



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

(11) PI 0103887-7 B1



(22) Data do Depósito: 17/07/2001

(45) Data de Concessão: 22/01/2019

(54) Título: COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS CONTENDO MICROESFERAS BIODEGRADÁVEIS ENCAPSULANDO ANTÍGENOS, VETORES GÊNICOS E ADJUVANTES

(51) Int.Cl.: A61K 39/04; A61P 37/04; A61P 31/06.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP.

(72) Inventor(es): JOSÉ MACIEL RODRIGUES JÚNIOR; CÉLIO LOPES SILVA; KARLA DE MELO LIMA.

(57) Resumo: "COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS CONTENDO MICROESFERAS BIODEGRADÁVEIS ENCAPSULANDO ANTÍGENOS, VETORES GÊNICOS E ADJUVANTES". A presente invenção diz respeito a composições capazes de estimular uma resposta imune em um hospedeiro inoculado com um antígeno de interesse ou o vetor gênico que o codifica, onde dita composição compreende microesferas baseadas em copolímeros derivados do ácido lático e do ácido glicólico encapsulando antígenos, vetores gênicos e/ou adjuvantes estimuladores da resposta imune obtidos de frações de micobactérias. Uma concretização da presente invenção é o uso do dimicolato de trealose associado a uma proteína de choque térmico ou ao plasmídeo contendo o gene que a codifica encapsulados em microesferas com um tamanho de partícula inferior a 10 109nm, capaz de induzir a secreção de citocinas implicadas na proteção de doenças infecciosas, após administração de uma única dose ou várias doses.

RELATÓRIO DESCRITIVO DE PATENTE DE INVENÇÃO: "COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS CONTENDO MICROESFERAS BIODEGRADÁVEIS ENCAPSULANDO ANTÍGENOS, VETORES GÊNICOS E ADJUVANTES".

A presente invenção diz respeito a processos de
5 produção de composições capazes de estimular uma resposta imune específica, celular e/ou humoral, em um hospedeiro imunizado com um antígeno ou um vetor gênico que expressa o antígeno de interesse, onde dita composição compreende microesferas biodegradáveis baseadas em co-polímeros
10 derivados de poliésteres capazes de encapsular e controlar a liberação de antígenos, vetores plasmidiais gênicos e adjuvantes estimuladores de mediadores da resposta imune.

É conhecido que uma classe de compostos compreendendo 6-mono e 6,6 diésteres α,α -D-trealose, entre os quais o
15 grupo éster que contém de 30 a 90 átomos de carbono, conhecidos como monomicolato de trealose e dimicolato de trealose, respectivamente, são capazes de promover o recrutamento de células apresentadoras de antígenos e a indução de citocinas sendo, portanto, potentes candidatos
20 para uso como adjuvante em vacinas e imunoterapia. Para fins da presente invenção, o termo adjuvante refere-se a uma substância que por si só não compartilha epitopos imunes com o antígeno de interesse, mas é capaz de estimular a resposta imune para o antígeno de interesse.

A patente US 4,340,588 descreve o uso do dimicolato de trealose como adjuvante em uma composição vacinal contendo antígenos de *Brucella abortus* (BA, cepa 45/20). Nesta composição, misturas naturais impuras de dimicolato de trealose são obtidas a partir de diversas fontes e
25 denominadas de "fator corda". Normalmente, estes fatores compreendem 90% de dimicolato e 10% de monomicolato, além de uma pequena quantidade de material exógeno, que após purificação cromatográfica adequada contém de 95 a 99% de
30

dimicolato de trealose.

A administração de vacinas contendo material antigênico e dimicolato de trealose em uma emulsão óleo em água levou a uma redução significativa da infecção, quando comparadas ao uso de uma composição baseada apenas em antígenos solúveis obtidos da cepa 45/20 de BA. Neste estudo o extrato foi administrado misturado com óleo sob a forma de uma emulsão. Se por um lado é justificada a importância da fase oleosa como veículo dos extratos provenientes da parede celular de micobactérias com o objetivo de estimular uma resposta imune adequada, por outro, é reconhecido que a presença do óleo utilizado potencializa severas reações indesejáveis no sítio de administração, podendo ainda causar o surgimento de granulomas.

Na tentativa de superar os problemas existentes pela presença de óleo nas preparações com atividade imunogênica foi proposto o uso de suspensões aquosas contendo fração insolúvel da parede celular de micobactéria (US 5,759,554). As suspensões aquosas são preparadas a partir das seguintes etapas: (i) ruptura da bactéria e, posterior centrifugação; (ii) desproteinização da fração baseada na parede celular (debris celulares obtidos da etapa de centrifugação) pelo emprego de enzimas proteolíticas; (iii) tratamento da fração resultante da etapa (ii) com detergentes e lavagem da mesma, (iv) liofilização e (v) suspensão da fração liofilizada em uma solução aquosa como, por exemplo, uma solução salina. Por essa invenção, a estimulação do sistema imune obtida pelo emprego da suspensão à base de frações de micobactérias é capaz de permitir que o organismo humano ou animal neutralize um agente infeccioso ou retarde o crescimento de células cancerígenas. No entanto, este procedimento não permite

uma liberação controlada do adjuvante que resulte em otimização da resposta imune.

- Processos que permitam a vetorização do antígeno, vetores gênicos e/ou adjuvante também têm sido relatados na literatura como é o caso da patente US 5,643,605. Neste invento é descrito o uso de adjuvantes e/ou antígenos microencapsulados para fins terapêuticos ou profiláticos. A composição reivindicada na patente US 5,643,605 compreende microesferas de PLGA (D-L-lactideo-co-glicolideo) de diâmetro variando entre 20 a 100 μm encapsulando imunoadjuvantes tais como uma saponina (QS21) ou muramildipeptídeo (MDP), capazes de estimular uma resposta imune onde: (i) o volume do adjuvante aquoso incorporado no polímero é igual ou inferior a 1 mL por 3 gramas de polímero; (ii) a relação entre monômeros de ácido lático e glicólico é da ordem de 100:0 a 0:100; (iii) a viscosidade inerente dos polímeros PLGA usados na microesfera é de 0,1 a 1,2 dL/g; (iv) o diâmetro das microesferas varia de 20 a 100 μm e (v) o adjuvante é liberado das microesferas de acordo com um modelo trifásico caracterizado pelo fato de, durante a primeira fase, menos de 30% do adjuvante ser liberado em um período de 1 dia; durante a segunda fase menos de 10% do adjuvante ser liberado após um período de 1 dia o qual varia entre aproximadamente 30 e 200 dias e; posteriormente, uma terceira fase onde o restante do adjuvante é liberado após este período das fases precedentes. Entretanto, é importante relatar que, nesse caso, o diâmetro das microesferas apresentado nesta patente varia entre 20 e 100 μm , dificultando a indução da resposta imune quando utilizadas algumas vias de administração como as vias oral e pulmonar. Para administração por estas vias o diâmetro

ideal deve estar compreendido entre 1 e 10 μm , que, de acordo com a literatura é também a faixa ideal para administração pela via subcutânea. Nesta invenção a saponina foi dissolvida em solução de etanol e adicionada

5 na fase polimérica e, em outra formulação, o MDP foi dissolvido em uma fase aquosa que foi adicionada à fase polimérica. Em ambas as preparações a fase contendo o adjuvante corresponde à fase aquosa interna do método de preparo. No entanto, este procedimento não permite a

10 adição de adjuvantes solúveis em solventes apolares.

Muitas composições vacinais empregam adjuvantes com o objetivo de otimizar uma resposta imune quando administrados juntamente com o antígeno, principalmente em vacinas de subunidades. Na última década, os avanços no

15 desenvolvimento de vacinas permitiram a introdução de novas estratégias para a obtenção e produção de antígenos, assim como foram desenvolvidas novas maneiras de se administrar e apresentar esses antígenos para as células do sistema imune. Estas estratégias abriram caminho para

20 inovações, particularmente no contexto do desenvolvimento de vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes. Dentro deste contexto, as vacinas de DNA surgiram como uma alternativa interessante para o desencadeamento de proteção, especialmente quando a resposta imune celular é

25 requerida.

A patente US 6,048,551 descreve um método de preparo de microesferas contendo vetores gênicos virais destinados ao tratamento de tumores. Nesse invento foi utilizado o método de emulsão múltipla onde o vetor gênico dissolvido

30 em uma fase aquosa é encapsulado em associação ou não de drogas antivirais, também dissolvidas na fase aquosa. O diâmetro das partículas varia entre 1 e 200 μm .

Até o momento não foi descrito um método que permita

a co-encapsulação de um antígeno ou um vetor gênico e um imunoadjuvante na mesma preparação de microesferas biodegradáveis preparadas a partir de polímeros de PLGA. Dessa forma, apesar dos esforços que vêm sendo feitos no sentido de oferecer composições de liberação controlada como sistemas de vetorização de antígenos, contendo ou não uma molécula co-adjuvante capaz de otimizar a resposta imune, o estado da técnica ainda continua carente de um sistema de vetorização passiva para células fagocitárias constituído de microesferas, com um determinado diâmetro de partícula adequado para que se possa administrar por diferentes vias e permita o seu direcionamento para populações celulares específicas.

Uma justificativa importante para o desenvolvimento de tal sistema refere-se à necessidade de uma vacina efetiva contra a tuberculose.

A presente invenção apresenta uma composição imunogênica compreendendo, pelo menos, adjuvante e/ou proteínas; e/ou plasmídeos contendo genes capazes de expressar proteínas, encapsulado(s) em microesferas poliméricas com um diâmetro de partícula inferior a 20 μm , preferencialmente com um tamanho entre 1 a 10 μm . Portanto, a composição pode compreender além do adjuvante um antígeno ou um vetor gênico que o codifica, sendo preferencialmente antígenos de parasitas e agentes patogênicos, incluindo antígenos de bactérias intra e extracelulares, de organismos eucariotos como leveduras e fungos, de protozoários, dentre outros. Os adjuvantes são, preferencialmente, aqueles estimuladores da produção de citocinas. Mais preferencialmente pode ser encapsulado em microesferas preparadas a partir de polímeros de ácido lático e co-polímeros de ácido lático e glicólico (relação variando entre 100:0 e 0:100) o plasmídeo que codifica o

gene de proteínas de *Mycobacterium* como, por exemplo, o gene da hsp65 (proteína de choque térmico de 65 kDa de *M. leprae*) ou, ainda, pode ser encapsulada a própria proteína recombinante ou purificada. Ainda mais particularmente, 5 pode ser encapsulado o dimicolato de trealose em microesferas de PLGA. Esse sistema contendo dimicolato de trealose e/ou plasmídeo contendo o gene da proteína hsp65 ou ainda, a própria proteína pode ser utilizado como 10 carreador de vacina contra tuberculose. O referido sistema pode ainda ser aplicado na terapia da tuberculose, quando a doença já se apresenta instalada no indivíduo.

A microencapsulação de um vetor gênico, antígeno e/ou do adjuvante de acordo com o procedimento da presente invenção pode ser obtida de acordo com os seguintes 15 protocolos:

Protocolo A: (i) dissolução do material polimérico composto por derivados do ácido lático e ácido glicólico (relação em peso% de 100:0 a 0:100) em um solvente orgânico, imiscível ou parcialmente imiscível em água em 20 uma concentração variando entre 0,2 a 10% como, por exemplo, em cloreto de metileno, acetato de etila, clorofórmio, dentre outros, (ii) solubilização do antígeno e/ou adjuvante de natureza lipofílica nesta solução (i) contendo o polímero, (iii) adição da solução obtida em 25 (ii) em uma fase aquosa formada por uma solução de um poliol, por exemplo, álcool polivinílico (1 a 10%), objetivando formar uma emulsão óleo em água, (iv) agitação da emulsão a uma velocidade apropriada (200 a 1000 rpm) de forma a permitir a geração de pequenas microesferas com 30 diâmetro médio inferior a 10 μm , preferencialmente em torno de 1 a 5 μm e (v) eliminação do solvente sob agitação, que pode ser feita com auxílio de co-solventes ou com auxílio de um sistema de evaporação sob vácuo ou

outro método qualquer que permita a eliminação do solvente sem prejudicar a estabilidade do sistema, e obtenção da suspensão de microesferas que será, opcionalmente, separada por centrifugação ou filtração, lavadas com o auxílio de um solvente aquoso e finalmente, liofilizada.

Protocolo B: (i) dissolução do material polimérico composto por derivados do ácido láctico e ácido glicólico (relação em peso% de 100:0 a 0:100) em um solvente orgânico em uma concentração variando entre 0,2 a 10% como, por exemplo, cloreto de metileno, acetato de etila, clorofórmio, dentre outros, (ii) solubilização do vetor gênico, antígeno e/ou adjuvante de natureza hidrofílica em uma fase aquosa com o volume variando entre 0,1 a 1 mL, (iii) injeção da solução obtida em (ii) na solução polimérica obtida em (i) homogeneizada a uma rotação variando entre 500 a 15.000 rpm, levando à formação de emulsão (ou dispersão) água em óleo, (iv) adição desta emulsão (ou dispersão) primária, após a homogeneização por período de tempo adequado (1 a 10 minutos), a uma fase aquosa emulsificante, tipicamente formada por uma solução de um poliol, por exemplo, álcool polivinílico (1 a 10%), objetivando formar uma segunda emulsão do tipo água/óleo/água (v) agitação da emulsão múltipla obtida em (iv) a uma velocidade apropriada para evaporação do solvente orgânico (100 a 1000 rpm) de forma a permitir a geração de pequenas microesferas com diâmetro médio inferior a 10 μm , preferencialmente em torno de 1 a 5 μm que serão, opcionalmente, separadas por centrifugação ou filtração, lavadas com o auxílio de um solvente aquoso e finalmente, liofilizadas. É importante mencionar que outros métodos de conhecimento daqueles versados na matéria podem ser empregados para a obtenção das microesferas encapsulando antígenos e/ou adjuvantes da

presente invenção.

A presente invenção é descrita detalhadamente através dos exemplos apresentados abaixo:

Exemplo 1 - Preparo do Dimicolato de Trealose

- 5 100 gramas da cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv são repetidamente maceradas em uma mistura de clorofórmio-metanol (1:1, vol/vol). Posteriormente, o material residual extraído (18 g) é fracionado conforme anteriormente relatado para a purificação do dimicolato de trealose (Silva, C. L., S. M. Ekizlerian, and R. A. Fazioli. 1985. Role of cord factor in the modulation of infection caused by *Mycobacteria*. Am. J. Pathol. 118:238-247). O glicolipídio purificado (0,530 g) migra como uma
- 10 banda única quando submetido à cromatografia em camada delgada, similarmente ao produto disponível comercialmente (SIGMA, St. Louis, USA).
- 15

Exemplo 2 -Preparo e caracterização de microesferas contendo dimicolato de trealose

- 20 As microesferas são preparadas usando a técnica de emulsão/evaporação do solvente (Lewis, D. H. 1990. Controlled release of bioactive agents from lactide/glicolide polymers. In Chasin M & Langer R. Biodegradable polymers as drug delivery systems. Marcel Dekker, New York, 1-43). 5 mg de dimicolato de trealose
- 25 (SIGMA) e 125 mg do polímero biodegradável PLGA (50:50) (Resomer RG 505, MW 78,000, Boehringer Ingelheim, Germany) foram diluídos em 30 ml de cloreto de metileno. Essa fase orgânica é misturada com 100 ml de uma fase aquosa contendo 3% de álcool poli-vinílico (Mowiol® 40-88, SIGMA
- 30 Aldrich Chemicals) como tensoativo, com vistas a permitir a formação de uma emulsão óleo em água estável. Para permitir a evaporação do solvente orgânico é conduzida uma agitação mecânica a 800 rpm, durante um período de 6

horas, à temperatura ambiente. As microesferas são coletadas por centrifugação a 10.000 x g, lavadas três vezes com água estéril, liofilizadas e armazenadas a 4°C. A presença de dimicolato de trealose é determinada por cromatografia em camada delgada após dissolução das partículas em cloreto de metileno. A distribuição de diâmetro das partículas foi determinada por difratometria laser utilizando o CILAS 1064 Liquid apparatus (Cilas, France) apresentando diâmetro médio entre 1 e 5 µm. Os resultados foram expressos como valores cumulativos de % sob determinado diâmetro. Microesferas de PLGA sem adjuvante ou contendo dibehenato de trealose (Sigma, St. Louis, USA) ou o lipídeo controle não relacionado (uma mistura de glicerídeos, Sigma, St. Louis, USA) encapsulado em microesferas de PLGA são preparadas pelo mesmo procedimento e usadas como controle.

EXEMPLO 3 - Preparo do plasmídeo

Bactérias *E. coli* DH5α transformadas com o vetor gênico pCDNA3 ou pCDNA3modificado (pCDNA3m) e com o plasmídeo contendo o gene da hsp65 (pCDNA3-hsp65 ou pCDNA3modificado-hsp65) foram cultivadas em meio LB BROTH BASE (GIBCO BRL, Scotland) contendo ampicilina (SIGMA) na concentração de 100µg/mL. A construção pCDNA3modificado-hsp65 foi derivada do vetor pCDNA3 (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) previamente digerido com Bam H I e Not I (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) pela inserção de um fragmento de 3,3 kb correspondente ao gene da hsp65 de *M. leprae* e ao intron A do CMV (citomegalovírus). O vetor sem o gene da hsp65 foi utilizado como controle. Os plasmídeos foram purificados utilizando resinas de troca iônica (Concert High Purity Maxiprep System, GIBCO BRL). A quantificação dos plasmídeos foi feita por

espectrofotometria em $\lambda = 260$ e 280 nm no aparelho Gene Quant II (Pharmacia Biotech).

EXEMPLO 4 - Preparo da proteína recombinante

E. coli BL21 transformadas com o plasmídeo pIL-161 contendo o gene que codifica a hsp65 de *M. leprae*, foram cultivadas em 500 mL de meio LB BROTH BASE (GIBCO BRL, Scotland) contendo ampicilina (SIGMA) na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e IPTG (Isopropylthio- β -D-Galactoside, GIBCO BRL) 0,1M, a 37°C sob agitação a 200 rpm em um incubadora com agitação por 18 horas. Após incubação, as células foram coletadas por centrifugação a 7.500 rpm por 15 minutos em centrífuga J2HS (Beckman, rotor JS-7.5), ressuspensas em 10 mL de tampão CE (Citrato de sódio 30 mM, EDTA 10 mM, pH 6,1) e rompidas por meio de 3 pulsos de 100 W com duração de 1 minuto utilizando sonda de ultrasom Vibra Cell™ (Sonics & Materials, USA) em banho de gelo. Após centrifugação a 16.500 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 30 mL de tampão UPE (Uréia 6M, EDTA 20mM, fosfato de potássio monobásico 50mM, pH 7,0) e agitado por cerca de 3 minutos em homogeneizador tipo "vortex". A suspensão foi mantida sob agitação suave à temperatura ambiente por 15 minutos e então centrifugada a 16.500 rpm por 20 minutos. Adicionou-se, ao sobrenadante, sulfato de amônio para uma concentração final de 1 M e incubou-se em gelo por 30 minutos. Após centrifugação a 16.500 rpm por 20 minutos, o sedimento foi ressuspenso em 3 mL de PBS e exaustivamente dialisado contra PBS.

EXEMPLO 5 - Preparo da microesfera contendo o plasmídeo ou a proteína recombinante

As microesferas foram obtidas pelo método de emulsão múltipla e evaporação do solvente: a fase aquosa (0,3 mL)

contendo somente o vetor plasmidial que não codifica a proteína hsp65 (pCDNA3 ou PcDNA3modificado); ou o vetor contendo o gene que codifica a proteína hsp65 (pCDNA3-hsp65, pCDNA3modificado-hsp65); ou somente a proteína hsp65 recombinante foi emulsionada em uma solução de 400 mg de PLGA 50:50 (Resomer RG 505 da Boehringer Ingelheim) em 30 mL de cloreto de metileno, sob forte agitação (8000 rpm) com o auxílio de um homogeneizador do tipo Ultraturrax T50 (IKA® - Labortechnik, Germany) para se obter uma emulsão primária água/óleo (A/O). No caso do preparo de microesferas contendo o plasmídeo foram utilizados 4 mg do plasmídeo dissolvidos em 0,3 mL de fase aquosa e; no caso da proteína recombinante 1 mg de proteína em 0,3 mL de fase aquosa. Esta emulsão foi vertida na fase aquosa externa (100 mL), contendo 3% de álcool poli vinílico (Mowiol® 40-88, Aldrich Chemicals) como tensoativo, e homogeneizada a fim de formar a emulsão múltipla água/óleo/água (A/O/A). O solvente orgânico foi eliminado por evaporação à temperatura ambiente sob agitação moderada (300 a 800 rpm) com o auxílio de um homogeneizador Eurostar (IKA® - Labortechnik, Germany) por 6 horas. As microesferas foram coletadas por centrifugação a 10.000 x g em centrífuga Himac CR21 (Hitachi, rotor R20A2), lavadas 3 vezes com água estéril, liofilizadas por 12 horas (liofilizador Edwards) e armazenadas a 4°C. A distribuição de diâmetro das partículas foi determinada por difratometria laser utilizando o CILAS 1064 Liquid apparatus (Cilas, France). Em todos os experimentos, o diâmetro médio das partículas foi em torno de 3 a 5 µm, com população dispersa entre 1 e 10 µm.

EXEMPLO 6 - Preparo de microesferas contendo proteína ou

plasmídeo e dimicolato

As microesferas foram obtidas pelo método da emulsão múltipla e evaporação do solvente: a fase aquosa (0,3 mL) contendo pCDNA3, PcDNA3modificado, pCDNA3-hsp65, pCDNA3modificado-hsp65 ou hsp65 recombinante (4 mg para os plasmídeos e 1 mg para a proteína), foi emulsionada numa solução (fase dispersante) contendo 0,5 mg de dimicolato de trealose e 400 mg de PLGA 50:50 (Resomer RG 505 da Boehringer Ingelheim) em 30 mL de cloreto de metileno, sob forte agitação (8000 rpm) com o auxílio de um homogeneizador do tipo Ultraturrax T50 (IKA® - Labortechnik, Germany) para obter uma emulsão primária água/óleo (A/O). Esta emulsão foi vertida na fase aquosa externa (100 mL), contendo 3% de álcool poli vinílico (Mowiol® 40-88, Aldrich Chemicals) como tensoativo, e homogeneizada a fim de formar a emulsão múltipla água/óleo/água (A/O/A). O solvente orgânico foi eliminado por evaporação à temperatura ambiente sob agitação moderada (300 a 800 rpm) com o auxílio de um homogeneizador Eurostar (IKA® - Labortechnik, Germany) por 6 horas. As microesferas foram coletadas por centrifugação a 10.000 x g em centrífuga Himac CR21 (Hitachi, rotor R20A2), lavadas 3 vezes com água estéril, liofilizadas por 12 horas (liofilizador Edwards) e armazenadas a 4°C. A distribuição de diâmetro das partículas foi determinada por difratometria laser utilizando o CILAS 1064 Liquid apparatus (Cilas, France). Em todos os experimentos, o diâmetro médio das partículas foi em torno de 3 a 5 µm, com população dispersa entre 1 e 10 µm.

Exemplo 7 - Avaliação da expressão de hsp65 em células eucariotas transfectadas com o plasmídeo encapsulado em

microesferas

- Células J774 (macrófagos de linhagem tumoral originários de camundongos BALB/c) e J774-hsp65 (células J774 transfectadas com o vetor retroviral [pZIPNeoSV(x)]
- 5 carreando o gene da hsp65 de *M. leprae*) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (SIGMA) suplementado com 2 % de soro fetal bovino inativado por aquecimento, a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂. 100 µL da suspensão de células (5x10⁵ células) foram adicionados à superfície de
- 10 lamínulas estéreis em placas de 24 poços e incubados por 3 horas para permitir a adesão celular. Após a incubação, 1 mL de meio RPMI, contendo os devidos tratamentos, foi adicionado a cada amostra. Os tratamentos utilizados foram os seguintes:
- 15 A) células J774 receberam 1 mL de meio RPMI servindo como controle negativo da expressão de hsp65;
- B) células J774-hsp65 receberam 1 mL de meio RPMI servindo como controle positivo da expressão de hsp65;
- 20 C) células J774 receberam 1mL de meio RPMI contendo pCDNA3modificado-hsp65 encapsulado em microesferas (10 microesferas/célula). As partículas foram ressuspensas no meio e a concentração da suspensão foi acertada para 5x10⁶ partículas/mL com o auxílio de uma câmara de Neubauer;
- 25 D) células J774 receberam 1 mL de meio RPMI contendo pCDNA3modificado-hsp65 complexado com Lipofectin® (GIBCO BRL).
- Após 24 horas de incubação, os sobrenadantes das culturas foram removidos e repostos com 1 mL de meio RPMI. O meio
- 30 foi substituído a cada 48 horas. Análises de imunocitoquímica foram realizadas 10 e 20 dias após o início do teste.

Para realização da imunocitoquímica, as células foram lavadas por três vezes consecutivas em solução de PBS 0,01 M, pH 7,2 contendo 1 % de soro albumina bovina (BSA) (SIGMA). Em seguida elas foram fixadas em paraformaldeído 4 % por 30 minutos à temperatura ambiente, e novamente lavadas. Todas as lavagens foram realizadas por três vezes consecutivas. Posteriormente, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena pela incubação com PBS contendo 3% de H₂O₂ por 30 minutos à temperatura ambiente. Após as lavagens com PBS-BSA 1%, as células foram incubadas com tampão de bloqueio (3 % de soro de coelho, 1% de BSA e 0.01% de Triton X 100) por 1 hora à temperatura ambiente a fim de se obter o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas. Em seguida, adicionou-se o anticorpo anti-hsp65 e incubou-se em câmara úmida a 4°C durante a noite. O anticorpo monoclonal utilizado foi diluído (1:100) em tampão bloqueio e após o período de incubação realizaram-se as lavagens consecutivas e foi feita a incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à biotina (B-7022, Sigma) diluído (1:200) em tampão bloqueio por 1 hora, à temperatura ambiente. Depois de novas lavagens consecutivas com PBS-BSA 1% as lamínulas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente com o complexo streptoavidina biotina-peroxidase (Streptoavidin-Dako Corporation, CA-USA) preparado 30 minutos antes do uso, em tampão bloqueio. Posteriormente às lavagens consecutivas com PBS-BSA 1%, procedeu-se a revelação da reação utilizando o substrato 3-3'-Diaminobenzidina (SIGMA) (5mg em 10 ml de PBS) adicionado a 180µL de H₂O₂ (20 volumes). A revelação foi feita por 10 a 20 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz. As reações foram interrompidas com água destilada e as lamínulas contracoradas com hematoxilina de Mayer previamente filtrada,

por 5 a 10 minutos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água destilada por duas vezes, azuladas com água amoniacal (solução aquosa de hidróxido de amônio a 0,5%) e, novamente lavadas com água destilada, as

5 lamínulas foram secas à temperatura ambiente e montadas em lâminas com Bálsamo do Canadá. O controle negativo das reações foi realizado por meio da substituição dos anticorpos primários por PBS ou isotipos de imunoglobulinas não relacionados. A documentação da

10 citoquímica foi realizada em microscópio Aristoplan (Leitz), acoplado ao sistema de fotografia MC80DX. Foi demonstrado que o processo de encapsulamento não afeta a funcionalidade do DNA, visto que macrófagos tratados *in vitro* com microesferas contendo pCDNA3modificado-hsp65 são

15 capazes de expressar a proteína.

Exemplo 8 - Imunização e infecção desafio.

Camundongos BALB/c adultos, 6 a 8 semanas de idade, foram obtidos do biotério da Faculdade de Medicina de

Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, e mantidos em

20 condições padrão de laboratório.

Os camundongos foram imunizados com as diversas formulações de microesferas por via intramuscular ou intratraqueal. As doses de microesferas utilizadas

variaram de 100 a 500 mg/kg e os esquemas testados foram

25 de dose única para a via intratraqueal e de dose única ou três doses para a via intramuscular. Os camundongos foram desafiados ou sacrificados, 30 ou 60 dias após o tratamento com as microesferas, sendo feita então a

avaliação da resposta imune.

30 Para infecção desafio, os camundongos receberam, por meio de administração intratraqueal (i.t.), uma dose de 10^5 unidades formadoras de colônia (UFC) de *M. tuberculosis* H37Rv, sob efeito de anestesia usando 200 µl

de tribromoetanol (Sigma), em PBS a 2,5%. Os animais infectados foram mantidos em gaiolas sob condições adequadas de biossegurança. Os animais infectados foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo para

5 caracterização da reação inflamatória nos pulmões e avaliação da proteção contra a infecção.

Exemplo 9 - Avaliação de Citocinas

Os níveis de citocinas produzidas pelas células dos pulmões e baço dos animais inoculados com microesferas foram medidos pela técnica ELISA. O tecido total dos pulmões foi homogeneizado em um dispositivo Ultraturrax T 25 IKA (Labortechnik, Germany) por 5 minutos a 4 °C. Tecido homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante, filtrado com o auxílio de

10 um filtro com membrana de 0,22 µm, foi usado para determinação de citocinas. As células esplênicas foram cultivadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e estimuladas in vitro com concanavalina A como estímulo inespecífico ou hsp65 como estímulo específico. Após 48

15 horas o sobrenadante foi coletado para análise de citocinas. Anticorpos monoclonais de captura e biotinilados para TNF-α (MP6-XT22, MP6-XT3), IL-10 (JES5-2A5, JES5-16E3), IL-6 (MP5-20F3, MP5-32C11), IL-4 (BVD4-1D11, BVD6-24G2), IFN-γ (R4-6A2, XMG1.2) e IL-12

20 (C15.6, C17.8), assim como citocinas recombinantes foram adquiridas da Pharmingen (San Diego, CA). Os níveis de TNF-α, IL-10, IL-6, IL-4, IFN-γ e IL-12 foram determinados nos sobrenadantes pela técnica de ELISA, conforme anteriormente descrito (Haagmans, B. L., A. J.

25 van den Eertwegh, E. Claassen, M. C. Horzinek, and V. E. Schijns. 1994. Tumor necrosis factor-alpha production during cytomegalovirus infection in immunosuppressed

30

rats. J. Gen. Virol. 75:779-787), seguindo instruções do fabricante (Pharmingen, San Diego, CA). Foi construída para cada ensaio uma curva padrão usando preparações com concentrações conhecidas de rTNF- α , rIL-10, rIL-6, rIL-4, rIFN- γ , ou rIL-12 de camundongos. O limite de detecção para todas as citocinas avaliadas foi de 15 pg por mL.

Exemplo 10 - Dosagem de óxido nítrico

10 Células do lavado broncoalveolar recuperadas de camundongos tratados com microesferas carregadas com dimicolato de trealose foram cultivadas em meio RPMI contendo soro bovino fetal a 10% (GIBCO-BRL, Grand Island, NY), Hepes a 10mM, bicarbonato de sódio a 20 mM, penicilina e estreptomicina a 100 μ g/ml (GIBCO-BRL). A
15 detecção da produção de óxido nítrico foi avaliada pela dosagem de nitrito (NO_2^-) no sobrenadante de cultura de células resultantes do lavado broncoalveolar, utilizando-se o método de Greiss (Stuehr, D.J., and C. F. Nathan. 1989. Nitric oxide.

20 A macrophage product responsible for cystostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. J. Exp. Med. 169:1543-1555). Utilizou-se uma diluição seriada de uma solução de nitrito de sódio 200 μ M para a construção da curva padrão.

25 O título foi então determinado a partir dessa curva padrão e tendo como limite de detecção 3 μ M por 10^5 células.

Em todos os experimentos, as formulações, objeto da presente invenção, apresentam características adequadas,
30 ou seja, diâmetro inferior a 10 μ m, para serem capturadas por células fagocíticas promovendo a vetorização passiva do material encapsulado. Fica também comprovado que o

processo de encapsulamento não afeta a funcionalidade do DNA, visto que macrófagos tratados *in vitro* com microesferas contendo pCDNA3modificado-hsp65 são capazes de expressar a proteína.

5 A presente invenção é adicionalmente explicada por meio das tabelas abaixo, nas quais as Tabelas I e II mostram que microesferas contendo a proteína hsp65 recombinante foram capazes de induzir uma resposta imune específica em níveis local e sistêmico após a
10 administração por via intratraqueal. Esta resposta foi avaliada pelos níveis de interferon- γ no sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados (Tabela I) e nos níveis de IL-12 no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c imunizados (Tabela II).

15 Os níveis de interferon-gama (IFN- γ) foram significativos, após estímulo com a proteína recombinante hsp65, somente em camundongos imunizados com hsp65 encapsulada em microesferas.

Camundongos que receberam hsp65 recombinante (r-
20 hsp65) em PBS ou microesferas sem antígeno não produziram níveis significativos de IFN- γ . Os níveis de IFN- γ após estímulo com concanavalina A (ConA) foram usados como controle positivo.

Os níveis de interleucina 12 (IL-12) foram
25 significativos para camundongos tratados com r-hsp65 e r-hsp65 encapsuladas em microesferas.

Este resultado comprova a possibilidade de se administrar as formulações advindas da presente invenção por outras vias além das vias parenterais.

30 TABELA I: Produção de IFN- γ (pg/mL) no sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados - 30 dias após imunização.

Formulações utilizadas na imunização	Estímulos		
	Meio	ConA	Hsp65
r-hsp65 em PBS	140,4 ($\pm 184,45$)	7.264,9 ($\pm 274,8$)	470 ($\pm 32,1$)
r-hsp65 em microesferas	64,7 ($\pm 11,9$)	5.274,8 ($\pm 628,3$)	1.036,6 ($\pm 93,1$)
Microesferas não carregadas	157,3 ($\pm 123,9$)	8.276,1 ($\pm 482,7$)	336,7 ($\pm 47,3$)

TABELA II: Produção de IL-12 (pg/g) no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c imunizados - 30 dias após imunização

Formulações utilizadas na imunização	IL-12 (pg/g de órgão)
r-hsp65 em PBS	17.360,62 ($\pm 893,4$)
r-hsp65 em microesferas	17.827,36 ($\pm 978,6$)
Microesferas não carregadas	6.506,60 ($\pm 843,4$)

Entretanto, após administração por via parenteral, 5 formulações, objeto da presente invenção, também são capazes de desencadear uma resposta imune específica. Como demonstram as Tabelas III, IV e V, a produção de IFN, IL-12 e IL-6 no sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados com uma única dose de 5 10 mg de microesferas/animal por via intramuscular, 60 dias após imunização, as microesferas contendo plasmídeo, objeto da presente invenção, foram capazes de estimular uma resposta imune específica com uma dose reduzida de plasmídeo, se comparada ao processo convencional de 15 vacinação onde o DNA é administrado em solução com 3 doses, conforme relatam a invenção descrita na patente WO95/31216 e os trabalhos de Silva e colaboradores (Lowrie et al., Nature 400:269-271, 1999). Uma única dose de 5 mg

de microesferas (contendo 30 µg de plasmídeo) foi capaz de induzir uma resposta imune comparável à administração de 3 doses de 100 µg de plasmídeo não encapsulado. Este resultado demonstra um avanço alcançado pela presente invenção no que diz respeito à redução da quantidade de material utilizado para induzir uma resposta imune significativa, reduzindo o número de injeções necessárias.

5 TABELA III: Produção de IFN (ng/mL) no sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados com plasmídeo e r-hsp65 em microesferas por via IM - 60 dias após imunização.

Formulações utilizadas na imunização	Estímulos		
	Meio	ConA	hsp65
pCDNA3m em microesferas	2,94 (±0,82)	125,07 (±7,78)	3,71 (±1,14)
pCDNA3m-hsp65 em microesferas	2,41 (±0,31)	239,92 (±12,79)	24,95 (± 1,24)
r-hsp65 em microesferas	2,75 (±0,15)	138,47 (±13,15)	5,21 (±0,28)

15 Tabela IV: Produção de IL-12 (pg/mL) no sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados com plasmídeo e r-hsp65 em microesferas por via IM - 60 dias após imunização.

Formulações utilizadas na imunização	Estímulos	
	Meio	hsp65
pCDNA3m em microesferas	699,67 (±83,15)	735,67 (±217,68)
pCDNA3m-hsp65 em microesferas	1.053,30 (±234,42)	1.920,67 (± 320,20)
r-hsp65 em microesferas	719,67 (±129,31)	856,01 (±44,23)

Tabela V: Produção de IL-6 (pg/mL) no sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados com plasmídeo e r-hsp65 em microesferas por via IM - 60 dias após imunização.

Formulações utilizadas na imunização	Estímulos		
	Meio	ConA	hsp65
pCDNA3m em microesferas	364,83 ($\pm 25,7$)	5.242,79 ($\pm 705,4$)	1.816,03 ($\pm 1.490,5$)
pCDNA3m-hsp65 em microesferas	565,67 ($\pm 83,8$)	4.309,89 ($\pm 359,1$)	3.730,44 ($\pm 703,5$)
r-hsp65 em microesferas	494,40 ($\pm 148,4$)	5.178,01 ($\pm 815,7$)	7.436,17 ($\pm 281,0$)

5 Em relação à capacidade imunomodulatória de microesferas contendo DMT, as Tabelas VI e VII demonstram que, após administração intratraqueal, a formulação obtida segundo a presente invenção foi capaz de estimular a produção de várias citocinas pelas células pulmonares bem
10 como de ativar macrófagos alveolares como determinado pela produção de óxido nítrico.

A Tabela VI ilustra os resultados da avaliação da produção de citocinas pelas células pulmonares de camundongos inoculados com microesferas contendo DMT, e
15 controles (salina tamponada-PBS, lipofectin LipCT e dibehenato trealose-DBT). Os animais foram inoculados pela via intratraqueal e após 60 dias os pulmões foram homogeneizados e as citocinas quantificadas no homogenato do pulmão por ELISA. Os dados são representativos de um
20 experimento reproduzido três vezes.

Tabela VI: Produção de citocinas no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados por via intratraqueal, 60 dias após tratamento

Tratamen- to	Citocinas (pg/mL)					
	IFN- γ	IL-12	IL-10	IL-6	IL-4	TNF- α
PBS	9.720 (± 841)	13.125 (± 2.203)	22.835 (± 10.801)	7.783 (± 1.412)	49.684 (± 22.788)	2.804 (± 418)
Lipídio controle em micro- esferas	8.920 (± 421)	11.880 (± 346)	23.935 (± 2.744)	9.624 (± 707)	43.342 (± 5.764)	3.548 (± 724)
DBT em micro- esferas	9.680 (± 950)	15.915 (± 2.034)	27.591 (± 4.138)	11.985 (± 1.758)	60.688 (± 13.261)	3.659 (± 412)
DMT em micro- esferas	19.200 (± 4.111)	26.577 (± 2.361)	47.163 (± 3.707)	17.781 (± 2.726)	111.504 (± 1.786)	5.855 (± 287)

34

A Tabela VII ilustra os resultados da avaliação da produção de óxido nítrico pelas células do lavado broncoalveolar de camundongos inoculados com microesferas contendo DMT e grupos controle (meio de cultura-meio, lipofectin LipCT, dibehenato trealose-DBT e microesferas sem adjuvante-Br). Aproximadamente 10^5 células totais do lavado broncoalveolar foram obtidas em cada experimento e colocadas em cultura por 24 horas a 37°C com 5% de CO_2 . Posteriormente, os sobrenadantes das culturas foram coletados e avaliadas as concentrações de nitrito pelo método colorimétrico de Greiss. A análise estatística pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's mostrou valores significativos entre os tratamentos com DMT em função do meio (* $p < 0.01$) e DBT em função do meio (* $p < 0.01$). Os dados são representativos de um experimento reproduzido três vezes.

Tabela VII: Avaliação dos níveis de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de células do lavado broncoalveolar de camundongos BALB/c tratados por via intratraqueal.

Tratamento	Concentração (μM) de NO_2 por 10^5 células
Meio de cultura	0,455 ($\pm 0,63$)
Microesferas não carregadas	0,045 ($\pm 0,05$)
Lipídio controle em microesferas	0,045 ($\pm 0,05$)
DBT em microesferas	6,5 ($\pm 0,28$)
DMT em microesferas	8,6 ($\pm 1,41$)

As Tabelas VIII, IX e X ilustram os níveis de citocinas produzidos no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c desafiados com *M. tuberculosis* H37Rv após administração de microesferas contendo o plasmídeo mais o co-adjuvante dimicolato de trealose e controles.

Tabela VIII: Produção de IL-10 (pg/mL) no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com *M. tuberculosis*

Formulações utilizadas na imunização	IL-10 (pg/g de órgão)
Não imunizados	4.799,15 ($\pm 1.503,7$)
Microesferas não carregadas	3.525,32 ($\pm 2.594,4$)
DMT em Microesferas	2.428,69 ($\pm 706,8$)
pCDNA3m e DMT em Microesferas	4.654,18 ($\pm 300,9$)
pCDNA3m-hsp65 e DMT em Microesferas	14.25,30 ($\pm 6.580,9$)

Tabela IX: Produção de IL-12 (pg/mL) no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com *M. tuberculosis*

Formulações utilizadas na imunização	IL-12 (pg/g de órgão)
Não imunizados	25.817,28 ($\pm 3.286,2$)
Microesferas não carregadas	26.945,16 ($\pm 2.346,0$)
DMT em Microesferas	15.852,67 ($\pm 1.002,4$)
pCDNA3m e DMT em Microesferas	27.269,74 ($\pm 1.610,9$)
pCDNA3m-hsp65 e DMT em Microesferas	36.825,70 ($\pm 662,0$)

Tabela X: Produção de IFN- γ (pg/mL) no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com

M. tuberculosis.

Formulações utilizadas na imunização	IFN- γ (pg/g de órgão)
Não imunizados	2.711,34 ($\pm$ 1.225,8)
Microesferas não carregadas	2.422,64 ($\pm$ 2.077,9)
DMT em Microesferas	1.728,51 ($\pm$ 363,9)
PCDNA3m e DMT em Microesferas	1.411,67 ($\pm$ 758,9)
pCDNA3m-hsp65 e DMT em Microesferas	7.775,13 ($\pm$ 2.855,2)

As Tabelas XI e XII ilustram os níveis de diferentes isotipos de anticorpos no soro de camundongos BALB/c imunizados com microesferas contendo o plasmídeo mais o co-adjuvante dimicolato de trealose e controles, antes e após infecção desafio com *M. tuberculosis* H37Rv.

TABELA XI: Avaliação da produção de anticorpos no soro de camundongos BALB/c imunizados por via intramuscular com microesferas contendo plasmídeo mais o co-adjuvante dimicolato de trealose 60 dias após imunização

Formulações utilizadas na imunização	Título (Log 2)		
	IgG	IgG1	IgG2a
Não imunizados	1,90 ($\pm$ 0,13)	0,64 ($\pm$ 0,04)	0,91 ($\pm$ 0,22)
Microesferas não carregadas	2,56 ($\pm$ 0,17)	0,84 ($\pm$ 0,04)	1,63 ($\pm$ 0,19)
DMT em Microesferas	2,25 ($\pm$ 0,34)	1,11 ($\pm$ 0,35)	1,21 ($\pm$ 0,03)
PCDNA3m e DMT em Microesferas	3,23 ($\pm$ 0,39)	2,99 ($\pm$ 0,47)	2,64 ($\pm$ 0,14)
pCDNA3m-hsp65 e DMT em Microesferas	8,95 ($\pm$ 0,10)	2,61 ($\pm$ 0,07)	10,15 ($\pm$ 0,04)

TABELA XII: Avaliação da produção de anticorpos no soro de

camundongos BALB/c imunizados por via intramuscular com microesferas contendo plasmídeo mais o co-adjuvante dimicolato de trealose e desafiados com *M. tuberculosis* H37Rv por via intratraqueal.

Formulações utilizadas na imunização	Título (Log 2)		
	IgG	IgG1	IgG2a
Não imunizados	1,90 (± 0,13)	0,64 (± 0,04)	0,91 (± 0,22)
Microesferas não carregadas	2,56 (± 0,17)	0,84 (± 0,04)	1,63 (± 0,19)
DMT em Microesferas	2,25 (± 0,34)	1,11 (± 0,35)	1,21 (± 0,03)
pCDNA3m e DMT em Microesferas	3,23 (± 0,39)	2,99 (± 0,47)	2,64 (± 0,14)
pCDNA3m-hsp65 e DMT em Microesferas	8,95 (± 0,10)	2,61 (± 0,07)	10,15 (± 0,04)

- 1 - Composição farmacêutica **caracterizada por** compreender a proteína de choque térmico de 65 kDa de *Mycobacterium leprae* ou um vetor gênico, plasmídeo, contendo o gene que codifica a proteína de choque
- 5 térmico de 65 kDa de *Mycobacterium leprae*; e o adjuvante dimicolato de trealose; encapsulados em microesferas biodegradáveis.
- 2 - Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pela** proteína poder ser
- 10 recombinante ou purificada.
- 3 - Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** ser administrada pelas vias aéreas superiores (intratraqueal, pulmonar e nasal), oral e parenteral.
- 15 4 - Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelas** microesferas biodegradáveis serem uma composição polimérica consistindo essencialmente de polímeros do ácido láctico e co-polímeros do ácido láctico e glicólico.
- 20 5 - Composição farmacêutica, de acordo com as reivindicações 1 e 4, **caracterizada pelas** microesferas apresentarem diâmetro médio variando de 1 a 20 µm.
- 6 - Método de obtenção da composição farmacêutica descrita nas reivindicações 1 a 5 **caracterizado por** na
- 25 primeira etapa do processo o antígeno ou vetor gênico serem adicionados à fase aquosa da emulsão primária e o adjuvante ser adicionado à fase orgânica contendo o polímero para formar a emulsão primária contendo esta emulsão antígeno ou vetor gênico e adjuvante.