macrófagos e polimorfonucleares) para

15 ativamente fagocitar e matar bactérias.

Um estudo inicial analisou quatro voluntários. No 1º dia o sangue foi coletado em tubos com heparina de lítio por venipunctura. Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram separadas por centrifugação em um gradiente de densidade Ficoll-Paque. As CMSP

20 foram cultivadas em meio livre de soro em placa com 96 poços com fundo chato (placa *multiwell*). As culturas foram desestimuladas (apenas do meio de cultura) ou estimuladas com 2×10^6 e 2×10^8 /ml de HI-164 mortos ou $10 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$ e $0,1 \mu\text{g/ml}$ de antígeno sonificado HiNT-164 por 3 dias em uma incubadora a 37°C e 5% de CO_2 .

25 No 3º dia sobrenadantes de cultura foram coletadas de cada poço em tubos eppendorf de 1,5 ml, clarificado por centrifugação por 2 minutos a 12.000 rpm (g), aliquoteado e armazenado a -70°C até que os níveis de γ -IFN, IL-10 e IL-12 fossem medidos por ELISA.

Níveis de γ -IFN obtido a partir sobrenadantes de cultura PBL estimulada com HiNT-164 são apresentados na tabela 4, abaixo:

TABELA 4: NÍVEIS DE γ -IFN (PG/ML) NO SOBRENADANTE DA CULTURA PBL ESTIMULADA COM ANTÍGENO HiNT-164 E PHA

Antígeno	MD	PH	PC	RC	Meio	SD
10 μ g/ml (HiNT sonicado)	297	58	150	101	152	103
1 μ g/ml (HiNT sonicado)	54	35	55	35	45	11
0 μ g/ml (HiNT sonicado)	< 15	< 15	< 15	20	20	
PHA (5 μ g/ml)	< 15	30837	9568	8617	16341	12563
2×10^8 (HiNT morto)	1738	1193	4533	514	1994	1764
2×10^6 (HiNT morto)	207	257	491	72	257	174
Apenas células	< 15	< 15	< 15	< 15		
Apenas AIM-V	< 15	< 15	< 15	< 15		

5 Um segundo estudo examinou sete indivíduos recrutados para um estudo de segurança e imunogenicidade de uma vacina HI-164. No dia 0, antes de tomar a medicação do estudo, 10 ml de sangue heparinizado foi recebido da visita 1 dos indivíduos 001 ESY, 002 SP, 003 MBW, 004 JMW, 005 JDL, 006 RGB e 007 MA, do Ensaio Clínico
10 HHI003. Linfócitos do sangue periférico (PBL) foram isolados em um gradiente de densidade Ficoll-Paque, lavados e ressuspensos no meio de cultura AIM-V com adição de anfotericina B (0,25 μ g/ml), 1M de Tampão Hepes e 2-mercaptoetanol (5×10^{-5} M)(SOP: IMM027).

15 As células foram cultivadas por cinco dias, em placas com 24 poços de fundo liso 1×10^6 células/poço em 1mL do meio. As células foram estimulada com duas concentrações de antígeno HiNT-164 (10

$\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$) e PHA (5 $\mu\text{g/mL}$) (SOP: IMM011). PHA é um estimulador de células T pan.

No dia 5, os sobrenadantes de cultura foram coletados de cada poço, clarificados por centrifugação, em seguida, aliquotados e armazenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ até que os níveis de $\gamma\text{-IFN}$ em sobrenadante da cultura fossem mensurados por ELISA. Os resultados são apresentados na tabela 5 abaixo.

TABELA 5: NÍVEIS DE $\gamma\text{-IFN}$ (PG/ML) EM SOBRENADANTE DE CULTURA DO

PBL ESTIMULADO COM ANTIGENO HINT-164 E PHA

Estimulante da Cultura	001 ESY	002 SP	003 MBW	004 JMW	005 JDL	006 RGB	007 MA
10 $\mu\text{g/mL}$ de HiNT-164	368	128	101	169	356	565	334
1 $\mu\text{g/mL}$ de HiNT-164	130	287	24	111	156	86	35
0 $\mu\text{g/mL}$ de HiNT-164	0	0	0	613	0	0	0
5 $\mu\text{g/mL}$ de PHA	0	9	0	38	9457	626	6
AIM-V	0	0	0	0	0	0	0

O HiNT-164 (10 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$), estimulou a produção de $\gamma\text{-IFN}$ em sobrenadante de cultura PBL de todos os indivíduos.

CAPACIDADE DE INDUZIR A RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE LINFÓCITOS T

ESPECÍFICOS EM SERES HUMANOS

Os indivíduos recrutados para um estudo de imunogenicidade e placebo-controlado com segurança foram examinados para a indução de resposta imune específica. A figura 4 mostra a indução de linfócitos T específicos que ocorreu nos grupos de tratamento com vacina e placebo ao longo do estudo. Os linfócitos T específicos no sangue do grupo placebo de pacientes aumentaram

durante o período do estudo (Figuras 5A, 5B). Esta resposta muito provavelmente induzida pela exposição à bactéria *H. influenzae* durante este período. Em pacientes que receberam o tratamento ativo com comprimidos a indução de linfócitos específicos foi reforçada sugerindo uma potencialização da resposta imune induzida naturalmente. Uma resposta aprimorada para PHA *in vitro* foi também observada em linfócitos do sangue do grupo HI-164OV (Figura 5C).

1.10 TRATAMENTO COM HI-164OV REDUZ LISOZIMA SALIVAR

A observação da redução da lisozima salivar no grupo tratado com HI-164OV sugere uma redução na inflamação. (Figura 6).

1.11 CAPACIDADE DE UMA VACINA ORAL DE HINT-164 (HI-164OV) PARA PREVENIR QUE AS BACTÉRIAS ATINJAM AS VIAS AÉREAS INFERIORES

Os mesmos indivíduos como descrito acima foram examinados na relação entre a IgG do soro e o número de visitas nas quais o HiNT foi detectado em gargarejos. A média ($\pm$ SEM) alterada de IgG específica para HiNT no soro entre as visitas 1 e 6 foi mapeada em relação ao número de visitas (classificados como visitas 0-1 ou visitas 2-4) em que o *H. influenzae* foi detectado no gargarejo (fig. 7A). No grupo placebo altos níveis de IgG específica para HiNT no soro foram associadas à detecção de HiNT vivos em duas ou mais visitas. Nenhuma associação semelhante tinha aparecido em indivíduos tratados com os comprimidos ativos HI-164OV. Uma parcela de variação média da IgG no soro desde a base é mostrada na figura 7B para todas as visitas 2-7. Novamente, isto demonstra um aumento das IgG específicas de HiNT no soro no grupo de tratamento com placebo e uma redução na IgG específica para HiNT no soro no grupo de tratamento com HI-164OV. Estes dados foram interpretados como tratamento ativo na prevenção de bactérias nas vias aéreas superiores a partir da entrada pelas vias aéreas inferiores e induzindo as IgG específicas de *H. influenzae* no

soro. A média de variação da base (visita 1) de IgG específica para HiNT no soro para indivíduos com 0-1 ou 2-6 visitas em que o *H. influenzae* foi detectado no gargarejo é mostrada na figura 7B.

1.12 CAPACIDADE DA VACINA ORAL DE HiNT MORTOS (HI-164OV) PARA

5 FORNECER PROTEÇÃO CONTRA A GRAVIDADE DAS EXACERBAÇÕES EM **PACIENTES COM DOENÇA DAS VIAS AÉREAS RESPIRATÓRIAS LEVE-A-** **MODERADA OU MODERADA-A-SEVERA**

Em um estudo clínico paralelo duplo-cego, placebo-controlado, para examinar a eficácia da vacina HI-164OV, 164
10 pacientes com doença das vias aéreas de leve a moderada ou moderada a severa foram tratados com 18 comprimidos contendo 45 mg (equivalente a 10^{11} bactérias mortas). Dois comprimidos por dia foram
administrados nos dias 1, 2, 3, 29, 30, 31, 57, 58, 59. Estado geral de
saúde, eventos adversos, exacerbações agudas de bronquite crônica e
15 severidade destas exacerbações foi monitorado. Verificou-se que o grupo de tratamento ativo teve uma redução considerável das internações hospitalares (em grande parte devido a exacerbações da bronquite) em
comparação com o grupo placebo-controlado (7 pacientes com 10 hospitalizações no grupo placebo e 1 paciente com uma internação no
20 grupo HI-164OV). Estes dados são indicativos da capacidade protetora da substância ativa desta vacina quando usada como uma vacina oral.

EXEMPLO 2

BENEFÍCIOS CLÍNICOS DO HI-164OV

Um estudo placebo-controlado, duplo-cego, foi realizado no
25 qual 64 indivíduos tendo como base o fato de terem fumado pelo menos 10 cigarros por dia durante os últimos dois anos foram recrutados e alocados em grupos para a terapia oral com HiNT ou tratamento com placebo em um estudo duplo-cego. Os indivíduos foram randomizados em grupos placebo e ativo, e receberam três cursos da medicação em

estudo em intervalos mensais. Cada curso consistiu na administração de dois comprimidos por dia durante três dias. Cada comprimido ativo continha 45 mg cada de HiNT mortos por formalina (equivalente a 10^{11} bactérias mortas por comprimido ativo). Sangue, saliva, gargarejos, 5 *swabs* nasais e da garganta (para avaliação microbiológica) foram coletados em sete visitas quinzenais.

1.13 DETECÇÃO DE HiNT E MEDIÇÃO DE IgG ESPECÍFICA PARA HiNT

Surpreendentemente, as medições nos grupos tratados com placebo e naqueles tratados com a vacina durante o período de inverno 10 detectaram HiNT em ambos os grupos, indicando exposição aleatória à bactéria. A figura 8 mostra o nível médio de HiNT no gargarejo do grupo placebo a cada visita.

A-IgG específica para HiNT foi medida em soro e saliva pelo ensaio ELISA. Resumidamente, as placas de 96 poços (*multiwell*) em 15 placas Nunc Maxisorp foram revestidas com preparação de antígeno *H. influenzae* 164 sonificado. Após incubação durante a noite a 2-8°C as placas foram lavadas e as amostras de soro ou saliva em várias diluições foram adicionadas. Após a incubação a temperatura ambiente por 60 minutos, as placas foram lavadas e anticorpos contra IgG 20 humana conjugados com peroxidase de rábano (catálogo Chemicon número API 12P) foram adicionados. Após a incubação por mais 60 minutos em temperatura ambiente as placas foram lavadas e substrato TMB (Biomediq número de catálogo 50-76,00) foi adicionado antes de uma incubação suplementar de 10 minutos em temperatura ambiente, 25 sendo a reação interrompida pela adição de 1M de ácido fosfórico. A absorbância foi lida em um leitor de microplacas BioRad no modo duplo comprimento de onda com um filtro primário de 450 nm e filtro de referência de 655 nm. Uma curva padrão foi usada para determinar as unidades de ELISA em cada amostra.

Os níveis de IgG específica HiNT no soro e na saliva no grupo do placebo foram mais elevados e variados que os níveis no grupo tratado com a vacina (ver figura 9 e figura 10). A Depositante acredita que pelo fato do HiNT alcançar as vias aéreas inferiores pelo HiNT no grupo placebo resulta em produção sistêmica de IgG e esta foi essencialmente impedida de atingir as vias aéreas inferiores no grupo tratado com a vacina. Para testar isto, foram elaborados gráficos de relação entre o número de visitas nas quais o HiNT foi detectado no gargarejo e a variação média da IgG entre as visitas 1 e 6 (figura 7). Os indivíduos do tratamento com placebo e ativos foram agrupados tendo em vista se eles tinham 0-1 visitas ou 2-6 visitas, onde o HiNT fora encontrado no gargarejo. No grupo placebo, aumentos positivos de IgG no soro foram associados com aumento do número de detecções de HiNT. Este não foi encontrado no grupo de tratamento ativo. A diferença entre a variação de IgG no placebo e no ativo foi estatisticamente significativa ($p = 0,0186$), indicando que a IgG no soro no grupo placebo foi de fato gerada pelo HiNT como um resultado do alcance das bactérias nas vias aéreas inferiores. Além disso, quanto mais HiNT presente nas lavagens de placebo, maior o nível de anticorpos IgG. Isto também se acredita poder aplicar no aparecimento de IgG específica de HiNT salivar no grupo placebo.

1.14 DISCUSSÃO

Anticorpos de IgG séricos como um marcador para a eficácia da vacina foram medidos. Uma aparente falta de uma resposta de IgG no grupo da vacina foi encontrado, enquanto o grupo de pacientes tratado com placebo apresentou aumento de IgG sérica. Sem estar limitado pela teoria, acreditam os recorrentes que o aumento de IgG observado no grupo placebo está refletindo uma resposta imunológica às bactérias que infectam as vias aéreas inferiores, onde a

captação de bactérias por células que apresentam antígenos e o transporte para os nódulos linfáticos induz uma resposta IgG antibacteriana. Em contraste, a falta de tal resposta no grupo da vacina indica que as bactérias estão sendo essencialmente impedidas (por uma
5 resposta imune da mucosa específica à vacina) de atingir as vias aéreas inferiores. Uma comparação entre a resposta de IgG em indivíduos com HiNT detectados nas vias respiratórias superiores com baixa frequência (detectado em 0-1 visitas) ou com alta frequência (detectado em 02-06
10 visitas) também mostrou o aumento de IgG no grupo placebo, mas não no grupo ativo do tratamento (vacina). Isto sugere que a medição da IgG sérica após a vacinação oral com HiNT reflete a exposição à infecção e o grau em que esta é prevenida pela imunização da mucosa. A resposta de IgG da saliva refletiu o que foi observado no soro.

Em geral, este estudo demonstra a detecção de HiNT no
15 trato respiratório superior de indivíduos de ambos os grupos, tratamento e placebo, e que o tratamento com a terapia da vacina oral de HiNT mortos conduziu a uma redução da IgG específica de HiNT no soro e na saliva no grupo de tratamento, indicando que a vacina foi bem-sucedida para limitar ou impedir o acesso de HiNT às vias aéreas
20 inferiores (ou seja, menos alérgeno para iniciar a asma ou agravar a DPOC).

Portanto, apenas no grupo do placebo o HiNT teve acesso às
vias aéreas inferiores, como evidenciado pela estimulação de anticorpos IgG, e a "imunização" oral com a vacina de HiNT reduziu o alérgeno
25 HiNT nas vias aéreas.

EXEMPLO 3:**VACINA DE HiNT-164 MORTOS (Hi-164OV) ADMINISTRADA POR VIA ORAL EM****INDIVÍDUOS COM DOENÇA DAS VIAS AÉREAS LEVE, MODERADA OU GRAVE****REDUZIU A UTILIZAÇÃO DE TERAPIA ANTI-ASMA**

5 Cento e quarenta indivíduos humanos com doença das vias respiratórias de leve-a-moderada ou moderada-a-severa foram recrutados em um estudo duplo-cego, placebo controlado para avaliar o efeito de uma vacina de *Haemophilus influenzae* não-tipáveis (HiNT) sobre o número e a gravidade da reversível obstrução das vias aéreas com chiado e o uso de medicação concomitante, bem como a presença
10 do HiNT e outras bactérias nas vias aéreas.

Uma redução no uso de medicação tipo anti-asma (broncodilatadores, esteróides, etc) e infecção por HiNT reduzida foi encontrada no grupo de tratamento comparado ao grupo de controle.
15 Em particular, uma redução específica de HiNT nas vias aéreas de indivíduos com altos níveis de anticorpos IgE (soro e secreções) para HiNT, e uma redução dos sintomas da asma com uma consequente redução da necessidade de medicação para a asma foi obtida.

1.15 INDIVÍDUOS E ENSAIOS CLÍNICOS

20 Este estudo foi um ensaio multicêntrico, duplo-cego, placebo-controlado, realizado em quatro lugares, sob a supervisão de uma Organização de Pesquisa Clínica. Estes locais foram: Hollywood Private Hospital, Perth, WA (Dr. M.K. Tandon); Sir Charles Gairdner Hospital, Perth, WA (Dr M. Phillips); Royal Perth Hospital, Perth, WA
25 (Assoc. Prof. G. Waterer) e University of Newcastle, Newcastle, NSW (Prof. R. Clancy). Protocolos idênticos foram aceitados pelos comitês de ética de cada instituição, e os estudos em conformidade com as orientações desses comitês. O principal critério de admissão foi uma história de dois ou mais episódios por ano, durante dois anos

consecutivos (um 'episódio' foi definido como 'um aumento de tosse e expectoração purulenta em relação aos níveis experimentados'). Os indivíduos foram estratificados em dois grupos: i) pacientes com $FEV_1 \leq$ que 50% do valor normal previsto (38 indivíduos), e ii) pacientes com $FEV_1 >$ que 50% do valor normal previsto (102 indivíduos). Este segundo grupo incluiu pacientes com DPOC, pacientes com diagnóstico primário de bronquiectasia e pacientes com níveis 'normais' de FEV_1 . Os pacientes dos dois grupos de estudo com o $FEV < 80\%$ e sem um diagnóstico primário de bronquiectasia, foram definidos como portadores de DPOC e são o objeto da presente análise. A análise examina o tratamento com HI-164OV em todos os pacientes com DPOC e, em seguida, especificamente o tratamento no grupo de pacientes com DPOC moderada a grave.

Todos os indivíduos foram acompanhados por 8-9 meses, durante o inverno e o início da primavera no sul. O recrutamento começou em 7 de março de 2006 e o último paciente finalizou em 31 de outubro de 2006. Comprimidos HI-164OV continham 45mg (equivalente a 10^{11} UFC de bactérias) de formolína-inativado HI-164, provido como comprimidos com revestimento entérico; comprimidos de placebo contendo somente excipientes foram fornecidos na forma de comprimidos com revestimento entérico para administração oral. Os pacientes tomaram três cursos de comprimidos. Cada curso constou de dois comprimidos por dia durante 3 dias consecutivos (antes do desjejum), com cursos repetidos no dia 28 e dia 56. Os indivíduos tiveram entrevistas presenciais nas semanas 0, 4, 8, 12, 18, 24, 30, 36. Nas semanas 4 e 8 foi dado o curso seguinte de comprimidos. Em todas as visitas episódios agudos e suas características foram documentados com o auxílio de um questionário estruturado; eventos adversos foram registrados; escarro e sangue foram coletados para monitorar a

colonização bacteriana e os parâmetros de segurança, respectivamente; e medicações concomitantes avaliadas.

As principais variáveis avaliadas para esta análise foram: (i) o número de exacerbações (definidas como 'um aumento do volume e purulência do escarro'); (ii) a proporção de indivíduos que tiveram uma ou mais exacerbações; (iii) a duração média de exacerbações; (iv) o número de cursos de antibióticos prescritos para as exacerbações. As variáveis secundárias avaliadas foram os efeitos adversos (incluindo hospitalização), e a bacteriologia do escarro.

A análise estatística sobre a intenção de tratar a população usou "P valores" considerados duplicados. As taxas de episódios agudos (ou 'episódios agudos definidos por tratamento') foram calculadas como número de eventos dividido pela exposição (calculado como número de dias desde a randomização até a última visita) multiplicado por 100. A regressão de Poisson por medidas repetidas foi utilizada para examinar as diferenças de tratamento nas taxas, onde o logaritmo da exposição (em dias) foi considerado *offset*. Taxas de risco e os intervalos de confiança associados de 95% (IC) foram obtidos a partir dessas regressões. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar as proporções de indivíduos com um ou mais episódios. As durações dos episódios (data de início até data de cessão) foram estimadas através do procedimento de Kaplan-Meier e diferenças de tratamento foram analisadas pelo teste de *log-rank*. Para o cálculo dos dias de tratamento, o número de dias foi calculado como a soma da duração de cada medicação pertinente, independentemente de sobreposição em termos de datas de início e fim. O número de dias em que cada sujeito recebeu tratamento foi comparado entre os tratamentos através do teste *rank-sum de Wilcoxon* (aproximação 't' do aluno). O número de indivíduos experimentando 0, 1, 2, etc. cursos de antibióticos foi apresentado e os

grupos de tratamento foram comparados pelo teste de Cochran-Mantel-Haenszel. As taxas de hospitalização foram comparadas entre os tratamentos por meio da regressão de Poisson, onde o número log-transformado de indivíduos foi utilizado como um *offset*.

5 O objetivo foi recrutar 124 em cada um dos grupos moderado-a-grave e leve-a-moderado, permitindo uma queda de 20% da taxa. Com 50 em cada grupo que completando o estudo este iria (no nível de significância de 5% e com poder de 80%) detectar uma redução relativa do risco no número de episódios de 37% (assumindo uma taxa de infecção no grupo do placebo de 2); uma redução na proporção de
10 pacientes em 28% (assumindo que 80% do grupo placebo têm, pelo menos, uma infecção), uma redução relativa no risco da prescrição de antibióticos de 33% (assumindo uma taxa de prescrição de 2,4 no grupo placebo); uma diferença nos dias de duração média de 1,2 assumindo
15 um SD de 2 dias no grupo placebo. A exigência de dois ou mais episódios por ano durante dois anos provou ser um grande impedimento para contratação, com um total de 73 que estão sendo registrados com DPOC (38 com doença moderada a grave e 35 com doença leve a moderada). Um adicional de 67 indivíduos com
20 bronquiectasia ou com valores 'normais' de FEV₁, enquanto percentagem do normal previsto (ou seja, $\geq 80\%$) foram estudados, mas não estão incluídos nesta análise daqueles com DPOC. Análise em grupos foi uma decisão pré-estudo.

1.15.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

25 As características dos pacientes são apresentadas adiante na tabela 6 abaixo.

TABELA 6: CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

Características	Todos os indivíduos com DPOC		Indivíduos com DPOC moderada-severa	
	Placebo (37)	HI-164OV (36)	Placebo (20)	HI-164OV (18)
Idade (anos) (mediano, intervalo)	68,8 (41-88)	62,8 (47-87)	67,8 (55-88)	69,5 (47-87)
Sexo (macho/fêmea)	25:12	25:11	14:6	15:3
Nunca fumou	30	31	15	15
Fumante frequente (mediano, intervalo)	6	7	4	2
FEV ₁ (l/seg) (mediano, intervalo)	1,17 (0,4-3,0)	1,32 (0,5-2,6)	0,89 (0,4-2,0)	1,0 (0,5-1,5)

No início do estudo em pacientes com DPOC moderada a grave, no grupo ativo, e 13 no grupo do placebo tiveram uma história de doença isquêmica do coração, 6 no grupo ativo e 2 no grupo do placebo tiveram uma história de "asma", 2 no grupo de ativos e 4 no grupo do placebo tiveram uma bronquiectasia associada. Neste grupo a terapia pertinente na linha de base foi: 12 pacientes em cada grupo tomaram salbutamol; 14 no grupo ativo e 13 no grupo placebo tomaram tiotrópio; e 10 no grupo ativo e 9 no grupo placebo receberam salmeterol/fluticasona (Seretaide®). A prednisona foi tomada por 6 indivíduos no grupo ativo e 7 no grupo placebo. A terapia de oxigênio foi utilizada por 5 no grupo ativo e 2 no grupo placebo. Cerca de metade de ambos os grupos placebo e ativo tomaram pré-vacinação contra a gripe sazonal, enquanto dois terços tinham tomado a vacinação contra o pneumococo.

1.16 RESULTADOS

Os resultados da administração de HI-164OV *versus* placebo estão estabelecidos na Tabela 7 abaixo:

TABELA 7: RESUMO DOS RESULTADOS

	População total de DPOC			DPOC Moderado-Severo		
	HI-164OV (36)	Placebo (37)	Proteção (%) (valor P)	HI-164OV (18)	Placebo (20)	Proteção (%) (valor P)
Nº de episódios agudos (número de indivíduos)						
Total	36 (24)	50 (25)	24 (0,19)	22 (13)	29 (13)	17 (0,52)
Tratado com antibiótico	28 (20)	38 (23)	24 (0,26)	15 (11)	23 (13)	27 (0,33)
Tratado com corticosteróide	9 (10)	21 (15)	50 (0,06)	5 (4)	15 (10)	62 (0,05)

5

1.16.1 NÚMERO DE EPISÓDIOS AGUDOS

Usando a definição de protocolo de um episódio agudo como "um aumento do volume e purulência do escarro", para o grupo DPOC total foram 36 episódios no grupo HI-164OV e 50 episódios no grupo placebo, que, quando analisados por períodos mensais, teve uma razão de risco de 0,76 (95% CI 0,50, 1,15; P=0,19). Quando analisado em três períodos mensais, a uma taxa de eventos/100 dias, houve um benefício maior no grupo ativo no segundo período de 3 meses (Placebo: eventos/100 dias - 0,82 (3 primeiros meses); 0,74 (3 segundos meses); Ativos: 0,72 e 0,48 valor P. Efeito do período de 0,68, e o efeito do tratamento 0,19). Usando a definição do protocolo do episódio agudo ("aumento do volume e purulência do escarro") no grupo de DPOC

10

15

moderada a grave, houve 22 episódios no grupo ativo comparado com 29 episódios no grupo placebo, com uma taxa de risco de 0,84 (95 % CI: 0,48, 1,49), que não foi significativa. Entretanto, em análise por três períodos mensais, a taxa do evento/100 dias era a mesma para os grupos ativo e placebo em 0,82 para os 3 primeiros meses, mas reduziu no grupo ativo comparado ao placebo nos segundos 3 meses (0,6 contra 0,85), representando uma redução de 29% na incidência. Naqueles com doença moderada a grave, houve quase o dobro de pacientes (11 indivíduos) no grupo placebo com 2-4 episódios quando comparados ao grupo de tratamento ativo (6 indivíduos), condizente com um efeito da terapia na redução da reincidência. Não havia nenhuma ou pouca diferença na proteção do grupo total de DPOC, mas um maior nível de proteção (27%) foi observado naqueles com doença mais grave.

1.16.2 PROPORÇÃO DE PACIENTES COM EPISÓDIOS AGUDOS

A proporção de pacientes com episódios agudos foi reduzida em uma pequena quantidade com a terapia, exceto quando apenas os episódios mais graves foram identificados com a definição de episódios 'tratados com corticosteroide'.

1.16.3 DURAÇÃO DOS EPISÓDIOS

A duração média dos episódios foi menor no grupo ativo em relação ao placebo ('todas as DPOC': 14,7 comparado a 17,3 dias; DPOC moderada a grave 14,3 em comparação com 22,7 dias), mas esta diferença alcançou significância estatística apenas no grupo moderado-severo ($P=0,01$).

1.16.4 USO DE MEDICAMENTOS

Uma significativa redução tanto no número de cursos de antibióticos prescritos quanto no número de dias de tratamento com antibiótico (para exacerbações) seguiu-se ao tratamento ativo, em ambos os grupos, de total de pacientes com DPOC e daqueles com

DPOC moderada a grave. A proteção foi estatisticamente significativa em ambos os grupos 'todas as DPOC' e pacientes com DPOC de moderada a grave, para as duas formas de análise. Menos pacientes receberam três ou mais cursos de antibióticos no grupo ativo do que no grupo placebo (para 'todas as DPOC', 5 versus 14 pacientes, para DPOC moderada a grave, 2 versus 11 pacientes), proteção de apoio contra a episódios recorrentes.

Os indivíduos que tinham DPOC moderada a grave e foram tratados com a vacina oral, descobriu-se que tiveram uma redução de 50% no uso de terapias broncodilatadoras no grupo ativo. Contagens de eosinófilos após a administração do curso de terapia oral tripla de HiNT revelaram ter reduzido de forma significativa apenas no grupo ativo. Em conclusão, a terapia oral HiNT reduz o uso de terapias broncodilatadoras, em episódios agudos e também reduz a contagem de eosinófilos, que são reações alérgicas conectadas específicas a HiNT.

1.16.5 ADMISSÃO EM UM HOSPITAL

A taxa de admissão hospitalar por exacerbação de DPOC foi elevado (ver Tabela 8 abaixo), com 10 internações de 7 pacientes do grupo placebo (20 indivíduos) na DPOC moderada a grave. Para aqueles com DPOC menos grave (17 indivíduos), apenas dois foram admitidos no hospital por uma exacerbação da DPOC durante o período do estudo. A proteção contra a admissão ao hospital devido a uma exacerbação da DPOC em 'todas as DPOC' foi de 61% e significância limítrofe ($P=0,07$), enquanto naqueles com DPOC moderada a grave, um maior nível de proteção foi encontrado (90%), que foi significativa ($P=0,01$). Neste grupo mais grave, uma diferença significativa em 'hospitalização por todas as causas' foi detectada ($P=0,04$), mas os números eram muito pequenos para identificar um efeito independente sobre a internação por eventos não-respiratórios.

1.16.6 BACTERIOLOGIA DO ESCARRO

Análise de amostras de expectoração de 'evento agudo' deu informações de pouco valor, devido ao tratamento com antibióticos, os atrasos de transporte e notificações tardias. As amostras coletadas em visitas regulares após o início do estudo seriam consideradas válidas se as culturas fossem feitas em menos de 4 horas desde a coleta e amostras de saliva contaminadas (detectadas pela presença de células epiteliais) fossem excluídas. Para essas amostras de 'rotina' no grupo do placebo para 'todas as DPOC' (37 indivíduos), metade dos pacientes (19 indivíduos) apresentaram culturas positivas, com um total de 88 culturas positivas. Os valores equivalentes para o grupo ativo (36 indivíduos) foram 13 indivíduos com 45 culturas positivas, ou seja, após a terapia com HI-164OV havia menos indivíduos (31%), com culturas de escarro positivas para patógenos respiratórios, com o número total de culturas positivas de escarro sendo aproximadamente metade do que no grupo placebo. No grupo placebo, o HiNT foi isolado em 14 indivíduos com uma média de 2,8 ocorrências. Para outros patógenos: *M. catarrhalis* foi isolada em 5 indivíduos (média de 2,4 incidências); *S. pneumoniae* em 6 indivíduos (média de 1,7 vezes); *P. aeruginosa*, em 11 indivíduos (média de 2,3 vezes). No grupo ativo o HiNT foi isolado em 8 pacientes (média de 2,9 ocasiões); *M. catarrhalis* em 7 indivíduos (média de 1,0 vez); *S. pneumoniae* em 4 pacientes (média de 1,5 ocorrências); *P. aeruginosa* em 3 indivíduos (média de 3 incidências). Outras análises mostraram que no grupo placebo os 21 indivíduos com culturas de escarro positivas tiveram 34 episódios agudos (1,62 por paciente), enquanto os 16 sem amostras positivas tiveram 16 episódios agudos (1,0 por paciente). Para o grupo de ativos, 14 com cultura positiva tiveram 20 episódios agudos (1,42 por paciente) e 22 com uma cultura de escarro positiva tiveram 16 episódios agudos

(0,73 por paciente). Para os isolados de HiNT, um padrão semelhante foi mostrado (placebo: cultura positiva em 14 indivíduos com 20 episódios agudos (1,42 por indivíduo) e não houve crescimento em 23 que tiveram 30 episódios agudos (1,31 por indivíduo); ativo: 8 indivíduos com cultura positiva tiveram 10 episódios (1,25 por paciente), enquanto que 28, não havendo crescimento, tiveram 26 episódios (0,93 por paciente). Conclui-se (i) que a cultura de escarro positiva prediz um risco maior de ter um episódio clínico agudo (independentemente de o paciente estar no grupo placebo ou ativo), (ii) que no grupo ativo, há proteção aparente em ambos os grupos tanto de cultura positiva como de cultura negativa (cerca de 12% no grupo de cultura positiva - calculada como episódio de infecção/valor por pessoa de 1,42 no ativo *versus* 1,62 no grupo placebo; e aproximadamente 27% no grupo 'cultura não positiva' - calculada como episódio de infecção/valor por pessoa de 0,73 no ativo *versus* 1,0 no grupo placebo), (iii) a terapia oral com HI-164OV é seguida por diminuição de culturas positivas. Estas culturas 'sem crescimento' estão associadas a menos exacerbações (acima). Uma análise similar de escarro HiNT-positivo, apresentou resultados quase idênticos com relação ao efeito protetor do tratamento oral por HI-164OV (dados não mostrados).

TABELA 8: HOSPITALIZAÇÃO

	HI-164OV		Placebo		Valor P	
	Número de eventos	Número de pacientes	Número de eventos	Número de pacientes	1	2
(a) Todos DPOC Todos os eventos de hospitalização	8	8	16	12	0,12	0,50
Hospitalização por	5	5	13	9	0,07	0,48

exacerbação de DPOC						
(a) DPOC Severo-Moderado Todos os eventos de hospitalização	3	3	12	8	0,04	0,53
Hospitalização por exacerbação de DPOC	1	1	10	7	0,01	0,87

P (1) compara as taxas de hospitalização em todos os indivíduos.

P (2) compara as taxas de hospitalização em pacientes hospitalizados.

TABELA 9: PROTEÇÃO EM ATIVOS VS. PLACEBO EM INDIVÍDUOS NEGATIVOS

PARA ESCARRO

		N. de indivíduos com amostras de escarro (nº. de episódios agudos)	N. de indivíduos com amostras de escarro (nº. de episódios agudos)	Ativo	Placebo	
Crescimento de qualquer patógeno em amostras de escarros de rotina	+	21 (34)	14 (20)	1,42	1,62	12
	-	16 (16)	22 (16)	0,73	1,0	27
Crescimento de <i>H. influenzae</i> em amostras de escarros de rotina	+	14 (20)	8 (10)	1,25	1,42	12
	-	23 (30)	28 (26)	0,93	1,31	29

5 **TABELA 10: PROTEÇÃO EM ATIVOS VERSUS PLACEBO EM INDIVÍDUOS ESCARRO**

NEGATIVOS

Organismos isolados do escarro	Porcentagem dos Indivíduos (%)		Porcentagem da Proteção Clínica (%)	
	HI-	Placebo	Cultura +	Cultura -

	164OV		ve	ve
Crescimento de qualquer patógeno em amostras de escarros de rotina	36	51	12	27
Crescimento de <i>H. influenzae</i> em amostras de escarros de rotina	22	38	12	29

As tabelas 9 e 10 mostram o percentual de bactérias cultivadas a partir de várias amostras de escarro dos indivíduos/pacientes. O Grupo ativo foi tratado com o produto HI164OV.

5

1.17 DISCUSSÃO

Exacerbações agudas como eventos-chave na história natural da DPOC são reconhecidos como alvos específicos para a terapia de intervenção nas normas em vigor. Para determinar o impacto da imunoterapia com uma vacina oral (HI-164OV) preparada a partir de um novo isolado de HiNT (HiNT-164) sobre a incidência e gravidade das exacerbações, pacientes com DPOC que tiveram uma história de exacerbações recorrentes foram estudados. Tais questões, no entanto, representam apenas 20-25% de todas as pessoas com DPOC, o que levou, no presente estudo, a um registro inferior ao planejado. Esta dificuldade foi ainda mais complicada pelo uso de uma definição clássica descritiva dos episódios agudos como 'um aumento do volume e purulência do escarro'. Embora esta definição reflita a origem infecciosa dos episódios agudos, pode ser imprecisa, dado o nível de fundo variável de inflamação intrabronquial na DPOC, distinção indefinida de episódios discretos. Apesar das limitações impostas por definições, duas conclusões podem ser tiradas deste estudo. Primeiro, os indivíduos com DPOC e exacerbações recorrentes beneficiam-se da imunoterapia oral

10

15

20

com HI-164OV, nomeadamente com uma redução na sua gravidade. Segundo, aqueles com DPOC moderada a grave, beneficiam-se em maior grau do que aqueles com doença mais branda.

Embora tenha havido uma tendência para uma redução na
5 incidência de exacerbações em 'todas as DPOC' usando a definição
descritiva do aumento da purulência do escarro, várias observações
apoiam esta medida resultante como tendo relevância clínica. A análise
no grupo placebo apresentou uma taxa alta de eventos no início do
estudo. Um nível de proteção mais elevado em 35% no segundo
10 trimestre deste estudo é, portanto, consistente com um atraso no
aparecimento do reforço imunológico com resultados na segunda
metade do estudo, uma reflexão mais precisa da proteção. Além disso, o
grupo placebo incluiu mais do que o dobro do número de indivíduos
com 2-4 episódios, sugerindo que o tratamento com HI-164OV é
15 particularmente eficaz na prevenção de episódios recorrentes. Dados
persuasivos provêm da análise de episódios definidos em termos de
tratamento, especialmente com corticosteróides, quando havia um nível
de proteção superior a 50%. Estes conjuntos de dados mostrando mais
clara a proteção de corte para episódios mais graves, indicam que o
20 valor principal da imunoterapia refere-se à redução nos parâmetros de
gravidade da exacerbação, pelo menos naqueles com DPOC e episódios
frequentes.

Houve uma diferença nos parâmetros de gravidade em
seguida ao tratamento ativo com uma consistência de benefício em
25 todos os parâmetros de gravidade, com o tratamento por HI-164OV
seguido de episódios mais curtos, menos tratamento com antibióticos e
corticosteróides orais, e menos chance de internação. O uso de
antibióticos em termos de cursos prescritos, ou dias necessários, foi
muito mais um índice melhorado do benefício do que a simples análise

do número de episódios tratados com antibióticos, sugerindo que a maioria dos episódios de expectoração purulenta serão tratadas com um antibiótico, independentemente da gravidade, mas apenas aqueles considerada clinicamente graves atrairão cursos de repetição. A redução significativa nas hospitalizações em pacientes com doença moderada a severa é um resultado impressionante, dado o pequeno tamanho da amostra. A Depositante é desconhecedora de qualquer outra terapia de intervenção que tenha uma capacidade similar para reduzir a taxa de hospitalização. Os números são pequenos, e este resultado só foi significativo no grupo com DPOC moderada a severa, mas isto é consistente com a melhoria em todos os outros parâmetros de gravidade com maior impacto nos pacientes com doença moderada a grave. Isso pode refletir um maior benefício clínico para qualquer dada redução na inflamação das vias aéreas, em pacientes com as mais comprometidas vias respiratórias.

O padrão para a comparação do tratamento que visa reduzir o impacto das exacerbações agudas da DPOC é o fluticasona/salmeterol (500/50 mcg). Ensaio desta associação inclui um grande número de indivíduos com taxas de retenção de fluxo com resultados primários medidos ou mortalidade por qualquer causa. Os indivíduos incluídos no estudo tinham DPOC moderada a grave, mas não foram escolhidos devido a frequentes episódios agudos, como na presente realização. Um nível de proteção de cerca de 40% contra os episódios agudos definidos pela terapia do corticosteroide foi observado em cada estudo, menos do que no estudo do HI-164OV, mas com níveis de significância refletindo o maior poder possível com grandes números. O benefício foi especialmente notado naqueles com doença mais grave, como deduzido no estudo do HI-164OV. No entanto, o salmeterol fluticasona/protegeu pouco ou nada (0% e 17%) contra as exacerbações

'graves' definidas como necessitando de hospitalização, em contraste com os dados obtidos do HI-164OV. Note-se que neste estudo que a taxa de hospitalização de cerca de 9% ao ano, em comparação com uma taxa mais elevada no presente estudo por 2-3 vezes. Esta taxa mais elevada provavelmente reflete exacerbações frequentes como um marcador de doença mais grave. Quando episódios agudos foram definidos em termos de antibiograma, porém, houve um aumento no número de episódios no grupo ativo. Isto contrastou com uma redução de episódios tratados com antibiótico no estudo do HI-164OV. O aumento dos episódios agudos definidos por antibiótico é coerente com uma propensão à infecção relacionada à inalação de esteróides (candidíase orofaríngea e pneumonia).

Os primeiros estudos longitudinais de pacientes com DPOC não conseguiram esclarecer o papel desempenhado pelas bactérias na patogênese, principalmente porque a taxa de isolamento de bactérias no escarro durante doença estável foi semelhante à observada durante episódios agudos. Recentes estudos prospectivos utilizaram tipagem molecular para demonstrar uma associação entre novas linhagens de patógenos bacterianos com exacerbação da DPOC. Frequências de isolamento de bactérias neste último estudo, em amostras rotineiras de escarro, foram muito similares às encontradas na presente invenção, e o isolamento de um patógeno foi significativamente associado a uma exacerbação atual. A tendência nos dados dos estudos presentes, obtidos em doença estável, é compatível com esses conceitos: cultura de escarro positiva pareceu ser um fator de risco para exacerbações agudas (independentemente de o sujeito estar no placebo ou no membro ativo da ação); e comparando ativo com placebo, uma proteção adicional é observada no grupo ativo, em ambos os patógenos em crescimento ou não. Estes resultados poderiam refletir maior

resistência da mucosa à aquisição de novas cepas bacterianas, e/ou a uma redução do nível de colonização das vias aéreas por bactérias, que resiste a eventos pró-inflamatórios como uma infecção por vírus intercorrente. Em qualquer situação de ativação específica das células patch de Peyer derivadas de T por antígenos HiNT medeia um recrutamento e ativação de células fagocíticas, que servem como um mecanismo efetor não específico.

Oral imunoterapia com vacina de HiNT mortos (vacina HI-164OV) ativa o tecido linfóide associado ao trato gástrico-intestinal (GALT), com os linfócitos T específicos retornando para a mucosa dos brônquios. Estudos recentes têm mostrado que a aspiração de conteúdo brônquico para o intestino é um mecanismo fisiológico de apresentação de antígenos para o GALT, e que a administração oral de HI-164OV serve para otimizar um processo sazonal de ativação de células T. O HI-164OV é um produto diferente dos extratos polibacterianos amplamente utilizados na Europa para 'proteção imune'. Ele contém uma única espécie de bactéria, formulado como uma preparação de células inteiras em uma concentração muito maior do que os utilizados nos produtos polibacterianos, de modo a gerar uma reação imunológica específica de patch de Peyer. Análise de estudos utilizando isolados polibacterianos em pacientes com doença crônica das vias respiratórias não apresentaram redução significativa nas exacerbações, um resultado também encontrado em um estudo comparativo entre um produto polibacteriano e a imunoterapia oral por HiNT.

EXEMPLO 4: O HiNT-164 TRANSMITE UM GRAU MAIOR DE PROTEÇÃO

CRUZADA QUE O HiNT-166 EM EXPERIÊNCIAS DESAFIANTES

O HiNT-164 e o HiNT-166 (HiNT289) testados como vacinas em modelos de ratos de imunização intratraqueal (IT) e desafio à infecção respiratória aguda com um painel de HiNT isolados deu

diferentes níveis de protecção. Os isolados utilizados no desafio à infecção foram HiNT-164, HiNT-165, HiNT-166, HiNT-167, HiNT-168, ATCC 3041, ATCC 43095, ATCC 35092 e ATCC ATCC 51997.

Para determinar a protecção oferecida pelas vacinas grupos de ratos Dark Agouti (5-6 ratos por grupo) com idades entre 80-10 semanas de idade sofreram imunização intra-traqueal (IT), com 50 μ L de PBS ou com 50 μ L de PBS contendo 5×10^8 de HiNT-164 ou HiNT-166 mortos, no dia 0 e no 14º dia. No 21º dia ratos foram infectados com um rol de amostras de desafio à infecção HiNT. Os ratos foram mortos após 4h de infecção e os pulmões lavados com PBS 5x2 ml PBS para produzir 10 ml de fluido de lavagem bronco-alveolar (LBA). Os pulmões foram então homogeneizados em PBS 10 ml para gerar uma suspensão de amostras de vinte microlitros com diluições seriadas de 10 vezes do LBA e LH foram semeadas em ágar chocolate e incubadas durante a noite a 37°C em 5% de CO₂ no ar. As colônias foram contadas e o número de HiNT vivos no LBA e LH calculado para cada rato. Os níveis de bactérias totais no pulmão também foram determinados para cada rato, através da adição do número de bactérias no LBA e LH. O nível médio de bactérias foi calculado para cada grupo de ratos e a porcentagem de depuração bacteriana determinada em comparação com o grupo de controle PBS como segue:

$$\frac{(\text{Média de bactérias no grupo PBS} - \text{Média de bactérias no grupo da vacina}) \times 100}{\text{Média de bactérias no grupo PBS}}$$

A depuração bacteriana percentual em 4 horas é uma medida do grau de protecção conferido pela vacina.

A média percentual de depuração de bactérias fornecida por cada teste de vacina para o painel de nove linhagens de desafio à infecção foi calculada. Para a vacina de HiNT-164 a depuração média bacteriana para o painel foi de 84±4%, e para a vacina HiNT-166 a

depuração média de bactérias para o painel foi de 78+-2%. Isso demonstra que uma vacina preparada a partir de HiNT-164 mortos gera um maior grau de depuração bacteriana contra o painel de cepas infectantes do que uma vacina preparada a partir de HiNT-166 e é, portanto, mais eficaz como uma vacina de células inteiras.

EXEMPLO 5: HI-164 ELICITA UMA RESPOSTA IMUNE NÃO-ESPECÍFICA CONTRA AS ESPÉCIES NÃO-HAEMOPHILUS

Um estudo prospectivo, multicêntrico, duplo-cego, controlado por placebo para avaliar a segurança e eficácia da vacina administrada por via oral de células inteiras mortas de *Haemophilus influenzae* não-tipáveis (HiNT) contendo HiNT-164 formol-mortos (aqui referida como "HI-164OV") na prevenção de episódios de bronquite aguda em pacientes com doença moderada a grave das vias aéreas.

1.18 OBJECTIVOS E MÉTODOS

1.18.1 OBJECTIVOS PRIMÁRIOS (EM GRUPOS ATIVOS VERSUS GRUPOS PLACEBO)

- Comparar o número de episódios de bronquite aguda
- Comparar proporção de doentes com um episódio de bronquite aguda
- Comparar a duração dos episódios de bronquite aguda

1.18.2 METODOLOGIA

Um estudo prospectivo, multicêntrico, duplo-cego, controlado por placebo para avaliar a segurança e eficácia da vacina administrada por via oral de células inteiras mortas de HiNT HI-164OV na prevenção de episódios de bronquite aguda em pacientes com doença das vias respiratórias de moderada a grave ($FEV_1 \leq 50\%$ do valor previsto).

Os pacientes foram aleatoriamente distribuídos em uma proporção de 1:1 para cada medicação do estudo ou placebo. Os pacientes tomaram a medicação em 3 dias consecutivos de cada mês

durante 3 meses consecutivos. Avaliações da microbiologia foram conduzidas em gargarejos da garganta para a detecção quantitativa da Hi, e uma amostra de escarro para detecção de manchas Gram e quantitativa detecção da Hi e detecção semi-quantitativa de espécies de

5 *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae* e *Pseudomonas*.

1.18.3 NÚMERO DE PACIENTES (PLANEJADO E ANALISADO)

O tamanho da amostra da invenção foi calculado com base em um nível de significância de 5% e poder de 80%, uma amostra de 50 participantes por grupo permitiria a detecção de:

10 - Um risco relativo de infecção de aproximadamente 0,63 (ou seja, redução do risco relativo de 37 %), assumindo taxa de infecção no grupo placebo de 2;

- Uma redução absoluta na proporção de doentes com alguma infecção de 28% (assumindo que 80% dos grupos placebo tem alguma infecção);

15 - O risco relativo para prescrição de antibióticos de 0,67 (ou seja, redução do risco relativo de 33%), assumindo uma taxa de prescrição de 2,4 no grupo placebo; - Uma diferença em dias médios de duração das infecções de 1,2 dias (admitindo o desvio padrão de duração de 2 dias).

Supondo que 20% dos participantes não completaram o
20 estudo, 62 precisaram ser recrutados para cada grupo com 124 para ser aleatoriamente distribuídos. O número real escalado ao acaso e analisado = 38. Houve duas desistências em cada grupo de tratamento, com um em cada grupo de descontinuando o estudo devido a um evento adverso. Os pacientes foram recrutados em 4 centros de ação. Note-se
25 que o recrutamento de pacientes não atingiu o número previsto, devido à população disponível limitada com a necessária severidade da doença, que também reunisse o critério de inclusão de 2 episódios de bronquite aguda por ano nos últimos 2 anos nos 4 centros participantes.

1.18.4 PRODUTOS, DOSE & NÚMERO DE LOTE

Comprimidos de HI-164OV com revestimento entérico: Continham 45 mg de formol-inativado HiNT-164 mais excipientes.

A substância ativa liofilizada é referida como HI-164. Os comprimidos de placebo com revestimento entérico continham apenas excipientes. Placebo e HI-164OV foram armazenados a 2-8°C e os comprimidos pesavam cerca de 450 mg.

1.18.5 ADMINISTRAÇÃO & DURAÇÃO DO ESTUDO

Pacientes tomaram a medicação do estudo por via oral com um copo de água, com o estômago vazio, 30 minutos antes do desjejum, em 3 dias consecutivos a cada mês durante 3 meses consecutivos (dias 1-3, 29-31 dias e 57-59 dias). A duração do estudo foi de aproximadamente 8 meses. Pacientes tomaram a medicação do estudo em 3 dias consecutivos a cada mês durante 3 meses consecutivos (dias 1-3, dias 29-31 e dia 57-59). A duração do estudo foi de aproximadamente 8 meses.

1.18.6 CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO

As variáveis primárias de eficácia foram: - Número de episódios de bronquite aguda.

- Proporção de pacientes em tratamento de um episódio de bronquite aguda.
- A duração dos episódios de bronquite aguda.
- O número de cursos de antibióticos para o tratamento de episódios agudos de bronquite - A presença de *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae* e *Pseudomonas spp* na expectoração.
- gravidade dos episódios de bronquite aguda.

1.18.7 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

As análises estatísticas foram realizadas com a intenção de tratar a população de 38 pacientes, isto é, todos os pacientes que foram randomizados para o tratamento, independentemente de eles terem

tomado a droga do estudo. Todos os dados relevantes foram resumidos por grupo de tratamento. A análise consistiu em três seções:

- Recrutamento e estado no final do estudo.

5 - As características iniciais - Avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre os objectivos primários e secundários.

A principal hipótese testada foi a superioridade do HI-164OV sobre o placebo na prevenção de episódios de bronquite aguda. O número de episódios de bronquite aguda foi comparado entre grupos utilizando a regressão GEE de Poisson de medidas repetidas e o teste de
10 Cochran-Mantel Haenszel. A proporção de participantes em cada grupo de tratamento que desenvolveram um ou mais episódios de bronquite aguda dentro do período de desenvolvimento do ensaio foram comparadas através do Teste Exato de Fisher. A duração dos episódios agudos de bronquite foi comparada usando os testes log-rank e
15 Wilcoxon rank-sum.

Os episódios agudos de bronquite foram julgados nos relatórios do investigador e os eventos adversos que foram de natureza infecciosa respiratória; a verificação foi obtida a partir do local de estudo quando necessário. O número de cursos de antibióticos para o
20 tratamento de episódios de bronquite aguda foi comparado usando o teste de Cochran-Mantel Haenszel. A duração total (número de dias) de cursos de antibióticos para o tratamento dos episódios agudos foi comparado usando o teste de Wilcoxon rank sum.

1.18.8 RESUMO DA POPULAÇÃO DE PACIENTES

25 A meta de recrutamento de 124 pacientes randomizados não foi cumprida, o número real de pacientes avaliados foi 42 dos quais 38 foram seleccionados e 34 completaram o estudo. Dos pacientes randomizados, havia dois pacientes em cada grupo que não completaram o estudo, dos quais um paciente em cada grupo o

interrompeu por causa de um evento adverso. A demografia inicial dos pacientes era geralmente similar para os grupos HI-164OV e placebo. A idade média da população era de cerca de 70 anos. . Mais homens que mulheres foram recrutados com 83,3% e 70,0% de homens e 16,7% e 30,0% de mulheres para os grupos ativo e placebo, respectivamente. O FEVi médio em todos os pacientes foi de 0,95 litros/seg e semelhante entre os grupos ativo e placebo; os valores médios foram 1,00 e 0,85 nos grupos ativo e placebo, respectivamente. Uma maior proporção de pacientes em ambos os grupos relatou uma história de tabagismo em comparação com quem nunca fumou (84,2% fumantes *versus* 15,8% que nunca fumaram). Os pacientes haviam fumado por uma média de 51,36 anos acumulados e uma mediana de 45,5 anos acumulados, com mediana de 45,0 e 46,0 anos acumulados para os grupos ativo e placebo, respectivamente. Na triagem, 15,8% de todos os pacientes (com uma distribuição semelhante entre os grupos) ainda fumavam.

A anamnese foi consistente com uma população de pacientes desta idade, a maioria dos quais fumava e tinha reconhecida doença das vias aéreas. Significativamente mais pacientes relataram uma história de doenças cardíacas no grupo placebo, em comparação com o grupo HI-164OV (13 (65%) contra 5 (27,8%), $p=0,028$). Não houve outras diferenças estatisticamente significativas na distribuição de condições entre os grupos segundo as classes de órgãos do sistema. Com relação aos distúrbios respiratórios, a DPOC foi relatada por 61,1% e 45,0% dos grupos ativo e placebo, respectivamente; a asma relatada em 33,3% e 10,0% nos grupos ativo e placebo, respectivamente; bronquiectasia relatada em 11,1% e 20,0% no grupos ativo e placebo, respectivamente; e enfisema relatado por 22,2% e 35,0% dos grupos ativo e placebo, respectivamente. Infecções e

infestações foram relatadas em 8 (44,4%) do grupo HI-164OV e 10 (50%) do grupo placebo.

1.18.9 VARIÁVEIS PRIMÁRIAS DE EFICÁCIA

Número de episódios de bronquite aguda: Foram 22 episódios em 13 dos 18 pacientes no grupo HI-164OV e 29 episódios em 13 dos 20 pacientes no grupo placebo. As análises dos episódios de bronquite aguda com períodos mensais apresentaram uma taxa de risco de 0,83 [IC 95% 0,47, 1,46], indicando um benefício para o tratamento, mas não o alcance da significância estatística ($p=0,520$). Análise utilizando períodos de três meses mostrou que o índice de risco foi de 0,84 [IC 95% 0,48, 1,49], indicando também um benefício de tratamento que não foi estatisticamente significativo ($p=0,397$). Todavia, embora houvesse uma taxa similar de eventos agudos de bronquite nos primeiros três meses do estudo (0,82 eventos/100 dias em cada grupo), nos últimos meses a taxa foi de 0,85 no grupo placebo, mas 0,60 no HI-164OV grupo. Isso sugere o benefício da HI-164OV neste segundo período, após os três ciclos em que a droga tinha sido administrada embora esta não foi significativa (p valores de regressão: período, 0,894, tratamento, 0,397, interação 0,533). A redução de aproximadamente 30% no número de episódios durante o segundo período é clinicamente relevante uma vez que o estudo começou no final do outono e um período de latência de 6-8 semanas antes que o benefício se manifeste a suspeita de estudos anteriores.

Quando analisados de acordo com o período de março a maio em relação ao resto da temporada de inverno, o efeito do tratamento (razão de risco) foi de 0,92 [IC 95% 0,50, 1,67], sugerindo novamente um benefício global de tratamento com HI-164OV embora este não fosse estatisticamente significativo ($p=0,262$). A taxa de eventos no grupo durante esses períodos foi de 0,69 eventos/100 dias no grupo

do placebo e 0,85 eventos por 100 dias no grupo HI-164OV em março-maio. Em junho-outubro, a taxa foi de 0,90 eventos por 100 pacientes dia, no grupo do placebo e 0,59 eventos/100 dias paciente no grupo HI-164OV.

5 Proporção de doentes em tratamento de um episódio de bronquite aguda: Não houve diferença estatisticamente significativa na proporção de pacientes que experimentam um episódio de bronquite aguda no grupo dois ($p=0,734$).

10 A duração dos episódios de bronquite aguda: A duração média de episódios de bronquite aguda no grupo HI-164OV (8,5 dias) foi menor em comparação com placebo (15,0 dias), porém, isto não foi estatisticamente significativo ($p=0,0879$) diferentes. No entanto, houve uma diferença significativa na duração média dos episódios: $14,32 \pm 17,01$ (SD) dias no grupo HI-164OV e $22,72 \pm 18,76$ (SD) dias no grupo placebo ($p=0,0141$). A análise do tempo médio para o primeiro episódio de bronquite aguda não apresentou diferença estatisticamente significativa (81,0 dias no grupo HI-164OV e 100,0 dias no grupo placebo, $p=0,7962$).

20 O número de cursos de antibióticos para o tratamento de episódios agudos de bronquite: O número de pacientes tratados com antibióticos para episódios agudos de bronquite foi semelhante entre os grupos HI-164OV e placebo (11 *versus* 13, respectivamente). Nestes mesmos pacientes, havia menos cursos de antibióticos prescritos no grupo HI-164OV (19 cursos contra 48 para o placebo); esta diferença foi significativa, $p=0,031$. (Este cálculo foi baseado em uma revisão retrospectiva clínica dos antibióticos prescritos para episódios agudos de bronquite). Além disso, houve mais pacientes com mais cursos de antibióticos no grupo placebo (5 pacientes com três cursos e 6 com > 4 cursos) do que no grupo ativo (1 paciente com 3 cursos e 1 com > 4

cursos). Houve > 75% de redução no número total de dias de tratamento com antibiótico para os episódios agudos de bronquite, de um total de 543 dias no grupo placebo e 136 no HI-164OV grupo ($p=0,013$). O número médio de dias de antibiótico administrado por paciente foi de 41,77 dias (intervalo de 5-117 dias) no grupo placebo e 12,36 dias (variação 1-41 dias) no grupo HI-164OV.

1.18.10 VARIÁVEIS DE EFICÁCIA SECUNDÁRIA

Medida dos marcadores imunológicos de proteção da mucosa substitutos (anticorpos específicos HiNT no soro): O anticorpo para o antígeno HiNT foi detectado no início e final do estudo exemplo. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos placebo e ativo para ambos os níveis médios ou o grau de variação (determinada por grandes barras-SE), como havia sido observado no estudo HI-H003 de indivíduos que fumavam, mas a maioria dos quais não tinha conhecimento da doença de vias aéreas refletindo diferentes níveis de colonização intrabronquial. Nos doentes com DPOC moderada a grave (estudo HI-H002), houve uma diferença pequena, mas significativa na mudança de anticorpos IgG anti HiNT (0,15 Logio, $p = 0,004$), com uma tendência de um sentido similar de uma mudança para IgA anticorpo anti HiNT (0,09 de um Logio, $p=0,08$). Este efeito significativo do tratamento não foi observado em pessoas com uma FEV_i de > 50% do previsto. O mecanismo não é claro. Monitorização mais frequente da resposta de anticorpos para o tratamento pode proporcionar uma imagem mais clara do mecanismo de mudança.

A presença de *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae* e *Pseudomonas spp* no escarro: Os resultados da bacteriologia do escarro da presente ação mostraram isolamento consistente de menos patógenos não-HiNT (*Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus*

pneumoniae e *Pseudomonas aeruginosa*) em pacientes sob terapia HiNT oral. Por exemplo, o número total de amostras de cultura positiva no grupo HI-164OV foi de 34 e 66 no grupo placebo das quais o *H. influenzae* foi isolado 17 e 22 vezes, respectivamente. A carga do 'outro patógeno' foi 17 isolados no grupo ativo e 44 no grupo placebo, estes patógenos colonizadores sendo predominantemente *Moraxella* e *Pseudomonas*. Quatro pacientes do grupo HI-164OV e 8 no grupo do placebo tiveram mais de uma bactéria isolada durante o estudo. Estes resultados são consistentes com os dados qualitativos nos estudos
 5 antecedentes do Broncostat (TM). A redução geral no isolamento do patógeno observada após tratamento HI-164OV é interpretada de modo a refletir a natureza não-específica do mecanismo efetor final (ou seja, fagocitose) ou a uma maior utilização de antibióticos no grupo placebo.

Gravidade dos episódios de bronquite aguda: Não foram
 15 determinados parâmetros especificados no protocolo para medir a gravidade dos episódios de bronquite aguda. Entretanto, o uso de corticosteróides sistêmicos e outros medicamentos concomitantes para a gestão desses episódios e também a internação de pacientes por eventos respiratórios representam medidas de severidade. Verificou-se
 20 que os pacientes no grupo HI-164OV receberam menos tratamentos com corticosteróides durante episódios de bronquite aguda (4 no grupo HI-164OV e 11 no grupo placebo). Houve também uma diferença acentuada no número de dias de tratamento com esteróides sistêmicos, embora esta não tenha sido estatisticamente significativa (grupo HI-
 25 164OV: 61 dias (média de 15,25 dias), grupo placebo: 289 dias (média de 26,27 dias), $p=0,259$). Além disso, a hospitalização para gerenciamento de eventos adversos respiratórios foi três vezes maior no grupo placebo ($n=7$, 10 internações) do que no grupo HI-164OV ($n=1$, uma internação), o que foi estatisticamente significativo ($p=0,0362$).

1.19 RESULTADOS DE SSEGURANÇA

Eventos adversos: A proporção total de pacientes com um EA em qualquer classe de órgão do sistema primário foi semelhante (18 (100%) no grupo HI-164OV *vs* 19 (95%) no grupo placebo). A maioria dos eventos adversos relatados foi leve ou moderado, e não foi considerado como relacionado ao tratamento em estudo; houve um paciente no grupo HI-164OV (paciente 03 que teve um episódio de gastroenterite moderada) e 02 no grupo placebo (pacientes 14, que teve erupção moderada e afrontamento imediatamente após a visita 1 e aconselhado a não mais tomar a medicação do estudo, e 27 pacientes que apresentaram náusea leve) com os eventos que foram descritos como sendo possivelmente relacionados ao tratamento em estudo. Nenhum evento foi considerado definitivamente relacionado com o tratamento em estudo.

Um paciente do grupo placebo morreu como resultado de uma exacerbação infecciosa de limitação crônica das vias aéreas por *Pseudomonas* cerca de dois meses após o início do estudo. O paciente tinha completado dois cursos da medicação em estudo, e tinha sido retirado do estudo, em 25 de maio de 2006; ele morreu no dia 06 de Julho de 2006. O evento não foi considerado relacionado ao tratamento em estudo. Um total de onze pacientes (3 pacientes (16,7%) no grupo HI-164OV e 8 (40,0%) no grupo do placebo) relataram eventos adversos graves (não estatisticamente significativo, $p=0,160$), mas nenhum deles relacionado com o tratamento. Estes onze pacientes (3 no grupo HI-164OV contra 8 no grupo do placebo) foram hospitalizados um total de 15 vezes (3 eventos levando à internação no grupo HI-164OV *versus* 12 no grupo placebo, $p=0,0472$). Três vezes mais pacientes foram hospitalizados para a gestão de um evento respiratório no grupo placebo ($n = 7$, 10 internações) do que no grupo HI-164OV ($n = 1$, uma

internação), o que foi estatisticamente significativo ($p=0,0362$). O número de pacientes internados por eventos não respiratórios foi o mesmo em ambos os grupos (2 pacientes). Este estudo do exemplo avaliou os efeitos do HI-164OV *versus* placebo como tratamento *addon* em 18 e 20 pacientes, respectivamente, com doença pulmonar moderada a grave (demonstrada por um FEV₁ de cerca de 1,0 litros/seg e <50% do valor previsto) que tiveram pelo menos dois episódios de bronquite aguda por ano nos últimos 2 anos. O benefício do tratamento com HI-164OV foi observado nos parâmetros primários, embora, dada a pequena dimensão dos grupos de tratamento, nem todas as análises atingiram significância estatística. O maior número de pacientes com doenças cardíacas no grupo do placebo é provável que tenha afetado negativamente a resposta à infecção. A coerência do benefício foi evidente nos critérios de eficácia primários. Houve uma redução do risco de 16% no número de episódios de bronquite aguda no grupo HI-164OV e em torno de redução de 35% na duração média destes episódios ($p=0,0141$) em comparação com o placebo. O efeito do HI-164OV ficou evidente, nos primeiros três meses de tratamento, e mantido ao longo do estudo. Além disso, houve uma redução de 60% nos cursos de antibióticos utilizados para tratar os episódios de bronquite e uma redução de 75% do total de dias de antibiograma. Onze pacientes do grupo placebo e quatro no grupo HI-164OV receberam corticóides sistêmicos (via oral ou intravenosa) corticóides para controlar os episódios agudos de bronquite. Estes resultados foram ainda apoiados por uma redução na hospitalização por eventos respiratórios; houve uma redução de 80% no número de pacientes internados naqueles tomando o HI-164OV em comparação com o placebo (7 *vs* 1) e uma redução de 90% no número das internações (10 *vs* 1). A taxa de internação por outros motivos foi a mesma entre os dois

grupos. Essencialmente, o HI-164OV demonstrou um perfil de segurança aceitável. Não havia um padrão específico de eventos adversos no grupo HI-164OV e nenhum problema evidente nos sinais vitais ou dados laboratoriais.

5 Os dados da bacteriologia mostram que houve uma maior colonização bacteriana do *H. influenzae* e também outros agentes patogénicos no grupo placebo. Isso é interpretado como estando relacionado à eficácia do HI-164OV e ainda devido ou apesar do maior uso de antibióticos no grupo placebo. Houve um ligeiro aumento da IgG
10 específica HiNT e dos níveis de IgA.

Os dados resultantes representados nas figuras 11 e 12 demonstram o sucesso da resposta imune específica do antígeno e a
estimulação do sistema imune não-específica pelo HI-164OV. A Figura
11 mostra os resultados de todos os pacientes (excluindo a
15 contaminação do escarro) em relação ao número de infecções vividas
por um grupo de controle em comparação com o grupo de pacientes que
tinham tomado o curso recomendado ou sugerido de HI-164OV. Estes
resultados demonstraram que houve uma queda significativa nas taxas
de infecção não só com a *H. influenzae*, mas também em relação a
20 outros organismos conhecidos que infectam as vias aéreas (incluindo,
mas não limitados a: *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae*, espécies de
Streptococcus, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas*, *S. aureus* e / ou espécies de
Mycobacterium) e camadas da mucosa dos pacientes. Estes resultados
particularmente destacam o facto de que o HI-164OV está gerando uma
25 resposta imune tanto específica como não-específica em pacientes
imunizados.

Igualmente importante, os resultados das figuras 11 e 12 mostram que as respostas imunes específicas e não específicas são aproximadamente iguais ou equilibradas. Em particular, a resposta

específica contra Hi limita ou impede o montante aproximadamente igual de infecções causadas por infecções bacterianas secundárias (tais como por *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* e/ou *Klebsiella pneumoniae*). Observe que, para efeitos da presente

5 especificação "aproximadamente igual" é definido como sendo dentro de um intervalo de 0-5 vezes. Por favor, note que os resultados também demonstram que, para uma resposta imune não específica ocorrer, o paciente não é obrigado a ser infectado de forma aguda ou previamente exposto ao antígeno bacteriano primário, que nesta ação é o HiNT.

10 Portanto, a vacina oral descrita nesta ação pode ser eficaz para proteger ou limitar o risco de infecção em pacientes não expostos ao HiNT ou Hi para que a vacina oral demonstre ser bem sucedido.

O sucesso dos resultados é ainda mais destacado quando os resultados são estreitados para investigar de um subgrupo de

15 pacientes que sofrem de doenças graves das vias aéreas como a DPOC. Os resultados deste subgrupo são descritos na figura 12 e mostram ainda maiores quedas nas taxas de infecção em relação a esses pacientes. Novamente, o HI-164OV tem demonstrado eficácia na sua utilização tanto para a geração de respostas imunes específicas para Hi

20 como respostas imunes não específicas para outros organismos bacterianos e dessa forma reduzindo as taxas globais de infecção. Por favor, note que as respostas imunes não específicas podem prevenir ou limitar a outras infecções bacterianas da camada mucosa e das vias respiratórias e cair dentro do escopo desta especificação. Na Figura 13,

25 as diferenças entre o Broncostat (TM) (como descrito na publicação internacional PCT WO 86/05691) e o HI-164OV são facilmente visíveis. Esta tabela representa o aumento do índice de estimulação na proliferação das células T no sangue após a administração das respectivas vacinas. Mesmo depois da 62ª semana, o HI-164OV

permanece estimulando a proliferação de células T, enquanto o Broncostat (TM) não consegue fazer isso de maneira estatisticamente significativa. Os dados desta tabela demonstram a estimulação do sistema imune não-específico por uma vacina do presente pedido.

5

EXEMPLO 6: CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DA LINHAGEN HI-164

1.20 – MATERIAIS E MÉTODOS

1.20.1 – PREPARAÇÃO DE EXTRATOS BACTERIANOS INTEGRAIS

MÉTODO I – BACTÉRIAS CULTIVADAS EM PLACAS DE ÁGAR CHOCOLATE

Uma placa de ágar chocolate foi inoculada com uma única colônia de HiNT-164 ou outra de *Haemophilus influenzae* isolada. A placa foi incubada durante a noite a 37°C + 5% de CO₂. Isto resultou em forte crescimento. As bactérias eram removidas da superfície da placa com um *loop* estéril de 10 µl e imersos em 0,5 mL de reagentes Cellytic B Cell Lise em um tubo de microcentrífuga. (As bactérias foram desalojados pela fricção do *loop* entre dois dedos para rodar ele, imerso em tampão de lise). O tubo foi deixado em repouso por 5 minutos para permitir que a lise completa das bactérias. O tubo foi então centrifugado a 11,500 g por 5 minutos para sedimentar os restos celulares insolúveis. O sobrenadante foi cuidadosamente removido para um tubo de microcentrífuga estéril e armazenado a -70°C até serem necessárias. A concentração de proteína da amostra foi determinada através da realização de um Ensaio de estimativa de proteína utilizando o kit Pierce BCA para o ensaio da proteína.

25

MÉTODO II - CULTIVO DE BACTÉRIAS EM ÁGAR TRIPTONA DE SOJA +

SUPLEMENTO HTM

A base do caldo de triptona de soja e suplemento HTM foi obtida a partir de Oxoid.

Para preparar o caldo de triptona de soja com o suplemento HTM, 12,5 gramas de pó de TSB foram pesados e colocados em frasco

Schott de 1L. Em seguida, 2,5 g de extrato de levedura foram pesados e adicionados à garrafa. Água destilada (0,5 L) foi adicionada e a garrafa agitada para dissolver os materiais. O meio foi então autoclavado por 15 minutos. O meio foi deixado para resfriar durante a noite à temperatura ambiente. No segundo dia, utilizando técnica estéril, 2 mls de água destilada estéril foi adicionada ao frasco de suplemento HTM usando uma seringa de 3 ml e agulha 19G. Esta foi agitada para dissolver os sólidos e colocada em temperatura ambiente por 30 minutos. O conteúdo do vial foi adicionado ao frasco do meio utilizando uma seringa e agulhas estéreis. O conteúdo do frasco Schott foi misturado e etiquetado com os dados. O meio foi armazenado a 2-8°C por até 1 mês. Uma placa de ágar chocolate foi inoculada com uma única colônia de HI-164 e incubada durante a noite a 37°C + 5% CO₂. (Isto resultou em forte crescimento). No terceiro dia 100 mls do preparado TSB + meio HTM foi adicionado a um Erlenmeyer de 250 mL e pré-aquecido a 37°C agitado em incubadora. A preparação de HiNT-164 vivo a 1×10^{10} foi preparada por coleta das bactérias da placa em PBS, "a medindo a densidade óptica, comparando com uma parcela previamente preparadas de densidade óptica *versus* concentração de bactérias e do ajustamento das concentrações, conforme necessário. O caldo foi inoculado com 1×10^{10} do HiNT-164 vivo (1 mL de 10^{10} /mL) para dar uma concentração inicial de 1×10^8 /mL e misturados por agitação. A suspensão bacteriana foi incubada a 37°C em incubadora com agitação por 11 horas durante a noite. Até este ponto as bactérias estavam em uma fase de crescimento ótimo e expressando proteínas de interesse. Para determinar isso uma leitura em 595nm OD da suspensão foi determinada a cada meia hora. Quando o OD se tornou estável, a curva de crescimento atingiu a fase estacionária. 100 µL da suspensão foi pipetado dentro de uma placa "multiwell" de 96 poços de microtitulação

e lido em comprimento de onda de 595 nm. A densidade óptica foi solicitada a estar entre 0,5-1,0. Se a suspensão foi superior a 1,0, foi ajustado adicionando caldo estéril extra ao balão. Quando ajustada de 1,5 mL da suspensão bacteriana foi centrifugada a 11,500 g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento re-suspenso em 0,4 ml de CellLytic B. Esta foi brevemente centrifugadas e misturado por 5-10 minutos para garantir a extração completa das proteínas solúveis e foi novamente centrifugado a 11,500 g por 5 minutos para sedimentar quaisquer restos celulares insolúveis. O sobrenadante foi cuidadosamente removido para um tubo de microcentrífuga estéril e armazenadas a -70°C até serem necessárias. A concentração de proteína da amostra foi determinada através da realização de um Ensaio de estimativa de proteína utilizando o kit-Pierce-BCA para o ensaio da proteína.

1.20.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA UNIDIMENSIONAL

Vinte microgramas de proteínas de cada extrato foram diluídos em 20 µL de água bidestilada e 10 µL de solução SDS-Stop foi adicionado. As amostras foram colocadas em poços do gel 12% SDS-PAGE, juntamente com marcadores de peso molecular (BIORAD). As amostras foram corridas em 200V até o corante atingir o fundo do gel. Os géis foram corados com corante Sigma EZBlue.

1.20.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA BIDIMENSIONAL

100 µg de cada amostra foram precipitadas com acetona e ressuspensa em tampão de reidratação. 3-10 tiras IPG de 7 cm foram utilizados para a primeira dimensão, com um tempo total de focagem de 5 horas e 18.750 Vhrs. Tiras IPG foram carregadas no topo de 12% de géis SDS-PAGE com espessura 1.5mm e selado com agarose. Plugues de Agarose de peso molecular também foram adicionados ao topo dos géis. Géis foram corridos por 10 minutos em 50V e depois 45 minutos a

200V. Géis foram corados com Coomassie Blue e descorados por 24 horas. Géis foram digitalizados e os pontos detectados.

1.20.4 Análise de proteínas por MALDI

A banda da proteína ou *spots* foram retiradas do gel SDS-PAGE e colocados em tubos de 1,5 ml. As bandas foram descorados com 3 alterações de 50% methanol/50 mM de bicarbonato de amônio e secos ao ar durante a noite. Bandas foram reidratadoas usando 200-400 ng de Tripsina dissolvida em 20 mM bicarbonato de amônio. Após 10 minutos, mais 5 -10 µL de 20 mM de bicarbonato de amônio foram adicionados em cada banda, se necessário. Bandas foram incubadas a 37°C por 3 horas. Bandas foram maceradas e 1 µl das amostras foram removidas. As amostras foram então misturadas na proporção 1:1 com matriz CHCA e "spotted" identificado no-slide do MALDI.

As amostras foram analisadas por um Amersham Ettan MALDI-TOF para gerar uma imagem "*fingerprint*" da massa de peptídeos. Correspondentes foram procurados por meio de banco de dados "nr" como parte da análise. Todas as amostras que não apresentaram bons correspondentes foram, então, pesquisadas utilizando o banco de dados "Swiss-Prot".

20

1.21 RESULTADOS

1.21.1 GÉIS UNIDIMENSIONAIS

Extratos de HI-164 e HI-166 foram corridos em um gel unidimensional. A imagem do gel é indicada no painel da figura 11. A identidade das bandas é mostrada no painel direito da figura 11. Proteína 2 de membrana externa aparece como duas bandas no gel HiNT-164 e como uma banda no gel HiNT-166. Isso indica diferenças nesta proteína nos dois isolados de bactérias e podem ser responsáveis pela diferença na capacidade de proteção dos isolados. Duas proteínas não-identificadas HiNT-164 (MW 27 e 35) não estavam presentes em

HiNT-166 e estas proteínas também podem contribuir para a proteção superior provida pelo HI-164.

Géis unidimensionais foram corridos em placa de crescimento para HI-164 e outros isolados de bactérias, conforme mostrado na figura 12. Géis também foram corridos a partir do caldo de crescimento para HiNT-164. O gel padrão para HiNT-164 é constante, independentemente de placa de crescimento ou caldo de crescimento e é diferente ao de outras linhagens de *Haemophilus influenzae* isolados. O padrão mais semelhante ao HiNT-164 é o HiNT-167 isolado.

1.21.2 GÉIS BIDIMENSIONAIS

Géis bidimensionais foram preparados a partir de extratos de isolados bacterianos cultivados em placas. Os géis bidimensionais são mostrados a seguir nas figuras 13A-13D. O gel bidimensional apresenta uma diferença na proteína P2 de membrana externa entre HI-164 (Figura 13A) e HI-166, pois há dois pontos presentes no gel HI-164. O gel bidimensional da preparação da proteína HI-164 da membrana externa (ou seja, proteínas extraídas da membrana externa) (Figura 13C) mostra que as proteínas desta preparação foram predominantemente PME2 e PME26.

1.21.3 A ANÁLISE DA PROTEÍNA POR MALDI

A identidade das bandas sequenciadas a partir de géis unidimensionais é mostrada no painel da figura 11. As identidades de pontos determinados, sequenciados a partir dos géis bidimensionais são apresentados nas Tabelas 11A 11D, abaixo.

TABELA 11A: IDENTIDADE DOS PONTOS/CORRIDAS EM GEL BIDIMENSIONAL DE PREPARADOS CELULARES INTEGRAIS DE HI-164

Amostras	ID	MW	pI
Corrida 39	Fator de elongação de translação (GTPases)	77	5

Corrida 54	Chaperonas molecular	68,2	4,8
Corrida 61	5' nucleotidase/ 2'3' fosfodiesterase cíclica e estearases relacionadas	59,9	6,1
Corrida 69	Sistema de transporte de oligopeptídeos dos tipos ABC, componente periplasmico	60,9	6,2
Corrida 77	Fosfoenolpiruvato carboxycinase (ATP)	59	5,4
Corrida 75	Fosfoenolpiruvato carboxycinase (ATP)	59	5,4
Corrida 95	Triptofanase	53	6,2
Corrida 107	Proteases séricas do tipo tripsina, tipicamente periplasmico, contendo domínio PDZ C-terminal	49,1	7,7
Corrida 127	Nenhum		
Corrida 133	Enzimas do tipo-transglutaminase, proteases cisteína putativa	41,1	6,5
Corrida 142	Cadeia A, Forma Apo da proteína férrico ligante a <i>Haemophilus influenzae</i>	33,7	7,9
Corrida 159	Cadeia A, complexo Sulfhidralase O- acetilserina	33,2	6,2
Corrida 162			
Corrida 184	Anidrase carbônica	28,7	6,6
Corrida 186	fosforibosiltransferase	28.9	11
Corrida 188			
Corrida 254	Nenhum		
Corrida 206	Dismytase superóxido (Mn)	24	6,2
Corrida 212	Nenhum		
Corrida 216	Fator re-cíclico de ribossomo	20,75	6,8
Corrida 249	Fator de desencadeamento	48	5
Corrida 252	Proteína P2 de membrana externa	38	9,2 ⁽¹⁾

Corrida 256	Proteína periplasmica D-galactose ligante	33	5,3
Corrida 259	Proteína P2 de membrana externa	38	9,1
Corrida 261	Nenhum		
	(1) pl não corresponde com a posição do gel 2D (bidimensional)		

TABELA 11B: IDENTIDADE DOS PONTOS/CORRIDAS EM GEL BIDIMENSIONAL DE PREPARADOS OMP DE HI-164

Amostras	ID	MW	pl
Corrida 126	Proteína P2 de membrana externa	38	9,1
Corrida 137	Sistema de transporte de Zn^{2+} do tipo ABC, componente periplasmico de adesão superficial	37,1	6,3
Corrida 160	Isomerase 1 cis-trans peptidil-próil do tipo FKBP	26	6,8
Corrida 168	Proteína P26 de membrana externa	20	7
Corrida 183			

TABELA 11C: IDENTIDADE DOS PONTOS/CORRIDAS EM GEL BIDIMENSIONAL DE PREPARADOS DE CÉLULAS INTEGRAIS DE HI-164

Amostras	ID	MW	pl
Corrida 28	Fator de alongação de translação (GTPases)	77	5
Corrida 38	Chaperona molecular	68,2	4,8
Corrida 43	Proteína (oppA) ligante ao periplasmico, transportador ABC de oligopeptídeos	60,45	6
Corrida 98	Proteína P2 de membrana principal externa	39,99	9,2
Corrida 102	Sistema de transporte de Zn^{2+} do tipo ABC, componente periplasmico de adesão	37,8	6,4

	superficial		
Corrida 107	Sistema de transporte de açúcar do tipo ABC, componente periplasmico	35,5	5,6
Corrida 133	Sistema de transporte C4-dicarboxilato do tipo ABC	36,4	6,9
Corrida 140	Sistema de transdução transporte/sinal de aminoácidos do tipo ABC, domínio/componente periplasmico	26	8,8
Corrida 164	Proteína P26 de membrana externa	20,84	7,8
Corrida 199	Enolase	46,2	5
Corrida 205	(Fator de desencadeamento) isomerase cis-trans peptidil-prolil do tipo FKBP	48,3	4,9
Corrida 212	Fator de elongação e translação T's	30,18	5,1

TABELA 11D: IDENTIDADE DOS PONTOS/CORRIDAS EM GEL BIDIMENSIONAL DE PREPARADOS DE CÉLULAS INTEGRAIS DE HI-167

Amostras	ID	MW	pI
Corrida 14	Nenhum		
Corrida 32	Fator de elongação de translação (GTPases)	77	5
Corrida 47	Nenhum		
Corrida 56	Chaperona molecular	68,2	4,8
Corrida 85	(Fator de desencadeamento) isomerase cis-trans peptidil-prolil do tipo FKBP	48,3	4,9
Corrida 86	Fator de elongação de translação (GTPases)	43,36	5,2
Corrida 106	Síntese de cisteína	33,4	6,5
Corrida 117	Componente de transporte de fosfato do tipo ABC periplasmico	36,65	9,2

Corrida 156	Enolase	46,2	5
Corrida 190	Nenhum		
Corrida 191	Nenhum		
Corrida 192	Fator de alongação T's	30	5,1

Embora várias realizações específicas foram descritas e ilustradas, várias mudanças podem ser feitas sem se afastar do espírito e alcance do presente pedido.

REIVINDICAÇÕES

1. VACINA monobacteriana para o tratamento de uma doença de vias aéreas, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade efetiva de um único isolado bacteriano morto, ou uma fração da membrana celular externa do isolado bacteriano, o isolado bacteriano sendo o isolado de *Haemophilus influenzae* não-tipável NTHi-164, como depositado no National Measurement Institute ("NMI") sob o número V08/021002, em que a vacina está em uma unidade de dose para administração oral, compreendendo um núcleo contendo o isolado bacteriano morto ou a dita fração da membrana celular externa e um revestimento entérico em torno do núcleo.

2. VACINA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de compreender o dito isolado NTHi-164 morto.

3. VACINA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de compreender a dita fração da membrana celular externa do isolado NTHi-164.

4. Vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a vacina é célula inteira NTHi-164 morta por formalina.

5. VACINA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de compreender a forma de cápsula, comprimido ou grânulos revestidos entericamente.

6. VACINA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de ainda compreender um revestimento subentérico entre o dito núcleo e o dito revestimento entérico.

7. VACINA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de ainda compreender um revestimento em filme como sua camada mais externa.

8. VACINA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato do dito núcleo compreender lactose.

5 9. VACINA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato do dito núcleo compreender celulose ou um derivado de celulose.

10. VACINA, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato da dita celulose ou derivado de celulose ser croscarmelose sódica.

10 11. VACINA, de acordo com a qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato do dito núcleo compreender uma carga.

15 12. VACINA, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato da dita carga ser estearato de magnésio.

13. VACINA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato do peso do dito núcleo ser 400 mg a 500 mg.

20 14. VACINA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato do isolado NTHi-164 morto ou dita fração de membrana constituir 7,5 % a 15% do peso do dito núcleo.

25 15. VACINA, de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato do isolado NTHi-164 morto ou fração de membrana constituir aproximadamente 10% do dito núcleo.

16. VACINA, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato do filme de revestimento ser água purificada.

30 17. VACINA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizada pelo fato de que a forma de dose unitária compreende cerca de 10^8 a cerca de 10^{13} de unidades formadoras de colônias do dito isolado NTHi-164 morto ou a dita fração de membrana externa de cerca de 10^8 a

cerca de 10^{13} de unidades formadoras de colônias do dito isolado NTHi-164 morto.

18. VACINA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizada pelo fato da dita doença de vias aéreas ser doença pulmonar crônica obstrutiva ou doença de vias aéreas associada a fibrose cística.

19. VACINA, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato da dita doença pulmonar obstrutiva crônica ser bronquite crônica.

20. VACINA, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato da dita doença pulmonar obstrutiva crônica ser enfisema.

21. VACINA, de acordo com qualquer umas das reivindicações 1 a 17, caracterizada pelo fato da doença de vias aéreas ser asma.

FIGURA 1

Curva de crescimento de *Haemophilus* 164 e ATCC 19418

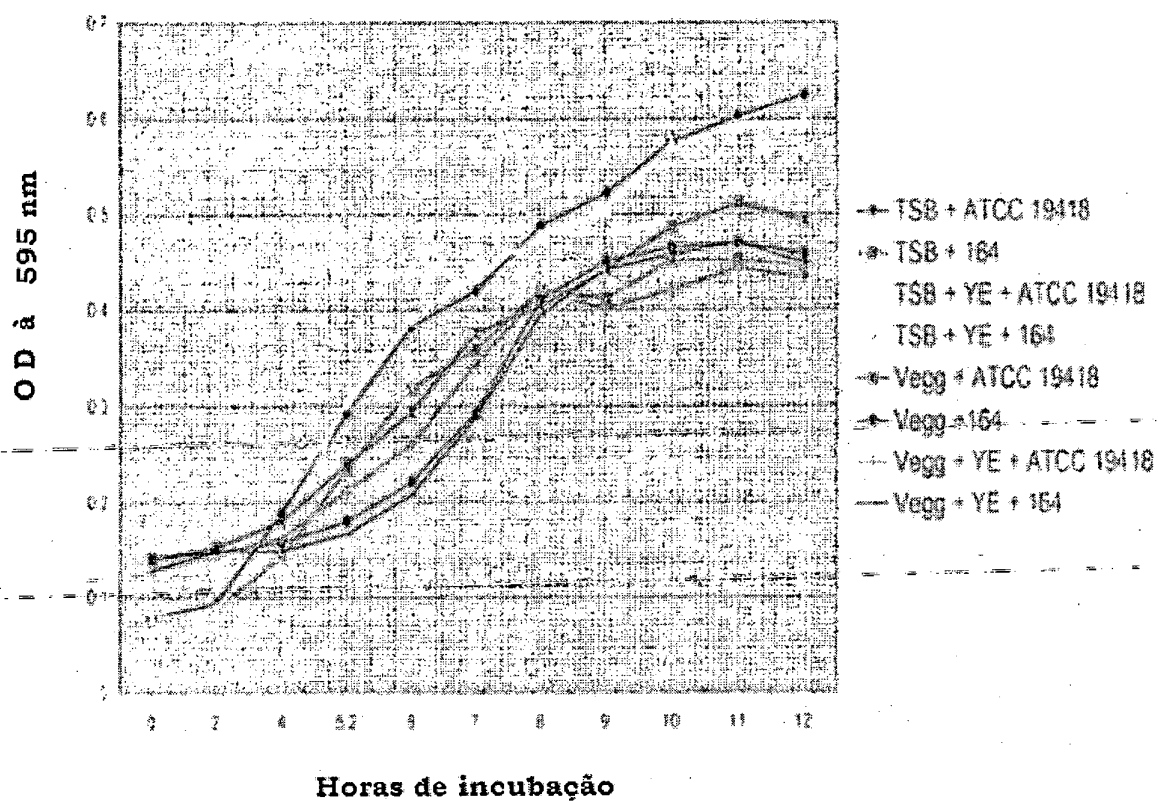


FIGURA 2

**Tamanho de dose de imunização e número:
Efeito do "clearance" da infecção**

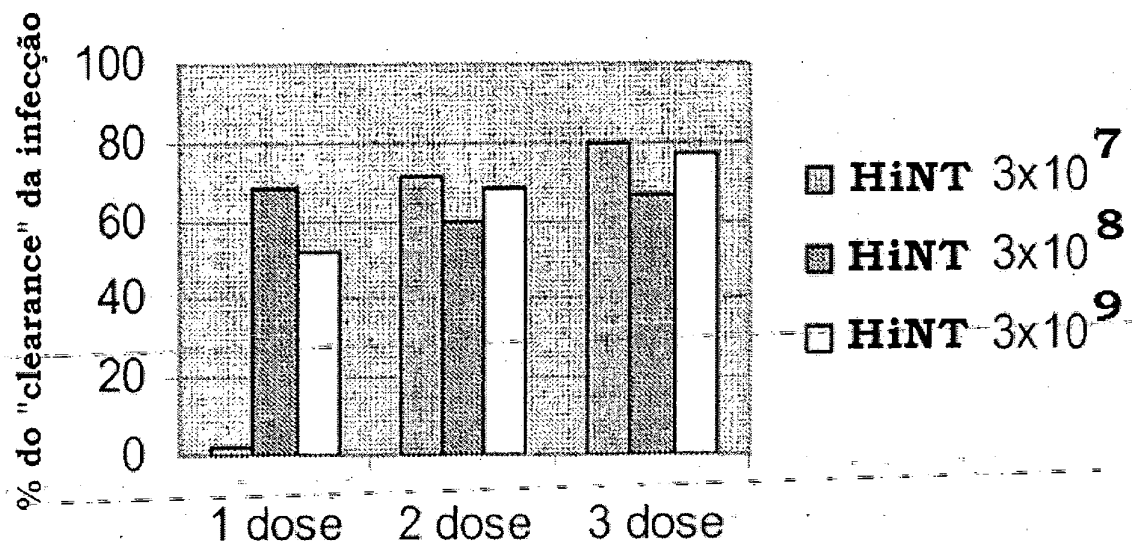


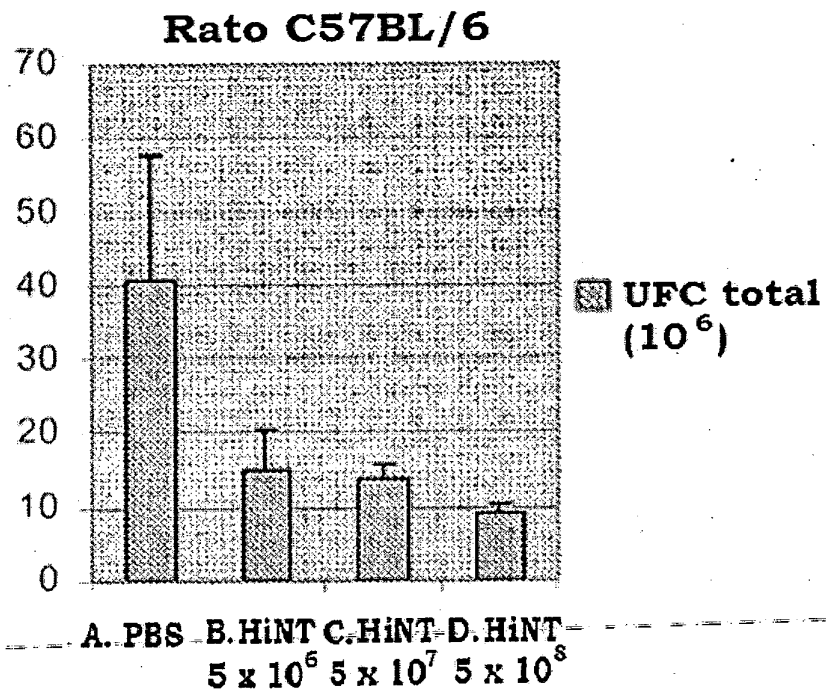
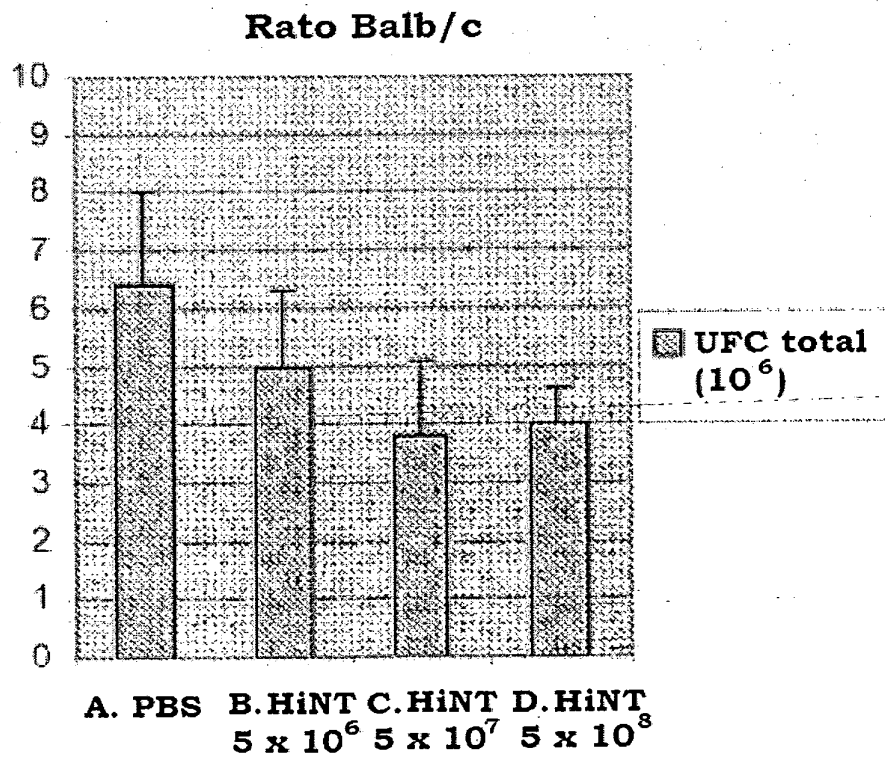
FIGURA 3A**FIGURA 3B**

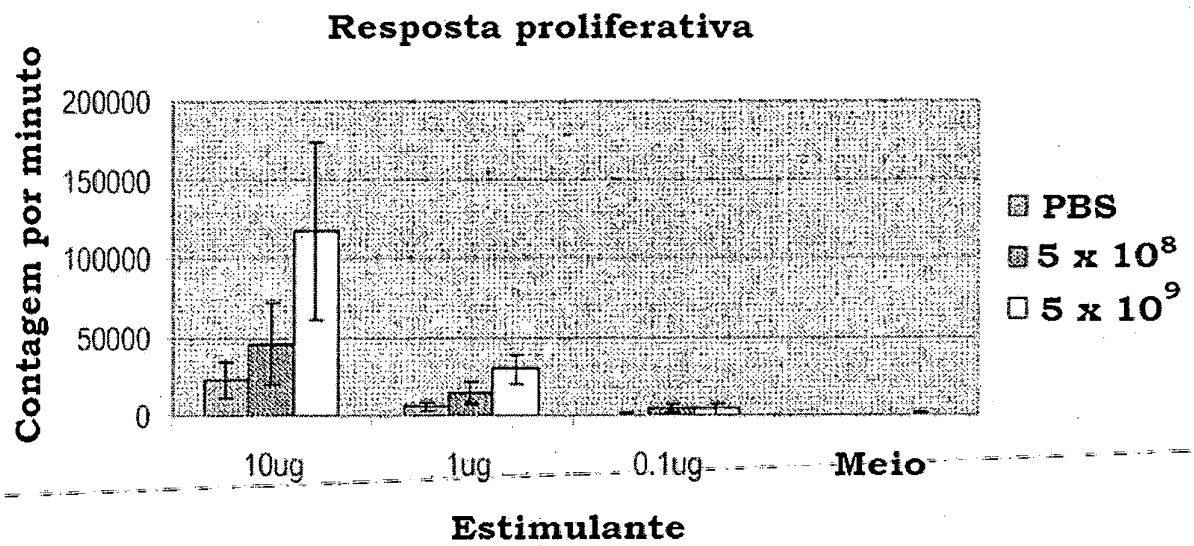
FIGURA 4

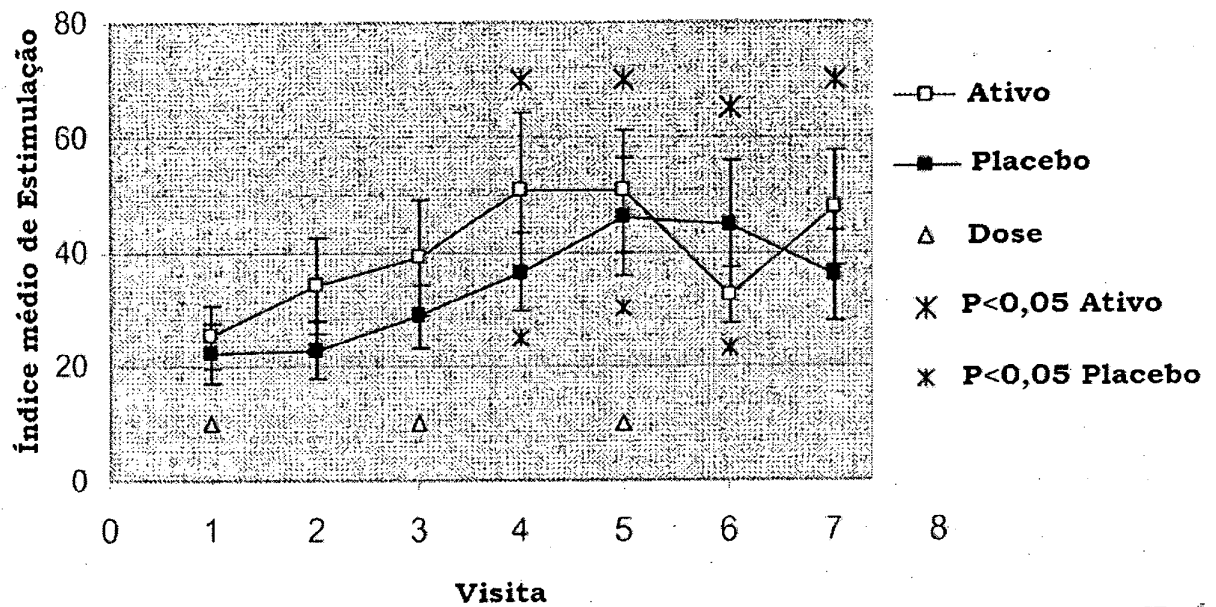
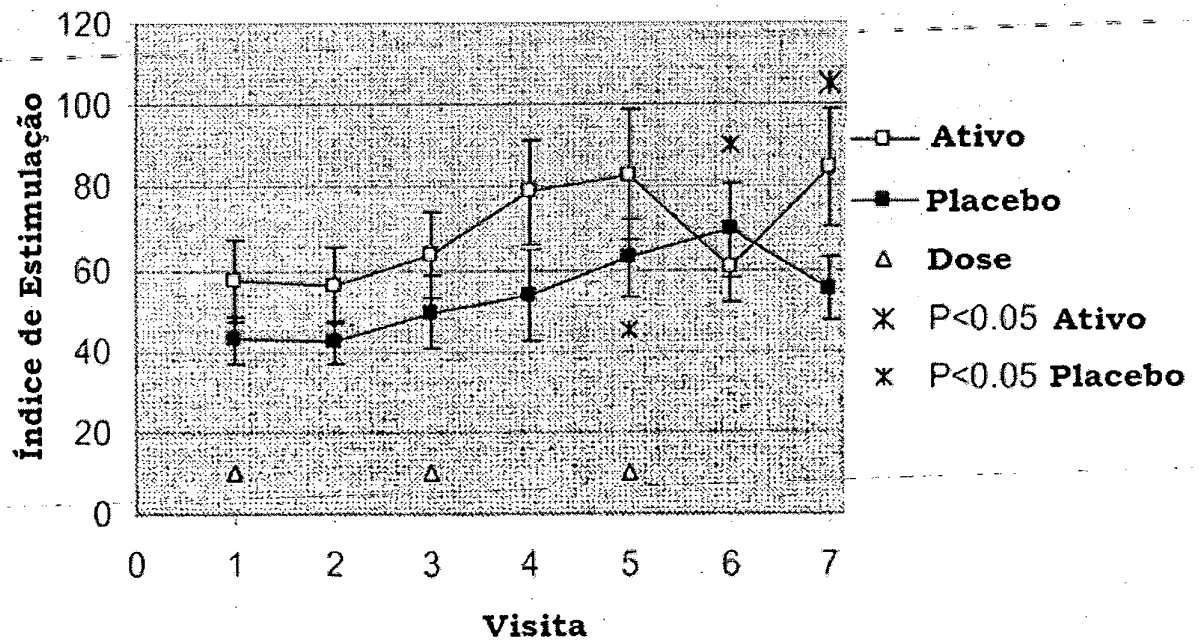
FIGURA 5A**FIGURA 5B**

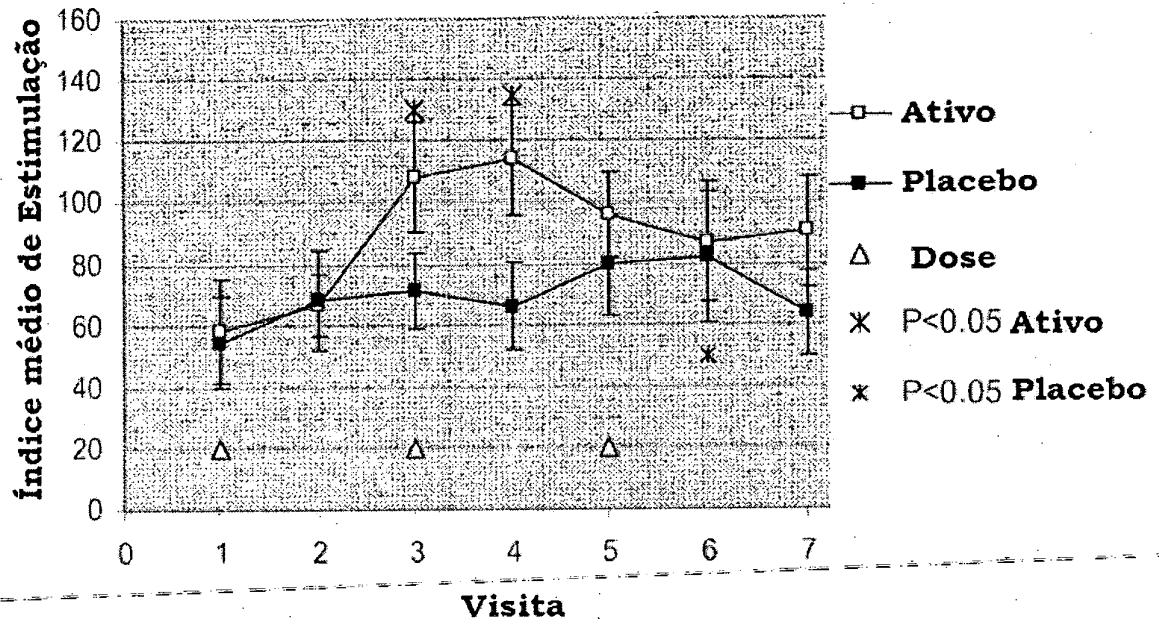
FIGURA 5C

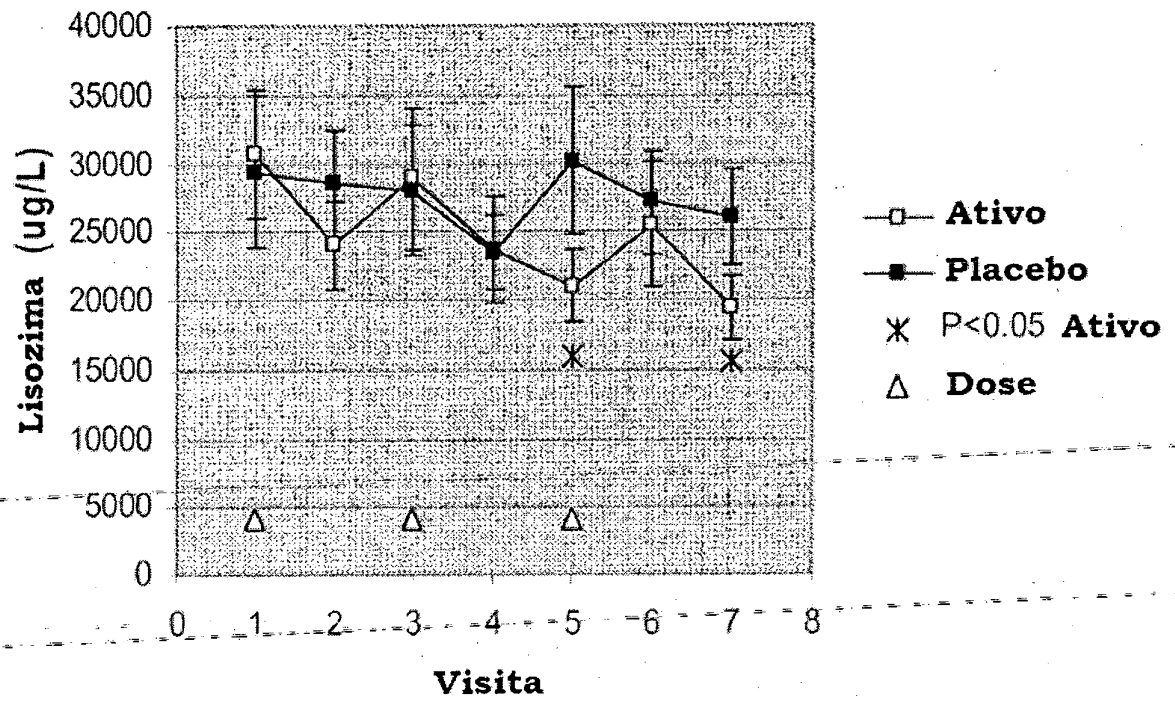
FIGURA 6

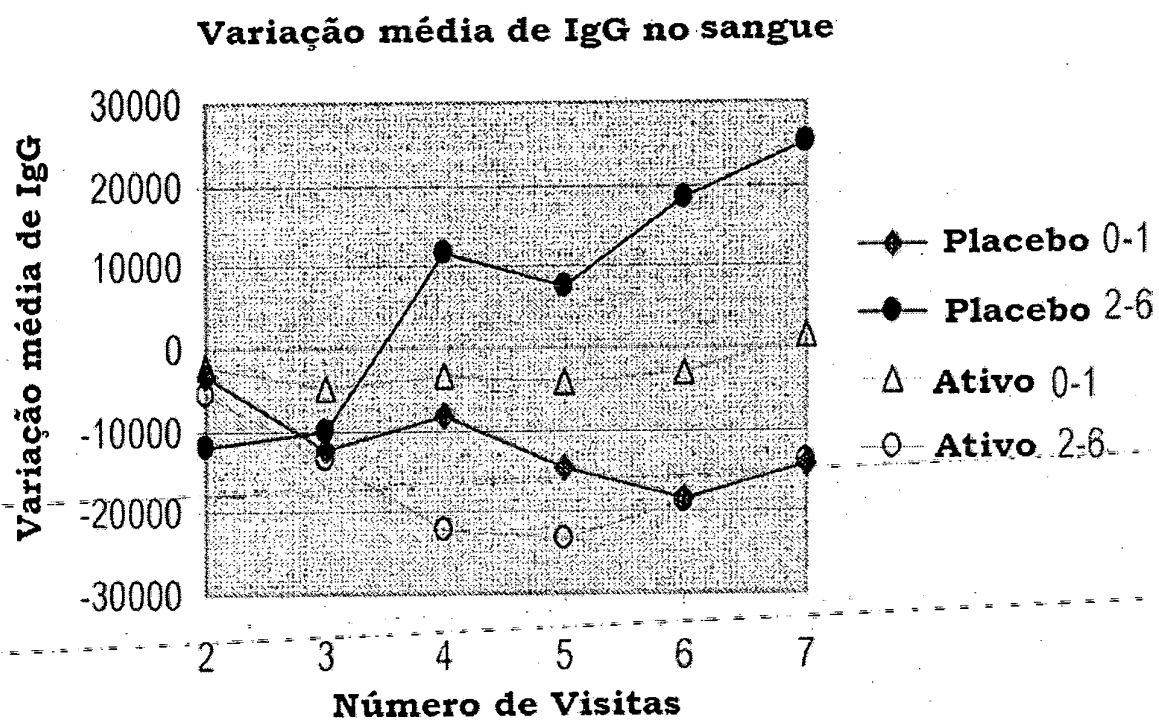
FIGURA 7

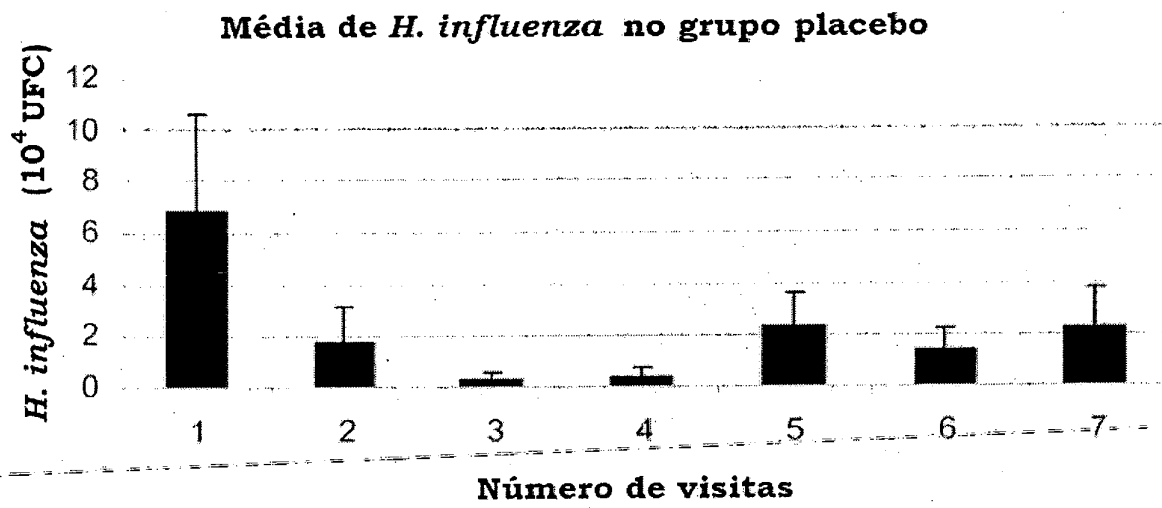
FIGURA 8

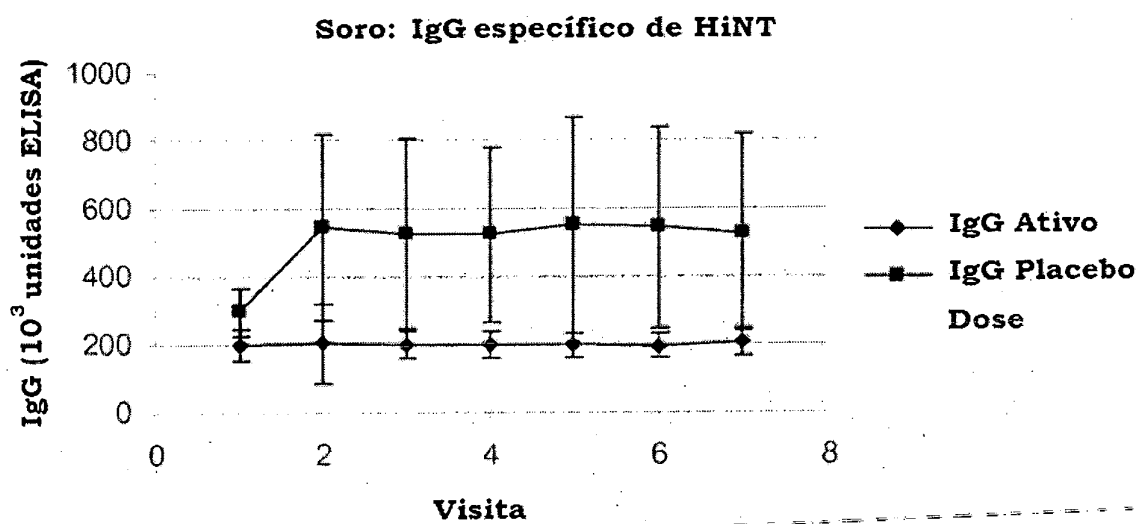
FIGURA 9

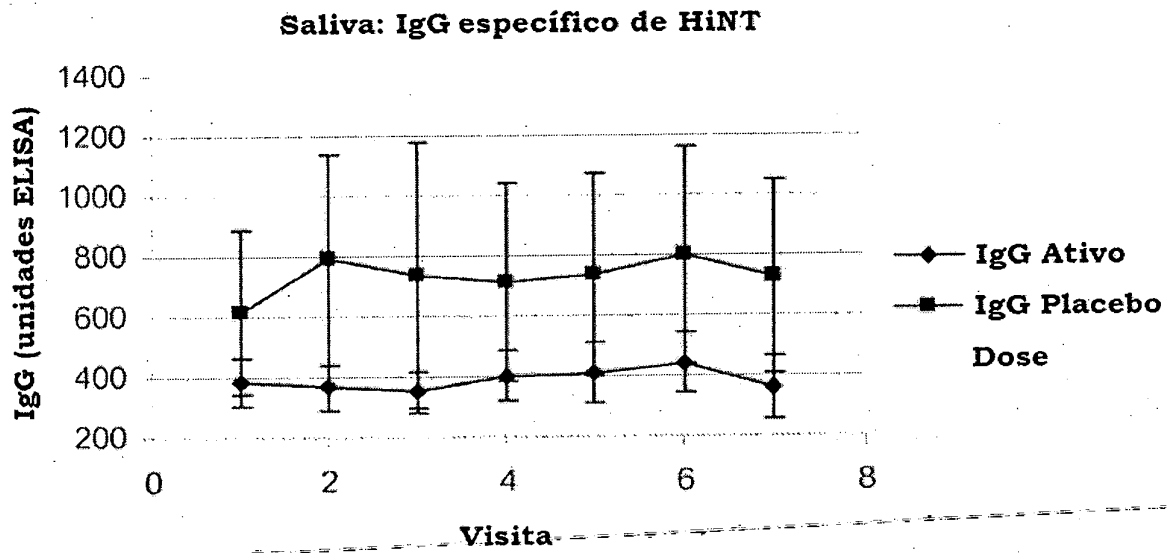
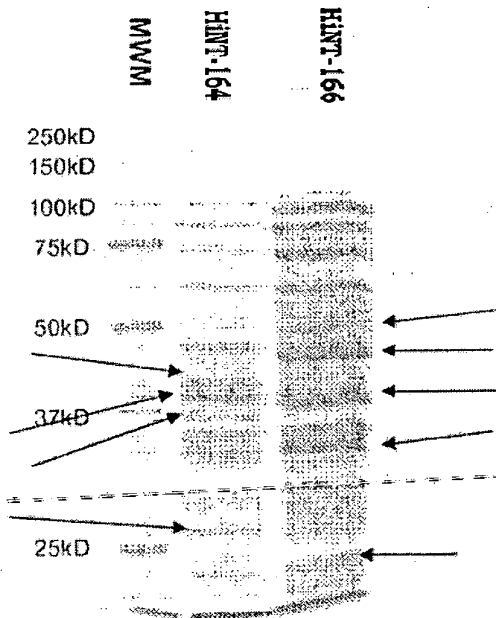
FIGURA 10

FIGURA 11

Sample	ID	MW	pI
1D gel			
NTHI164			
41kD	outer membrane protein 2	38	9.2
NTHI164	outer membrane protein 2 and	38	9.2
39kD	Ketol-acid reductoisomerase	36	5.7
NTHI164			
35kD			
NTHI164			
27kD			
NTHI166	GTPases translation		
48kD	elongation factors	43.3	
NTHI166	elongation factor Tu (GTP-		
46kD	binding)	43	5.3
NTHI166			
40kD	outer membrane protein P2	38	8.9
NTHI166	elongation factor T's		
33kD	(associates with the EF-		
	Tu/GDP complex)	30	5.1
NTHI166			
22kD	outer membrane protein 28	20	7

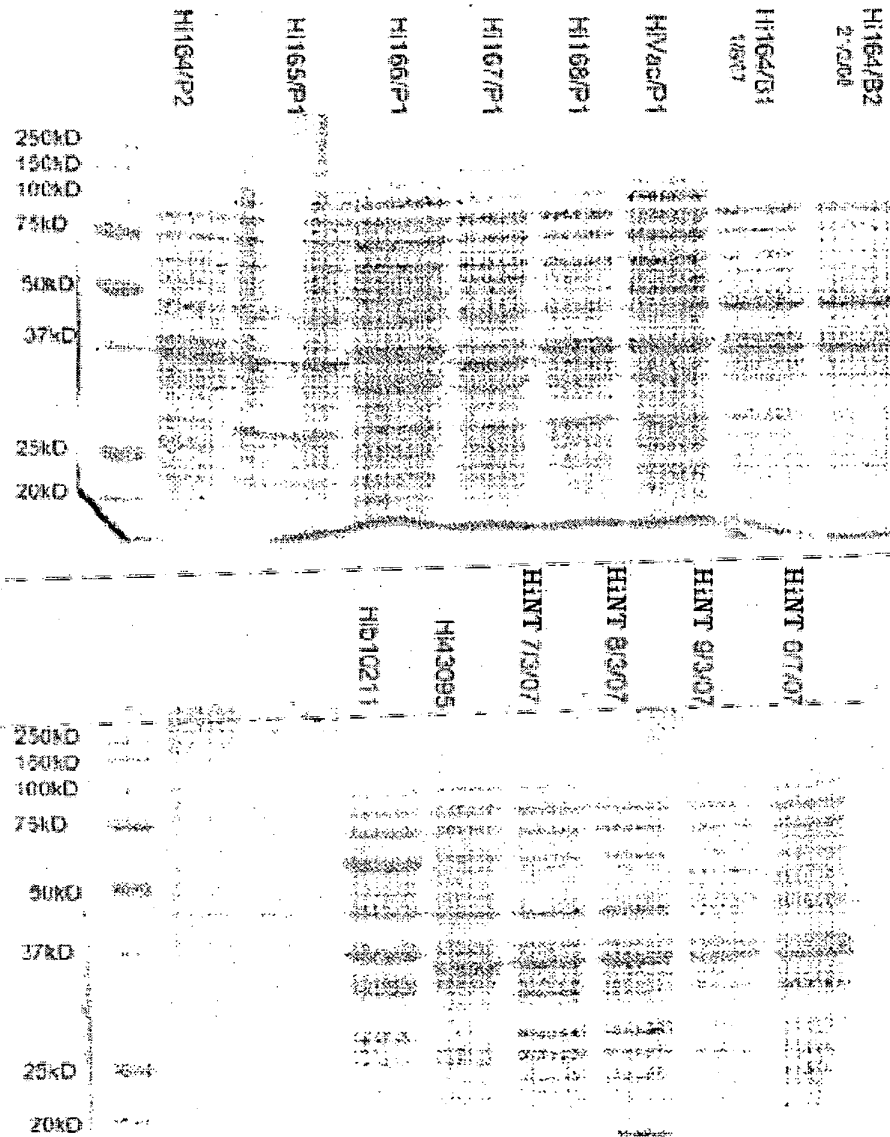
FIGURA 12

FIGURA 13A

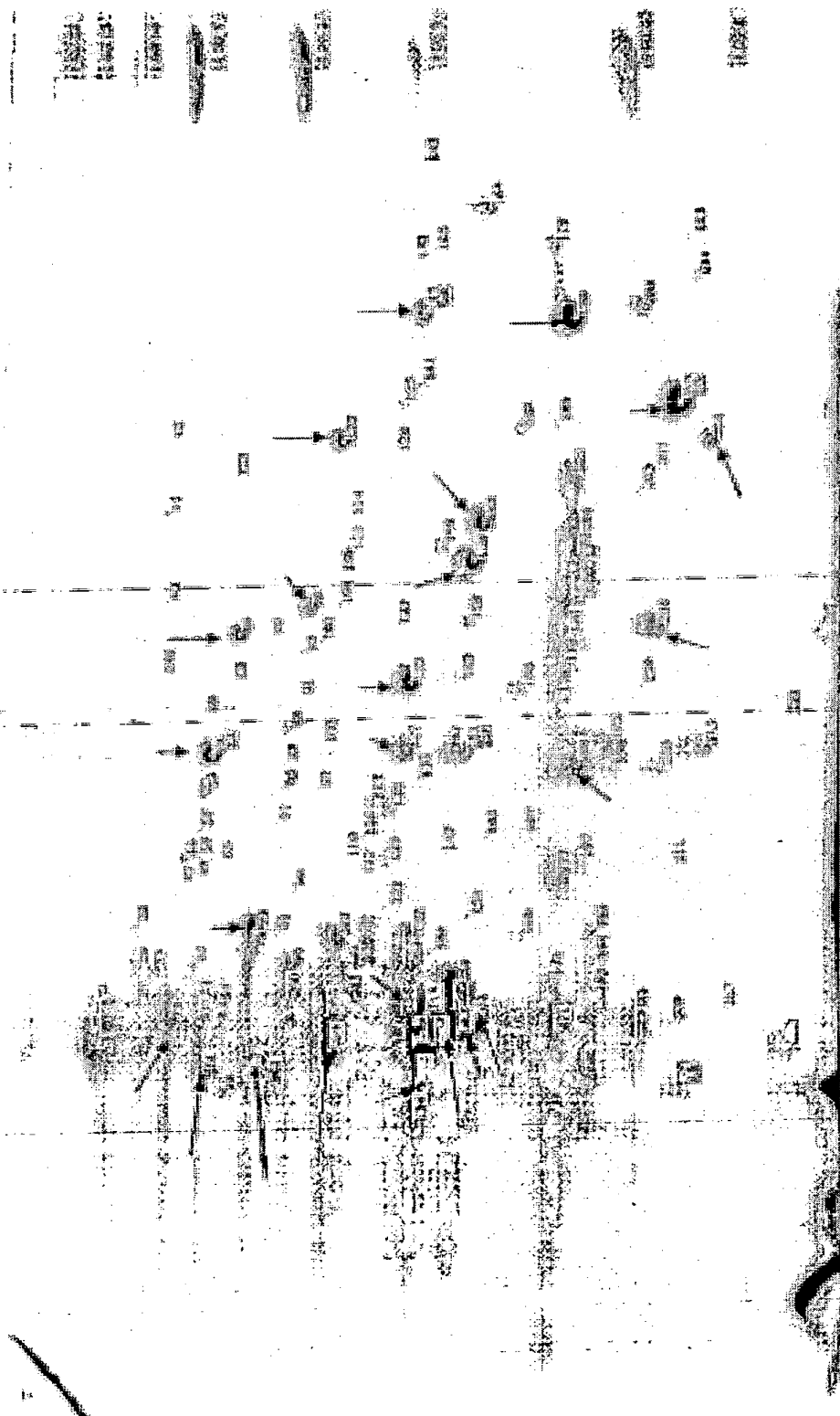


FIGURA 13B

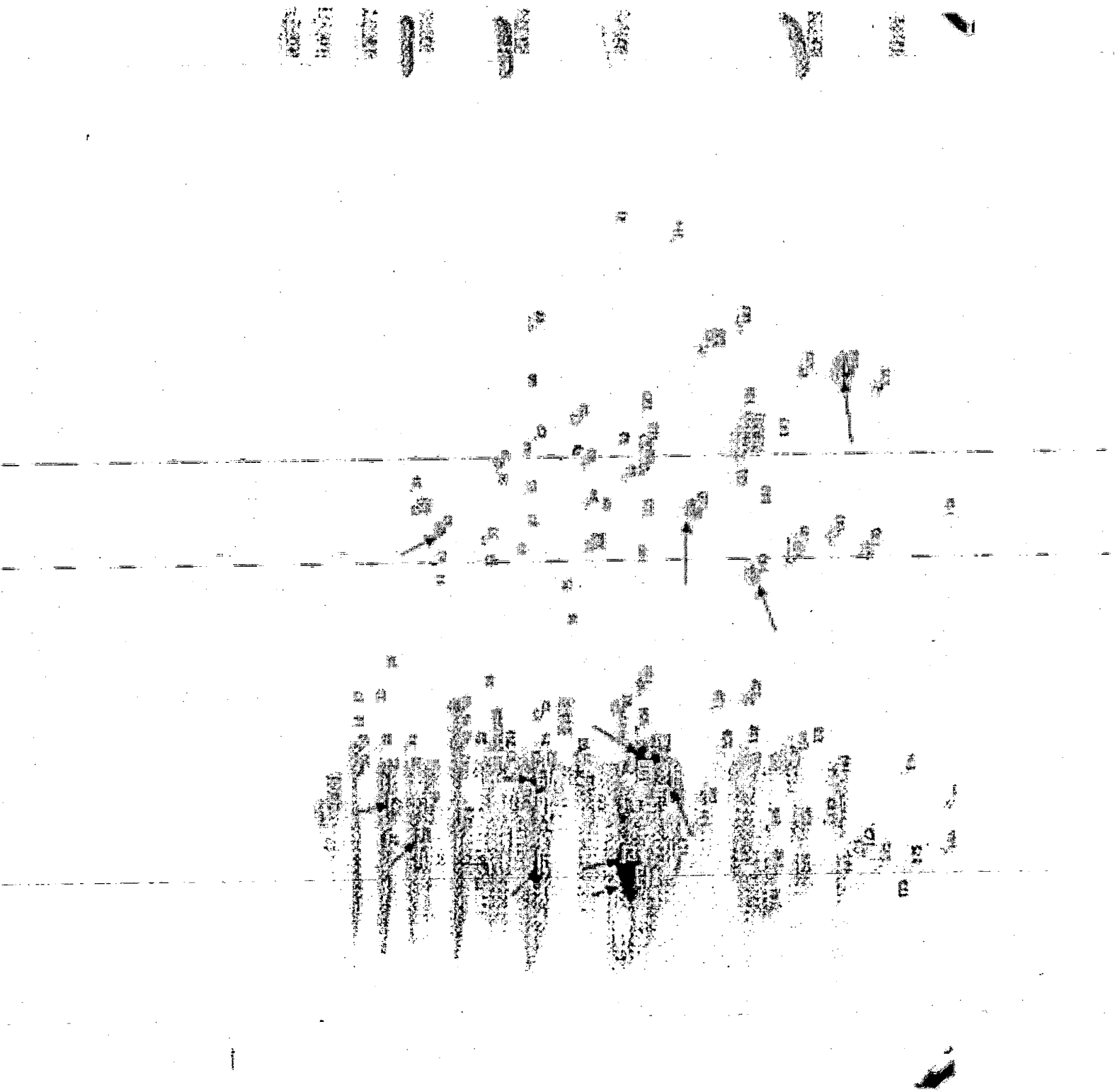


FIGURA 13C

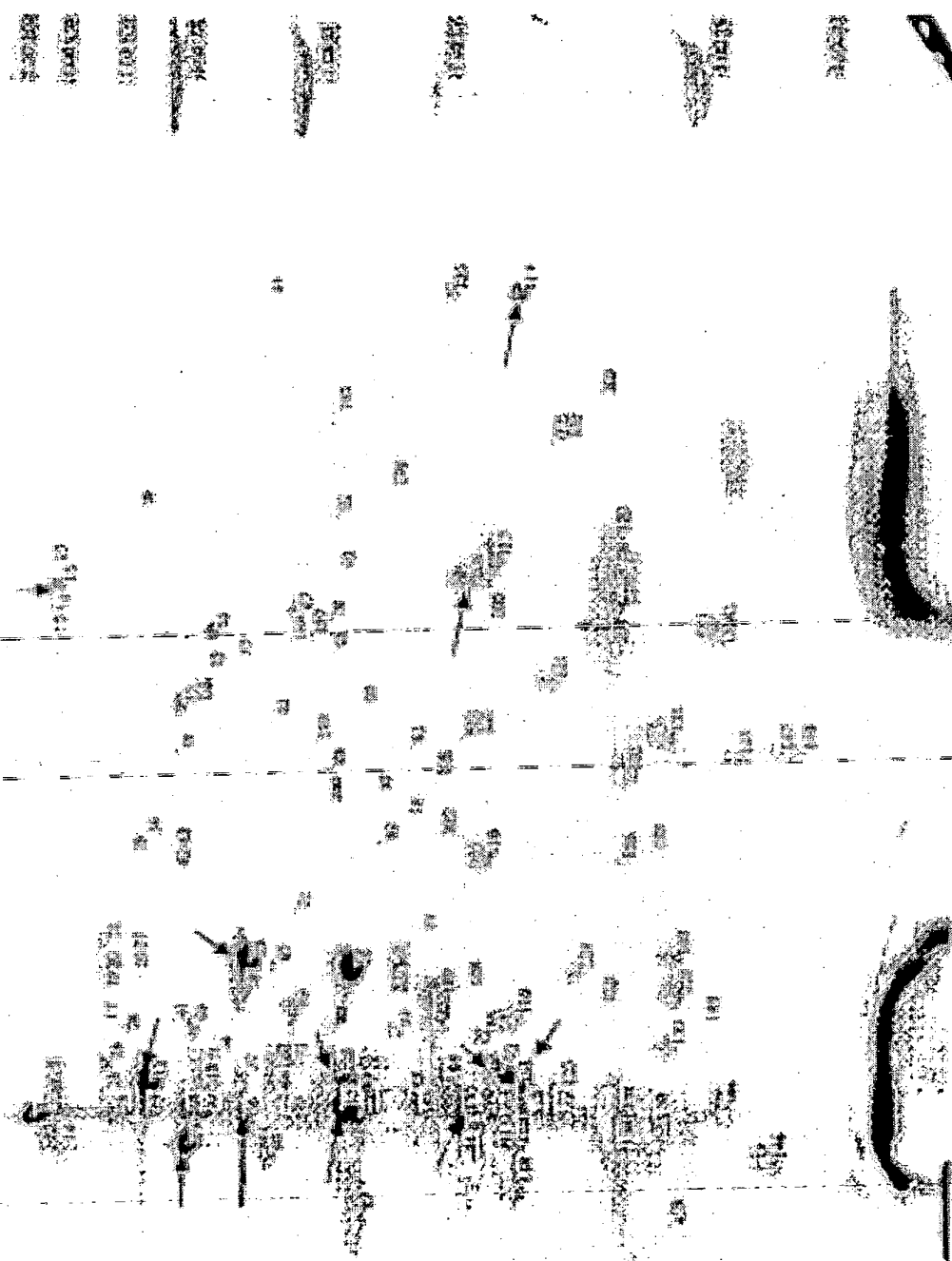


FIGURA 13D

