

(11) Número de Publicação: **PT 1154793 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 39/39 (2007.10) **A61K 39/145** (2007.10)
A61K 9/00 (2007.10) **A61K 9/16** (2007.10)
A61P 31/16 (2007.10)

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

(22) Data de pedido: **1999.05.28**

(30) Prioridade(s): **1999.02.26 US 122172 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2001.11.21**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.09.15**
244/2010

(73) Titular(es):
NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS INC.
4560 HORTON STREET, EMERYVILLE,
CALIFORNIA 94608 **US**

(72) Inventor(es):
MANMOHAN SINGH **US**
DEREK O'HAGAN **US**

(74) Mandatário:
FRANCISCO NOVAES CUNHA BRITO SOTO MAIOR DE
ATAYDE
AV. DUQUE D'AVILA, N.º 32, 1º ANDAR 1000-141 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE BIOADESIVOS E ADJUVANTES PARA A ADMINISTRAÇÃO DE ANTIGÉNIOS NAS MUCOSAS**

(57) Resumo:

ESTA INVENÇÃO REFERE-SE A COMPOSIÇÕES QUE INCLUEM BIOADESIVOS EM COMBINAÇÃO COM ADJUVANTES E ANTIGÉNIOS PARA A ADMINISTRAÇÃO NAS MUCOSAS. SÃO TAMBÉM FORNECIDOS MÉTODOS DE FABRICO DAS COMPOSIÇÕES, BEM ASSIM COMO MÉTODOS DE IMUNIZAÇÃO QUE UTILIZAM AS MESMAS.

RESUMO

EPÍGRAFE:	<u>"UTILIZAÇÃO DE BIOADESIVOS E ADJUVANTES PARA A ADMINISTRAÇÃO DE ANTIGÉNIOS NAS MUCOSAS"</u>
-----------	---

Esta invenção refere-se a composições que incluem bioadesivos em combinação com adjuvantes e antigénios para a administração nas mucosas. São também fornecidos métodos de fabrico das composições, bem assim como métodos de imunização que utilizam as mesmas.

DESCRIÇÃO

EPÍGRAFE:	"UTILIZAÇÃO DE BIOADESIVOS E ADJUVANTES PARA A ADMINISTRAÇÃO DE ANTIGÉNIOS NAS MUCOSAS"
-----------	--

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção relaciona-se no geral com sistemas de polímero bioadesivo. Em particular, a invenção relaciona-se com o uso de bioadesivos e adjuvantes para distribuição de antígenos nas mucosas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A imunidade das mucosas fornece um importante mecanismo de defesa contra uma grande variedade de patogénicos. Para tal, as superfícies das mucosas do tracto gastrointestinal, respiratório e genito-urinário estão continuamente expostos a antígenos estranhos, incluindo bactérias, vírus e, por vezes, organismos parasitas potencialmente infecciosos. As respostas imunes das mucosas protegem contra tais desafios e têm características distintas e especializadas.

Por exemplo, a principal imunoglobulina produzida pelo sistema imune das mucosas é IgA secretora. As células de obtenção do antígeno especializado em Placas de Peyer do tracto intestinal ou tecidos linfóides nasofaríngeos, denominadas células M ou microdobras, transportam o antígeno para subcamada das mucosas associadas aos tecidos linfóides (MALT). Noutras áreas do epitélio das mucosas, tal como o epitélio pseudo-estratificado das vias respiratórias, as células dendríticas servem como células que exibem antígeno e migram para os nódulos linfáticos locais ou MALT. A

apresentação e processamento do antígeno ocorrem no MALT, o que resulta na activação das células IgA B específicas para o antígeno. O trânsito e recirculação subsequente das células IgA-B activadas para outros componentes do sistema imune das mucosas, por exemplo, o tracto respiratório, intestinal e genital, fornecem, para mucosas locais disseminadas, respostas IgA através de todo o "Sistema das Mucosas Comum." Assim, o sistema imune das mucosas é, de modo único, adequado para responder aos tipos de desafios antigénicos encontrados nas superfícies das mucosas, e podem fornecer o tipo mais eficaz de resposta imune contra patogénicos particulares. Assim, os mecanismos de distribuição de antígeno que atinge o sistema imune das mucosas fornecem um meio atractivo para alcançar a imunidade.

Têm sido feitas tentativas para usar polímeros bioadesivos para a distribuição de fármacos. Os bioadesivos são materiais sintéticos e que ocorrem naturalmente capazes de aderir a substratos biológicos durante períodos de tempo prolongados. Os mucoadesivos são um subtipo de bioadesivos que são susceptíveis de aderir às mucosas. Como um exemplo não limitante de mucoadesivos, Carbopol e polycarbofil, dois derivados sintéticos de ligação cruzada de poli (ácido acrílico), que apresenta excelentes propriedades de adesão *in vitro*. Outros mucoadesivos naturais são o ácido hialurónico, também conhecido como hialuronano. O ácido hialurónico tem sido apresentado como sendo mucoadesivo, quer *in vivo* quer *in vitro*. Consultar, por exemplo, Cortivo et al., Biomaterials, 1991, 12:727-730; Publicação Europeia No. 517,565; WO 96/29998. No entanto, alguns bioadesivos podem causar irritação local. Por isso, poucos sistemas de distribuição bioadesivos estão comercialmente disponíveis.

A WO 94/20070 relaciona-se com mucoadesivos poliméricos na distribuição de imunogénicos em superfícies de mucosas, e com

composições que compreendem um antigénio e um mucoadesivo e, opcionalmente, um adjuvante.

A WO 95/17211 relaciona-se com um adjuvante de mucosas não tóxico que pode ser misturado com mais antigénios para fornecer uma vacina administrável em superfícies de mucosas, em que o adjuvante é preferivelmente uma toxina bacteriana destoxificada mutante ADP-ribosilada.

A WO 98/42375 relaciona-se com adjuvantes parentéricos que compreendem mutantes destoxificados de toxinas bacterianas ADP-ribosiladas, particularmente aquelas a partir de pertussis (PT), cholera (CT), e E. coli instável ao calor (LT).

No entanto, o uso de bioadesivos, incluindo mucoadesivos, e adjuvantes para distribuir os "antigénios" da vacina, como aqui definido, ainda não foi descrito.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

São aqui reveladas composições para utilização num método eficaz para provocar uma resposta imune num sujeito mamífero utilizando as técnicas de imunização da mucosa e de distribuição por bioadesivos.

A presente invenção baseia-se na descoberta de que a distribuição nas mucosas de bioadesivos, incluindo os derivados de mucoadesivos e um adjuvante, em combinação com um antigénio de interesse, actua para aumentar a imunogenicidade do antigénio assim co-administrado. Embora não desejando ficar ligado apenas a uma determinada teoria, acredita-se que as propriedades bioadesivas dos bioadesivos fazem diminuir a taxa de libertação do antigénio, permitindo assim um tempo de contacto mais prolongado entre o antigénio e a membrana absorvente. Adicionalmente, pode ocorrer um espaçamento transitório nas junções apertadas das células do epitélio da mucosa, permitindo um transporte mais eficiente do antigénio de interesse. A utilização de bioadesivos e adjuvantes

proporciona uma abordagem segura e eficaz para o aumento da imunogenicidade de um gama alargada de antigénios.

Desse modo, numa modalidade, a invenção é orientada para uma composição como definido na reivindicação 1, compreendendo (incluindo) pelo menos um bioadesivo, pelo menos um adjuvante e, pelo menos, um antigénio seleccionado. O antigénio e o adjuvante poderão estar presentes, cada um deles, em doses desde aproximadamente 1% até 40% (m/m) de antigénio ou adjuvante para o bioadesivo. O bioadesivo é um mucoadesivo em que o mucoadesivo é seleccionado entre os derivados com ligações cruzadas do poli (ácido acrílico). Nas modalidades preferidas da presente invenção, o mucoadesivo não é ácido hialurónico. O adjuvante é um mutante destoxificado da toxina de ADP-ribosilada bacteriana seleccionado entre LT-R72 ou LT-K63. Ainda noutras modalidades, a presente invenção é orientada para métodos de fazer composições farmacêuticas as quais compreendem (incluem) a combinação das composições acima descritas de pelo menos três componentes com excipientes farmacêuticamente aceitáveis. São adicionalmente revelados métodos de imunização compreendendo a administração via mucosa de doses terapêuticas eficazes de composições farmacêuticas a um sujeito vertebrado. São adicionalmente revelados métodos para provocar uma resposta imune contra um antigénio seleccionado compreendendo (incluindo) a administração via mucosa de doses terapêuticamente eficazes de composições farmacêuticas a um sujeito vertebrado.

Adicionalmente são aqui reveladas orientações para métodos de imunização compreendendo a administração através das mucosas de quantidades terapêuticamente eficazes de composições farmacêuticas que compreendem bioadesivos, adjuvantes, antigénios e excipientes a um sujeito vertebrado e métodos para provocar uma resposta imune contra um determinado antigénio compreendendo (incluindo) a administração através

das mucosas de quantidades terapêuticamente eficazes das composições farmacêuticas que compreendem antígenos, adjuvantes e bioadesivos a um paciente vertebrado.

Ainda noutras modalidades, a presente invenção está direccionada para composições farmacêuticas como definidas na reivindicação 9, as quais compreendem (incluem) pelo menos um antígeno, pelo menos um adjuvante, pelo menos um bioadesivo e, pelo menos, um excipiente da mucosa farmacêuticamente aceite, para utilização em métodos de imunização que compreendem a administração através das mucosas de quantidades terapêuticamente eficazes de composições farmacêuticas a um sujeito vertebrado. São ainda revelados métodos para provocar uma resposta imune contra um determinado antígeno compreendendo (incluindo) a administração através das mucosas de quantidades terapêuticamente eficazes de composições farmacêuticas a um sujeito vertebrado.

Estas e outras modalidades da presente invenção serão prontamente evidentes para os especialistas na arte tendo em conta as revelações aqui feitas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 representa a imunogenicidade do antígeno HA com diferentes bioadesivos em coelhos. Os grupos de coelhos aos quais foram administrados antígeno e adjuvante com carbopol ou HPMC tinham títulos mais elevados do que os dos grupos de coelhos aos quais se administrou apenas antígeno e adjuvante.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A prática da presente invenção empregará, salvo indicação em contrário, métodos convencionais de química, bioquímica, biologia molecular, imunologia e farmacologia, dentro do âmbito da arte. Tais técnicas encontram-se completamente

descritas na literatura. Consultar, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); e Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell. Scientific Publications); e Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989).

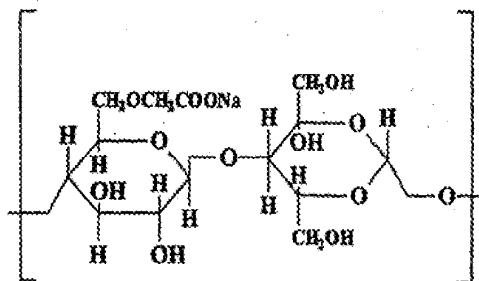
Tal como é usado nesta especificação e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma" e "a", "o" incluem as referências aos plurais, a não ser que o conteúdo aponte claramente para o contrário. Assim, por exemplo, a referência a "um antigénio" inclui a mistura de dois ou mais destes agentes.

I. Definições

Ao descrever a presente invenção serão empregues os termos que seguem e pretende-se que sejam definidos como se indica abaixo.

O termo "mucoadesivo" refere-se a um agente bioadesivo que se ligue preferivelmente à mucosa ou à superfície das células da mucosa. Exemplos de mucoadesivos conhecidos na arte incluem mas não se encontram limitados aos derivados com ligações cruzadas do poli (ácido acrílico), do álcool polivinílico, da metilcelulose de hidroxipropilo, (HPMC), dos polissacáridos e da carboximetilcelulose. A carboximetilcelulose é um bioadesivo exemplar, cuja estrutura se mostra abaixo (estrutura 1).

(1)



Um "derivado de um mucoadesivo" é uma molécula derivada de um mucoadesivo e denota qualquer uma das várias substâncias conhecidas na arte, tais como mucoadesivos esterificados em que aproximadamente 75%-100% dos grupos carboxilo livres se encontram esterificados com um grupo alquilo. O termo também inclui ésteres de mucoadesivos "misturados", em que os grupos carboxilo são esterificados com mais do que um grupo alquilo. Tais ésteres "misturados" são descritos mais completamente abaixo. Além disso, o termo "derivado de um mucoadesivo" também se refere aos derivados de mucoadesivos com ligações cruzadas auto-induzidas, o que inclui os ésteres internos e nos quais cerca de 0.5% a cerca de 20% dos grupos carboxilo dos mucoadesivos se encontram em ligação cruzada com os grupos hidroxilo do mesmo ou de mucoadesivos diferentes.

O termo "microesfera", tal como é aqui usado, refere-se a uma partícula de diâmetro de cerca de 100 nm até cerca de 150 μm , mais preferencialmente com um diâmetro de cerca de 200 nm até cerca de 30 μm , e mais preferencialmente com um diâmetro de cerca de 500 nm até cerca de 10 μm . O tamanho das microesferas é prontamente determinado por técnicas bem conhecidas na arte tal como a espectroscopia de correlação de fótons, difractivometria laser e/ou microscopia electrónica de varrimento. As microesferas aqui usadas serão formadas a

partir dos mucoadesivos e seus derivados, descritos em maior detalhe, que são não tóxicas e são biodegradáveis.

Os mucoadesivos da presente invenção também podem ser usados para formar microesferas e/ou micropartículas, tal como descrito na PCT/US98/01738P. O termo "alquilo" tal como é aqui utilizado, refere-se a um grupo de hidrocarbonetos saturados ramificado ou não ramificado com 1 a 24 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, octilo, decilo, tetradecilo, hexadecilo, eicosilo, tetracosilo e similares, assim como também os grupos cicloalquilo tais como o ciclopentilo, ciclohexilo, benzilo, e similares. O termo "aplicação através das mucosas" refere-se à aplicação de um antigénio a uma superfície da mucosa incluindo via nasal, pulmonar, vaginal, rectal, uretral e sublingual ou oral.

O termo "antigénio" refere-se a qualquer substância, incluindo uma proteína ou um polissacárido de proteína, lipopolissacárido de proteína, polissacárido, lipopolissacárido, polipéptidos, DNA, RNA, e péptidos de ácidos nucleicos (PNA), subunidades virais, vírus inteiros ou bactérias completas os quais, quando são estranhos à corrente sanguínea de um animal, ao conseguirem acesso aos tecidos deste animal, estimulam a formação de anticorpos específicos e reagem especificamente *in vivo* ou *in vitro* com um anticorpo homólogo. Adicionalmente, um "antigénio" pode incluir modificações, tais como deleções, adições e substituições (geralmente de natureza conservativa), da sequência nativa, desde que a modificação mantenha a capacidade para desencadear uma resposta imune. Estas modificações podem ser deliberadas, tal como, por exemplo, por mutagénese dirigida, ou podem ser acidentais, tal como através das mutações dos hospedeiros que produzem os antigénios. Além disso, um antigénio, tal como é aqui utilizado, estimula a proliferação de linfócitos T,

preferencialmente de linfócitos Th1, com receptores para os antígenos e podem reagir com os linfócitos para desencadear a série de respostas designada por imunidade mediada por células.

Um hapteno está dentro do âmbito desta definição de antígeno. Um hapteno é aquela parte de uma molécula de antígeno ou do complexo antigénico que determina a sua especificidade imunológica. Normalmente, um hapteno é um péptido ou um polissacárido nos antígenos que ocorrem naturalmente. Nos antígenos artificiais pode ser uma substância de baixo peso molecular tal como um derivado do ácido arsanílico. Um hapteno irá reagir especificamente *in vivo* ou *in vitro* com anticorpos ou linfócitos T homólogos. Os descritores alternativos são os determinantes antigénicos, os agrupamentos estruturais antigénicos e os agrupamentos hapténicos.

Para a finalidade da presente invenção, os antígenos podem ser derivados a partir de qualquer das várias fontes conhecidas, incluindo, sem limitações, vírus, bactérias, parasitas e fungos. O termo também inclui qualquer um dos vários antígenos de tumorais.

Tal como é aqui utilizado, o termo imunização refere-se ao processo de desencadeamento de uma resposta imunológica através da administração de um antígeno a um indivíduo.

Uma "resposta imunológica" a um antígeno ou a uma composição é o desenvolvimento num sujeito de uma resposta humoral e/ou imune celular a moléculas presentes na composição de interesse. Para as finalidades da presente invenção, uma "resposta imune humoral" refere-se a uma resposta imune mediada por moléculas de anticorpos enquanto uma "resposta imune celular" é aquela que é mediada por linfócitos T e/ou por outros glóbulos brancos do sangue. Um aspecto importante da imunidade celular envolve uma resposta antígeno específica

pelas células T citolíticas ("CTL"). As CTLs possuem especificidade para péptidos antigénios que se apresentam associados a proteínas codificadas pelo Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) e que são expressas nas superfícies das células. As CTLs ajudam a induzir e a promover a destruição intracelular dos microrganismos intracelulares, ou a lise das células infectadas por tais microrganismos. Outro aspecto da imunidade celular envolve uma resposta antigénio específica pelas células T Helper. As células T Helper actuam para ajudar a estimular a função e focam-se na actividade de células efectoras não específicas contra as células que apresentam os péptidos antigénios em associação com as moléculas do MHC à sua superfície. Uma "resposta imune celular" também se refere à produção de citocinas, quimiocinas e outras moléculas deste tipo produzidas por células T activadas e/ou outros glóbulos brancos do sangue, incluindo os derivados das células T CD4+ e CD8+.

Tal como aqui é utilizado, uma "composição imunogénica" ou uma vacina é uma composição que desencadeia uma resposta imunológica. As composições imunogénicas ou vacinas que desencadeiam uma resposta imune celular podem servir para sensibilizar um sujeito vertebrado pela apresentação de um antigénio em associação com moléculas do MHC à superfície da célula. A resposta imune mediada por células é orientada para as células que apresentam o antigénio na sua superfície ou para perto delas. Adicionalmente, podem ser gerados linfócitos T antigénio específicos para permitir a protecção futura de um hospedeiro imunizado.

A capacidade de um determinado antigénio ou de uma determinada composição imunogénica para estimular uma resposta imunológica mediada por células pode ser determinada por uma variedade de testes, tal como por ensaios de linfoproliferação (activação dos linfócitos), ensaios de células citotóxicas

CTL, ou por ensaios para linfócitos T específicos para o antígeno num sujeito sensibilizado. Estes ensaios são bem conhecidos na arte. Consultar, por exemplo, Erickson et al., J. Immunol., 1993, 151:4189-4199; Doe et al., Eur. J. Immunol., 1994, 24:2369-2376; e os exemplos abaixo.

Assim, uma resposta imune, tal como é aqui usada, pode ser uma resposta que estimula a produção de CTL e/ou a produção ou activação de células T Helper. O antígeno de interesse pode também desencadear uma resposta imune mediada por anticorpos. Então, uma resposta imunológica pode incluir um ou mais dos seguintes efeitos: a produção de anticorpos pelas células B e/ou a activação das células T supressoras e/ou das células T $\gamma\delta$ dirigidas especificamente para um antígeno ou antígenos presentes na composição ou na vacina de interesse. Estas respostas podem servir para neutralizar a infecciosidade e/ou para mediar o complemento do anticorpo ou a citotoxicidade da célula dependente de anticorpos (ADCC) para fornecer protecção a um hospedeiro imunizado. Tais respostas podem ser determinadas utilizando testes padrão de imunoensaios e ensaios de neutralização, os quais são bem conhecidos na arte.

Uma composição imunogénica que contém um antígeno seleccionado em combinação com um bioadesivo e com um adjuvante tal como aqui descrito, apresenta "imunogenicidade aumentada" porque possui uma maior capacidade para desencadear uma resposta imune do que a resposta imune desencadeada pela quantidade equivalente do antígeno e do adjuvante sem o bioadesivo. Portanto, uma composição imunogénica pode apresentar "imunogenicidade aumentada" porque o antígeno é mais prontamente absorvido pelo sujeito vertebrado, ou, porque o antígeno é mais fortemente imunogénico ou porque é necessária uma dose menor de antígeno para conseguir uma resposta imune no sujeito ao qual ela é administrada. Tal imunogenicidade aumentada pode ser determinada administrando

aos animais a composição bioadesivo/antigénio/adjuvante e o controlo antigénio/adjuvante e comparando os títulos de anticorpos contra os dois utilizando testes padrão de ensaios imunes tal como o ensaio de rádio imunidade, (RIA) e o ensaio de imunidade ligado a enzimas (ELISA), ambos bem conhecidos na arte.

Os termos "quantidade eficaz" ou "quantidade farmacologicamente eficaz", tal como são aqui utilizados, referem-se a uma quantidade não tóxica da composição mas suficiente para proporcionar a resposta imunológica desejada e o efeito terapêutico correspondente. Tal como será mencionado abaixo, a quantidade exacta necessária irá variar de sujeito para sujeito, dependendo da espécie, da idade, da condição geral do indivíduo, da gravidade da doença a tratar, do antigénio particular de interesse, do modo de administração e similares. Uma quantidade "eficaz" apropriada pode ser determinada para cada caso individual por um especialista na arte, utilizando métodos experimentais de rotina.

Tal como aqui utilizado, "tratamento" refere-se a qualquer acção entre as seguintes, (i) a prevenção da infecção ou reinfeção, tal como na vacina tradicional, (ii) a redução ou eliminação dos sintomas, e (iii) a eliminação substancial ou completa do agente patogénico em causa. O tratamento pode ser efectuado profilacticamente (previamente à infecção) ou terapêuticamente (após a infecção). O termo "tratamento" também se refere ao aumentar da resposta imune a um antigénio.

Tal como é aqui utilizado, o termo "aumento" refere-se a um aumento no nível da resposta imune a um antigénio e pode incluir um aumento na resposta dos ramos celular e/ou humoral do sistema imunitário.

Por "farmacologicamente aceitável" ou "farmacologicamente aceitável" pretende-se dizer que é um material que não é indesejável biologicamente ou de qualquer outra forma, i.e.,

um material que possa ser administrado a um indivíduo em conjunto com formulações de micropartículas sem provocar quaisquer efeitos biológicos indesejáveis ou interações prejudiciais com qualquer dos componentes da composição em que está incluído.

Por "sujeito vertebrado" entende-se qualquer membro do subfilo Chordata, incluindo, sem limitações, humanos e outros primatas, incluindo primatas não humanos como os chimpanzés e outros macacos e espécies de macacos; animais de quinta tais como gado, ovelhas, porcos, cabras e cavalos, mamíferos domésticos tais como cães e gatos, animais de laboratório incluindo roedores tais como ratinhos, ratos, e hamsters, aves incluindo domésticas, selvagens e bandos tais como galinhas, perus e outras aves galináceas, patos, gansos e similares. O termo "sujeito vertebrado" não denota uma idade determinada. Assim, pretende-se cobrir tanto pacientes adultos como recém-nascidos. Pretende-se que o sistema aqui descrito seja utilizado em qualquer das espécies de vertebrados acima, uma vez que os sistemas imunitários de todos estes vertebrados operam de forma semelhante.

II. Modos de Realização da Invenção

Antes da descrição da presente invenção em detalhe, deve ser entendido que esta invenção está limitada pelas reivindicações. Também deve ser entendido que a terminologia usada aqui tem o propósito de descrever apenas modalidades particulares da invenção e não pretende ser limitativa.

Apesar de poderem ser usados vários métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos na prática da presente invenção, os materiais e métodos preferidos estão aqui descritos. São reveladas técnicas de distribuição mediadas por bioadesivos para provocar uma resposta imune contra patogénicos sistémicos e transmitidos por via de

mucosas. O sistema provoca uma resposta imune vigorosa, mesmo quando o antígeno é, ele mesmo, fracamente imunogénico.

A atenção tem-se virado para o desenvolvimento de bioadesivos, especialmente mucoadesivos, como os sistemas de distribuição via mucosas. Tais sistemas são baseados em substâncias que ocorrem naturalmente, tais como lectinas e proteínas fímbrias, e em substâncias artificiais, tais como as derivadas de poli (ácido acrílico), hidroxipropil metilcelulose (HPMC), álcoois polivinílicos, e polissacáridos. Estes bioadesivos são susceptíveis de aderirem ao muco.

O método aqui revelado fornece imunidade mediada por célula, e/ou respostas humorais de anticorpos. Deste modo, os métodos da presente invenção irão encontrar utilidade com qualquer antígeno para o qual as respostas imunes celulares e/ou humorais são desejadas, derivados de vírus, patogénios que podem induzir anticorpos, epitopos de células T helper e epitopos citotóxicos de células T. Tais antígenos incluem, mas não estão limitados a, antígenos codificados por vírus humanos e animais e podem corresponder tanto a proteínas estruturais como não estruturais.

Por exemplo, a composição da reivindicação N°.1 será útil para a estimulação duma resposta imune contra uma larga variedade de proteínas a partir da família vírus do herpes, incluindo proteínas derivadas de vírus herpes simplex (HSV) tipos 1 e 2, tais como glicoproteínas gB, gD e gH de HSV-1 e HSV-2; antígenos derivados de vírus varicella zoster (VZV), vírus Epstein-Barr (EBV) e citomegalovírus (CMV) incluindo gB e gH CMV; e antígenos derivados de outros vírus do herpes humano tais como HHV6 e HHV7. (Consultar, e.g., Chee et al., *Cytomegaloviruses* (J.K. McDougall, ed., Springer-Verlag 1990) pp. 125-169, para uma revisão da proteína que codifica o conteúdo de citomegalovírus; McGeoch et al., *J. Gen. Virol.*, 1988, 69:1531-1574, para uma discussão das várias proteínas

codificadas de HSV-1; Patente U.S. No. 5,171,568 para uma discussão de proteínas gB e gD de HSV-1 e HSV-2 e os genes que codificam para esse fim; Baer et al., *Nature* (1984) 310:207-211, para a identificação de sequências de codificação de proteínas num genoma de EBV; e Davison and Scott, J. *Gen. Virol.*, 1986, 67:1759-1816 para uma revisão do VSV.)

Antigénios a partir dos vírus da família da hepatite, incluindo vírus da hepatite A (HAV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite delta (HDV), vírus da hepatite E (HEV) e vírus da hepatite G (HGV), também podem ser convenientemente usados nas técnicas aqui descritas. A título de exemplo, a sequência genómica viral de HCV é conhecida, assim como existem métodos para se obter a sequência. Consultar, por exemplo, as Publicações Internacionais N°s WO 89/04669; WO 90/11089; e WO 90/14436. O genoma de HCV codifica várias proteínas virais, incluindo E1 (também conhecida como E) e E2 (também conhecida como E2/NSI) e uma proteína nucleocápside N-terminal (denominada "núcleo") (consultar, Houghton et al., *Hepatology* (1991) 14:381-388, para uma discussão sobre proteínas de HCV, incluindo E1 e E2). Cada uma destas proteínas, bem como os seus fragmentos antigénicos, serão úteis nos presentes métodos. Do mesmo modo, a sequência para o δ -antigénio de HDV é conhecido (consultar, por exemplo, Patente Americana No. 5,378,814) e este antigénio também pode ser convenientemente usado nos métodos presentes. Adicionalmente, antigénios derivados de HBV, tais como antigénio de núcleo, o antigénio de superfície, sAg, bem como as sequências pré-superfície, pré-S1 e pré-S2 (anteriormente designadas pré-S), bem como combinações dos referidos acima, como por exemplo, sAg/pré-S1, sAg/pré-S2, sAg/pré-S1/pré-S2, e pré-S1/pré-S2, serão úteis aqui. Consultar, por exemplo, "HBV Vaccines - from the laboratory to license: a case study" em Mackett, M. and Williamson, J.D., *Human Vaccines and*

Vaccination, pp. 159-176, para uma discussão da estrutura de HBV; e Patente U.S. Nos. 4,722,840, 5,098,704, 5,324,513 ; Beames et al., *J. Virol.*, 1995, 69:6833-6838, Birnbaum et al., *J. Virol.*, 1990, 64:3319-3330; e Zhou et al., *J. Virol.*, 1991, 65: 5457-5464.

Antigénios derivados de outros vírus também encontrarão utilização nos métodos reivindicados, tal como sem limitação, proteínas de membros das famílias Picornaviridae (por exemplo, vírus da polio, etc.); Caliciviridae; Togaviridae (por exemplo, vírus da rubéola, vírus do dengue, etc.); Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae; Birnaviridae; Rhabdoviridae (por exemplo, vírus da raiva, etc.); Filoviridae; Paramyxoviridae (por exemplo, vírus do sarampo, vírus da papeira, vírus sincicial respiratório, etc.); Orthomyxoviridae (por exemplo, vírus da gripe tipos A, B e C, etc.); Bunyaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (por exemplo, HTLV-I; HTLV-II; HIV-1 (também conhecidos como HTLV-III, LAV, ARV, hTLR, etc.)), incluindo, mas não limitado a, antigénios de isolados de HIV_{IIIB}, HIV_{SF2}, HIV_{LAV}, MV_{LAI}, HIV_{MN}; HIV-1_{CM235}, HIV-1_{US4}; HIV-1 subtipo (O); HIV-2; vírus da imunodeficiência símia (SIV), entre outros. Adicionalmente, também podem ser derivados antigénios do vírus do papiloma humano (HPV) e dos vírus da encefalite transmitidos pela carraça. Consultar, por exemplo, *Virology*, 3rd Edition (W.K. Joklik ed. 1988); *Fundamental Virology*, 2nd Edition (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds. 1991), para uma descrição destes e doutros vírus.

Mais particularmente, são conhecidas e referidas as proteínas envelope gp120 de qualquer um dos isolados HIV acima referidos, incluindo elementos dos vários subtipos genéticos de HIV, (consultar, por exemplo, Myers et al., Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico (1992); Myers et al., *Human Retroviruses and Aids*, 1990, Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory; e

Modrow et al., J. Virol. (1987) 61:570-578, para uma comparação das sequências envelope de uma variedade de isolados HIV) e antígenos derivados de qualquer um destes isolados serão úteis nos presentes métodos. Além disso, a invenção é igualmente aplicável a outras proteínas imunogênicas derivadas de qualquer um dos vários isolados de HIV, incluindo qualquer uma de várias proteínas envelope tais como gp160 e gp41, antígenos gag tais como p24gag e p55gag, bem como proteínas derivadas da região pol.

Também são aqui revelados vários antígenos bacterianos, tais como aqueles derivados de organismos que causam difteria, cólera, tuberculose, tétano, pertussis, meningite, e outros estados patogênicos, incluindo, sem limitação; *Meningococcus* A, B e C, *Hemophilus influenza* tipo B (Hib), *Neisseria gonorrhoeae*, e *Helicobacter pylori*. Exemplos de antígenos parasitas incluem aqueles derivados de organismos que causam malária e a doença de Lyme.

Além disso, os métodos descritos aqui fornecem meios para tratar uma variedade de cânceros malignos. Por exemplo, a composição da presente invenção pode ser usada para desencadear respostas imunes quer humorais quer mediadas por células para proteínas particulares específicas para o câncer em questão, tal como oncogênese ativada, um antígeno fetal, ou um marcador de ativação. Tais antígenos tumorais incluem qualquer um de vários MAGE (antígeno E associado ao melanoma), que inclui MAGE 1, 2, 3, 4, etc. (Boon, T. Scientific American (March 1993): 82-89); qualquer uma de várias tirosinases; MART 1 (antígeno de melanoma reconhecido por células T), ras mutante; p53 mutante; antígeno de melanoma p97; CEA (antígeno carcinoembrionário), entre outros.

É prontamente evidente que a presente invenção pode ser usada para prevenir ou tratar uma grande variedade de doenças.

A presente exposição fornece ainda métodos para imunização, que produzem uma resposta imune, e reforça uma resposta imunológica que compreende a administração duma composição farmacêutica que compreende pelo menos um antígeno, pelo menos um adjuvante, pelo menos um bioadesivo, e pelo menos um excipiente de mucosas farmacêuticamente aceitável.

Embora a invenção seja largamente aplicável a qualquer um dos patógenos acima mencionados, a invenção é aqui exemplificada como referência ao vírus influenza. Especificamente, as glicoproteínas envelope HA e NA da gripe A são particularmente interessantes para produzir uma resposta imunitária. Têm sido identificados numerosos subtipos HA da gripe A (Kawaoka et al., *Virology*, 1990, 179:759-767; Webster et al., "Antigenic variation among type A influenza viruses," p. 127-168. In: P. Palese and D.W. Kingsbury (ed.), *Genetics of influenza viruses*. Springer-Verlag, New York). Assim, proteínas derivadas de qualquer um destes isolados também podem ser usadas nas técnicas de imunização aqui descritas.

O antígeno seleccionado é combinado com o bioadesivo e o adjuvante para distribuição subsequente às mucosas. Bioadesivos úteis nos métodos aqui descritos incluem, mas não estão limitados a, derivados de ligação cruzada de poli (ácido acrílico), álcool polivinílico, hidroxipropil metilcelulose, polissacáridos, e carboximetilcelulose. Muitos destes polímeros estão disponíveis numa variedade de pesos moleculares, e o peso molecular adequado para ser usado com um determinado antígeno pode ser rapidamente determinado por experiências de rotina por um especialista.

Os bioadesivos da presente invenção podem ser fornecidos como microesferas, com o antígeno adsorvido ou incorporado fisicamente (aprisionado), usando qualquer uma de várias técnicas, bem conhecidas pelos especialistas na arte.

Consultar, por exemplo, Benedetti et al., J. Controlled Rel., 1990, 13:33-41; Ghezzi et al., Int. J. Pharm., 1992, 87:21-29; Illum et al., J. Controlled Rel., 1994, 29:133-141; Publicação Europeia No. 517,565; PCT US98/01738.

A produção de microesferas com mistura da fase descontínua com a fase contínua é bem conhecida pelos especialistas na arte. Consultar, por exemplo, Patente Americana No. 3,891,570 e Benedetti et al., J. Controlled Rel., 1990, 13:33-41. A extracção por solvente a partir de preparações de microesferas também é bem conhecida pelos especialistas na arte. Para uma descrição mais aprofundada da técnica de extracção por solvente, consultar, por exemplo, Illum et al., J. Controlled Rel., 1994, 29:133-141; e Ghezzi et al., Int. J. Pharm., 1992, 87:21-29; e Publicação Europeia No. 517,565.

Alternativamente, as microesferas também podem ser formadas usando secagem por pulverização, como descrito em, por exemplo, Kyyronen et al., Int. J. Pharm., 1992, 80:161-169; Ghezzi et al., Int. J. Pharm., 1992, 87:21-29; e Masters, K. (1976) Spray Drying 2nd Ed. Wiley, New York. Especialmente as microesferas pequenas, denominadas "nanoesferas" podem ser produzidas usando anti-solventes supercríticos (SAS), como descrito na Publicação Internacional No. WO 96/29998.

A taxa de libertação do antígeno a partir de composições bioadesivas pode ser modificada dependendo do método usado para associar o antígeno com as microesferas. Por exemplo, se o antígeno for fisicamente disperso na matriz do polímero, a libertação é controlada em grande medida pela taxa de difusão do antígeno através da rede do polímero. Além disso, se os solventes são extraídos em vez de evaporados, as microesferas incluem superfícies mais porosas o que resulta numa libertação mais rápida do antígeno aprisionado.

Além disso, a esterificação dos grupos carboxil reduz a bioaderência dos bioadesivos devido à tendência reduzida para os ésteres formarem pontes de hidrogénio com o substrato biológico. Adicionalmente, a hidrofobicidade das microesferas, conferida pelos diferentes ésteres e graus de ligação cruzada, irá afectar a quantidade de bioadesão uma vez que o tecido das mucosas parece apresentar uma hidrofobicidade apreciável o que pode ter implicações importantes para a bioadesão. Assim, por exemplo, um grau mais elevado de esterificação geralmente dá um aumento da lentidão e libertação reduzida da proteína aprisionada, mas produz uma microesfera com melhoradas propriedades bioadesivas.

Adicionalmente, os factores biológicos tais como a frequência do batimento ciliar, bem como os factores físicos tais como o tamanho de partícula, densidade e grau de aglomeração, e solubilidade à água do antigénio, irá influenciar o grau de bioadesão e bioerosão. Consultar, por exemplo, Pritchard et al., *Int. J. Pharm.*, 1996, 129:137-145.

Além disso, misturas de microesferas com variações de ésteres, variações das quantidades de esterificação, bem como as variações dos graus de ligação cruzada, serão úteis nas formulações de modo a obter a bioadesão e cinética de libertação desejada para um determinado antigénio e para fornecer uma resposta imunitária primária e secundária.

Uma vez formada, aderência de uma combinação particular de bioadesivo/antigénio/adjuvante pode ser determinada usando qualquer um de vários métodos, bem conhecidos na arte, de modo a avaliar se uma formulação particular tem as propriedades bioadesivas apropriadas. Por exemplo, podem ser conduzidos *in vitro* estudos de descolamento por peso baseados nas medições da tensão superficial. Consultar, por exemplo, Smart et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1984, 36:295-299. Resumidamente, são aplicadas microesferas de teste a um substrato biológico, tal

como tecido epitelial, e os estudos do descolamento por peso conduzidos usando um aparelho que determina o peso requerido para descolar duas secções de tecido a partir do bioadesivo de teste que fica entre eles. Consultar, por exemplo, Pritchard et al., *Int. J. Pharm.*, 1996, 129:137-145. Alternativamente, a taxa de transporte mucociliar pode ser usada como uma determinação da capacidade de adesão uma vez que a uma maior adesão da substância de teste, corresponde uma diminuição da taxa de transporte. Tais estudos podem ser conduzidos por, por exemplo, monitorização do movimento dos bioadesivos ao longo de parte de um palato superior excisado de rã (*Rana pipiens*), como descrito em Pritchard et al., *supra*.

Do mesmo modo, a taxa de bioerosão das microesferas pode ser determinada usando técnicas padrão, bem conhecidas na arte, tal como nos perfis de libertação *in vitro*, para determinar se a formulação em questão de bioadesivo/adjuvante/antigénio fornece uma quantidade adequada de antigénio ao sistema imune para uma dada doença. Por exemplo, os testes de dissolução podem ser realizados pela, por exemplo, dispersão de microesferas num tampão apropriado tal como um tampão de fosfato ou BSA, com agitação contínua. As amostras da solução são removidas em intervalos de tempo fixos e ensaiadas para o antigénio de interesse usando, por exemplo, ELISA ou qualquer outro ensaio apropriado. Consultar, Ghezzi et al., *Int. J. Pharm.*, 1992, 87:21-29.

Os tamanhos de partícula podem ser determinados, por exemplo, através da dispersão de laser, usando por exemplo, um espectrómetro que incorpore um laser de néon e hélio. Geralmente, o tamanho de partícula é determinado à temperatura ambiente e envolve múltiplas análises da amostra em questão (por exemplo, 5-10 vezes) para obter um valor médio do diâmetro de partícula. O tamanho de partícula também é determinado usando microscopia de varrimento electrónico

(SEM). De modo a realizar isto, as microesferas secas são revestidas por salpicos com uma mistura de ouro/paládio para uma espessura de aproximadamente 100 Angstroms, depois examinadas usando uma microscopia de varrimento electrónica.

Se o antigénio é fornecido numa microesfera, o conteúdo de antigénio é geralmente determinado de modo a que a quantidade apropriada de microesferas possa ser distribuída ao sujeito de modo a desencadear uma resposta imune adequada. O conteúdo em antigénio pode ser determinado de acordo com métodos conhecidos na arte, tal como por disrupção das microesferas e extracção de qualquer antigénio aprisionado. Por exemplo, as microesferas podem ser dissolvidas num solvente tal como DMSO ou dispersas em, por exemplo, NaOH 0.1 M com SDS a 5% (m/v). A amostra é agitada, opcionalmente centrifugada e o sobrenadante ensaiado para o antigénio de interesse usando um ensaio apropriado. Consultar, por exemplo, Benedetti et al., *J. Controlled Rel.*, 1990, 13:33-41; e O'Hagan et al., *Int. J. Pharm.*, 1994, 103:37-45.

Por exemplo, o antigénio é geralmente incubado com o bioadesivo numa quantidade que representa aproximadamente 1% a cerca de 40% (m/m) de antigénio para bioadesivo, mais preferivelmente cerca de 0.5% a cerca de 25% (m/m) de antigénio, e ainda mais preferível cerca de 1% a cerca de 10% (m/m) de antigénio. A percentagem de antigénio irá depender da dose desejada e da condição a ser tratada, como discutido em maior detalhe adiante. O adjuvante é geralmente incubado com o bioadesivo numa quantidade que representa aproximadamente 0.1% a cerca de 40% (m/m) de adjuvante para bioadesivo, mais preferivelmente cerca de 0.5% a cerca de 25% (m/m) de adjuvante, e ainda mais preferível cerca de 1% a cerca de 10% (m/m) de adjuvante. A percentagem de adjuvante irá depender da dose desejada e da condição a ser tratada, como discutido em maior detalhe adiante. A incubação do antigénio e do adjuvante

com o polímero irá prosseguir durante aproximadamente 0 horas a 48 horas ou mais, preferivelmente cerca de 0 horas a cerca de 24 horas, mais preferivelmente cerca de 1 hora a cerca de 10 horas, e mais preferivelmente cerca de 2 horas a cerca de 4 horas. Após a incubação, a suspensão pode ser liofilizada e a composição seca suspendida num veículo apropriado antes da imunização.

Assim que o antigénio, o adjuvante, e o bioadesivo estejam prontos, como descrito acima, as composições são formuladas para subsequente distribuição às mucosas. As composições irão geralmente incluir um ou mais "excipientes ou veículos farmacologicamente aceitáveis" apropriados para distribuição em mucosas, tais como água, solução salina, glicerol, polietilenoglicol, ácido hialurónico, etanol, etc. Adicionalmente, substâncias auxiliares, tais como agentes humidificantes ou emulsionantes, substâncias de tampão de pH, e similares, podem estar presentes em tais veículos.

Por exemplo, as formulações intranasais irão normalmente incluir veículos que não causem irritação na mucosa nasal nem significativa perturbação na função ciliar. Diluentes tais como água, solução salina aquosa ou outras substâncias conhecidas podem ser empregues na presente invenção. As formulações nasais também podem conter conservantes tais como, mas não limitado a, clorobutanol e cloreto de benzalcónio. Pode estar presente um surfactante para melhorar a absorção das proteínas em causa pela mucosa nasal. As formulações intranasais podem ser distribuídas, sem limitação, sob a forma de inaladores ou sprays.

Para supositórios rectais e uretrais, a composição do veículo irá incluir ligantes e transportadores tradicionais, tais como, manteiga de cacau (óleo de teobroma) ou outros triglicéridos, óleos vegetais modificados por esterificação, hidrogenação e/ou fraccionamento, gelatina glicerinada,

glicóis polialcalinos, misturas de polietilenoglicol de vários pesos moleculares e ésteres de ácidos gordos de polietilenoglicol.

Para distribuição vaginal, as formulações da presente invenção podem ser incorporadas na base do pessário, tal como aquelas que incluem misturas de triglicéridos de polietileno, ou suspenso em óleos tais como óleo de milho ou óleo de sésamo, opcionalmente com sílica coloidal. Consultar, por exemplo, Richardson et al., *Int. J. Pharm.*, 1995, 115:9-15.

Para uma maior discussão sobre os veículos apropriados para uso em modos particulares de distribuição, consultar, por exemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 19th edition, 1995. Um especialista na arte pode determinar prontamente o veículo adequado para uso com o antigénio particular e local de distribuição.

Os adjuvantes usados nesta formulação podem melhorar a eficácia das composições farmacêuticas. Os adjuvantes são preferivelmente administrados simultaneamente com as formulações de bioadesivo da presente invenção, por exemplo, na mesma composição, mas também podem ser administrados em formulações separadas. Pode ser administrado um adjuvante adicional antes ou depois da administração das formulações de bioadesivo da presente invenção. Os adjuvantes usados aqui na formulação ou como adjuvantes adicionais incluem, mas não estão limitados a: (1) sais de alumínio (alum), tais como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, sulfato de alumínio, etc.; (2) formulações de emulsão óleo-em-água (com ou sem outros agentes imunoestimulantes específicos tais como péptidos de muramil (ver abaixo) ou componentes da parede das células bacterianas), tais como, por exemplo, (a) MF59 (Publicação Internacional No. WO 90/14837), com Esqualeno a 5%, Tween 80 a 0.5%, e Span 85 a 0.5% (opcionalmente com

várias quantidades de MTP-PE (ver abaixo), apesar de não ser necessário) formulado em partículas submicrónicas usando um microfluidificador tal como o microfluidificador Model 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, com Esqualeno a 10%, Tween 80 a 0.4%, polímero de pluronic L121 bloqueado a 5%, e thr-MDP (ver abaixo) quer microfluidificado numa emulsão submicrónica ou passada por vortex para gerar uma emulsão de tamanho de partículas grande, e (c) sistema adjuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) com esqualeno a 2%, Tween® 80 a 0,2% e um ou mais componentes da parede celular bacteriana a partir do grupo que consiste de monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trealose (TDM), e esqueleto da parede celular (CWS) preferivelmente MPL+CWS (Detox™) ; (3) podem ser usados adjuvantes de saponina, tais como Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) ou partículas geradas, dos mesmos, tais como ISCOMS (complexos imunoestimulação); (4) Adjuvante de Freund's Completo (CFA) e Adjuvante de Freund's Incompleto (IFA); (5) citocinas, tais como interleucinas (IL-1, IL-2 etc.) factor de estimulação de colónias de macrófagos (M-CSF), factor de necrose tumor (TNF), etc.; (6) mutantes destoxificados duma toxina ADP-ribosilada bacteriana tal como uma toxina da cólera (CT), uma toxina de pertussis (PT), ou uma toxina sensível ao calor de E. coli (LT), particularmente LT-K63 (onde a lisina é substituída pelo aminoácido do tipo selvagem na posição 63), LT-R72 (onde a arginina é substituída pelo aminoácido do tipo selvagem na posição 72), CT-S109 (onde a serina é substituída pelo aminoácido do tipo selvagem na posição 109), e PT-K9/G129 (onde a lisina é substituída pelo aminoácido do tipo selvagem na posição 9 e a glicina é substituída na posição 129) (consultar, por exemplo, as Publicações Internacionais Nos. W093/13202 e W092/19265); e (7) outras substâncias que actuam como agentes imunoestimulantes para reforçar a eficácia da composição.

Péptidos de muramil incluem, mas não se limitam a, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamo (nor-MDP), e N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE).

Os vários componentes da composição podem estar presente numa larga gama de razões. Por exemplo, os componentes antigénio e bioadesivo são tipicamente usados num intervalo de volumes de 1:10 a 10:1, preferivelmente 1:50 a 50:1, e mais preferível 1:100. Os componentes adjuvante e bioadesivo são tipicamente usados num intervalo de volumes de 1:10 a 10:1, preferivelmente 1:50 a 50:1, e mais preferível 1:100. Os componentes antigénio e adjuvante são tipicamente usados num intervalo de volumes de 1:10 a 10:1, preferivelmente 1:5 a 5:1, mais preferivelmente desde cerca de 1:2 a 2:1, e mais preferível cerca de 1:1. No entanto, podem ser mais adequadas outras razões para objectivos específicos, tal como quando um antigénio particular é difícil de incorporar numa composição bioadesiva e tem uma baixa imunogenicidade, caso em que é necessária uma quantidade relativa elevada do componente de antigénio.

As composições compreenderão uma "quantidade terapeuticamente eficaz" do antigénio de interesse. Ou seja, uma quantidade de antigénio será incluída nas composições que levam o indivíduo a produzir uma resposta imunológica suficiente de modo a prevenir, reduzir ou eliminar sintomas. A quantidade exacta necessária irá variar, dependendo do indivíduo a ser tratado; da sua idade e estado geral; da capacidade do seu sistema imunitário para sintetizar anticorpos; do grau de protecção desejada; da gravidade da condição clínica a ser tratada; do antigénio particular seleccionado e do seu modo de administração, entre outros factores. Uma quantidade efectiva adequada pode ser

determinada rapidamente por um especialista. Assim, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" situa-se numa gama relativamente ampla que pode ser determinada através de ensaios de rotina. Por exemplo, para os propósitos da presente invenção, uma dose eficaz varia habitualmente de cerca de 1 µg a cerca de 100 mg, de preferência de cerca de 5 µg a 1 mg, e mais preferivelmente cerca de 10 µg a 500 µg do antigénio administrado por dose.

Uma vez formuladas, as composições da invenção podem ser administradas às mucosas, utilizando técnicas padrão. Consultar, por exemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 19th edition, 1995, para técnicas de distribuição nas mucosas, incluindo técnicas intranasais, pulmonares, vaginais e rectais, bem como a Publicação Europeia No. 517,565 e Illum et al., J. Controlled Rel., 1994, 29:133-141, para técnicas de administração intranasal. Alternativamente, as composições da presente invenção podem ser administradas dérmica ou transdermicamente, usando técnicas padrão. Consultar, por exemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 19th edition, 1995.

A dosagem de tratamento pode ser um esquema de administração de dose única ou de múltiplas doses. Um esquema de dose múltipla é aquele em que um procedimento primário de vacinação pode ser constituído por 1-10 doses separadas, seguidas de outras doses administradas em intervalos de tempo subsequentes, escolhidos de modo a manter e/ou reforçar a resposta imunitária, por exemplo, a 1-4 meses para uma segunda dose e, se necessário, doses subsequentes após vários meses. O reforço pode ser com a mesma formulação dada para a resposta imune primária, ou pode ser com uma formulação diferente que contenha o antigénio. O regime de dosagem poderá, pelo menos

em parte, ser determinado pela necessidade individual e irá depender do critério do clínico. Além disso, se se pretender uma prevenção da doença, as composições de bioadesivo são geralmente administradas antes da infecção primária com o agente patogénico de interesse. Se o objectivo é o tratamento por exemplo, a redução dos sintomas ou recorrências, as composições bioadesivas são geralmente administradas na sequência da infecção primária.

As formulações podem ser testadas *in vivo* em vários modelos animais desenvolvidos para o estudo de distribuição dérmica, transdérmica ou em mucosas. Como é evidente, as composições da presente invenção são úteis para tratamento e/ou prevenção de uma larga variedade de doenças e infecções causadas por vírus, bactérias, parasitas e fungos, bem como para desencadear uma resposta imune contra uma variedade de antígenos. As composições podem não apenas serem usadas profiláctica ou terapêuticamente, como descrito acima, mas as composições também podem ser usadas de modo a preparar anticorpos, tanto policlonais como monoclonais, para, por exemplo, o propósito de diagnóstico, bem como para imunopurificação do antígeno de interesse. Se forem desejados os anticorpos policlonais, é imunizado um mamífero seleccionado, (por exemplo, ratos, coelhos, cabras, cavalos, etc.) com as composições da presente invenção. O animal normalmente recebe um reforço 2-6 semanas depois com uma ou mais administrações do antígeno. São então obtidos antisoros policlonais a partir dos animais imunizados e tratados de acordo com os procedimentos conhecidos. Consultar, por exemplo, Jurgens et al., J. Chrom., 1985, 348:363-370.

Os anticorpos monoclonais são geralmente preparados usando o método de Kohler and Milstein, Nature, 1975, 256: 495-96, ou uma sua modificação. Tipicamente, um ratinho ou rato é imunizado como descrito acima. No entanto, mais do que sangrar

o animal para extrair o soro, o baço (e opcionalmente vários gânglios linfáticos grandes) é removido e dissociado em células únicas. Se desejado, as células do baço podem ser rastreadas (após a remoção das células aderentes não específicas) pela aplicação duma suspensão celular a uma placa ou poço revestido com o antigénio da proteína. As células B, que expressam imunoglobulina ligada à membrana específica para o antigénio, irão ligar à placa, e não são arrastadas para fora com o resto da suspensão. As células B resultantes, ou todas as células do baço dissociadas, são então induzidas para fundir com células do mieloma para formar hibridomas, e são postas em cultura num meio selectivo (por exemplo, meio de hipoxantina, aminopterina, timidina, "HAT"). Os hibridomas resultantes são plaqueados por diluição limitante, e são ensaiados para a produção de anticorpos que se ligam especificamente ao antigénio de imunização (e que não se liga com antigénios não relacionados). Os anticorpos monoclonais seleccionados excretados pelos hibridomas são então postos em cultura quer *in vitro* (por exemplo, garrafas de cultura de tecidos ou em reactores de fibras ocas), quer *in vivo* (como ascites em ratinhos). Consultar, por exemplo, M. Schreier et al., *Hybridoma Techniques* 1980; Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas*, 1981; Kennett et al., *Monoclonal Antibodies*, 1980; consultar também as Patentes Americanas Nos. 4,341,761; 4,399,121; 4,427,783; 4,444,887; 4,452,570; 4,466,917; 4,472,500, 4,491,632; e 4,493,890. Painéis de anticorpos monoclonais produzidos contra o polipéptido de interesse podem ser pesquisados para várias propriedades; i.e., para isotipo, epitopo, afinidade, etc.

III. Experimental

De seguida é apresentado um exemplo de modalidades específicas de execução da presente invenção. O exemplo é

proposto com propósitos meramente ilustrativos e não se destina a limitar de qualquer modo o âmbito da presente invenção.

Embora tenham sido envidados esforços no sentido de garantir a precisão dos valores apresentados (por exemplo, quantidades, temperaturas, etc), deve tomar-se em consideração a possibilidade da presença de erros ou desvios experimentais.

Exemplo 1

Comparação de Diferentes Bioadesivos

A imunogenicidade do antigénio HA em diferentes bioadesivos foi comparada em coelhos (estirpe da Nova Zelândia).

De modo a atingir a dose de 25 µg do antigénio influenza H3N2 ("HA") (Chiron Vaccines, Sienna, Italy) e 25 µg LT-R72 (Publicação Internacional No. WO 93/13202), uma razão 1:1:100 (antigénio:adjuvante:bioadesivo) foi alcançado. O antigénio HA foi fornecido em solução numa concentração de cerca de 1 mg/ml. Os adjuvantes também foram fornecidos em solução em concentrações entre cerca de 1-3 mg/ml. Os bioadesivos hidroxipropil metilcelulose (HPMC), Carbopol, e policarbofil (B.F. Goodrich, Cleveland, Ohio) foram preparados por suspensão do produto em PBS para obter um gel a 0.5% m/m. Para facilitar a formação de bioadesivos, a solução de carbopol foi neutralizada com NaOH 0.2N a pH 7.2. Os três componentes foram misturados com agitação.

Foram divididos 30 coelhos em 4 grupos, como apresentado na Tabela 1. De modo a conseguir a dose adequada, foi administrado a todos os grupos as composições de teste intranasalmente usando um cateter de Teflon de 16 gauge.

Foi administrado o antigénio e adjuvante aos coelhos com ou sem bioadesivos em PBS num volume total de 250 µl por animal. As formulações foram administradas até aos 60 minutos de preparação.

Os coelhos receberam um reforço no dia 28. Os soros foram recolhidos e ensaiados para os níveis de IgG no soro anti-HA usando um ELISA. Os soros foram recolhidos em alíquotas de 5 ml nos 28 dias após a injeção imediatamente precedentes ao reforço (4wp1), 42 dias após a injeção (2 semanas após o reforço; 2wp2), e 56 dias após a injeção (4 semanas após o reforço; 4wp2).

Tal como pode ser verificado na Tabela 1 e Figura 1, os grupos de coelhos que foram administrados com o antigénio e adjuvante com carbopol ou HPMC tiveram títulos superiores aos dos coelhos que foram administrados apenas com o antigénio e adjuvante.

Tabela 1				
Grupo	Formulação	Títulos ELISA do soro anti-HA (28 dias)	Títulos ELISA do soro anti-HA (42 dias)	Títulos ELISA do soro anti-HA (56 dias)
1	LT-R72 (25 µg) + HA (25 µg)	17248 ± 8562	23350 ± 12188	77463 ± 19049
2	LT-R72 (25 µg) + HA (25 µg) + policarbofil (0.5% m/m)	34448 ± 16106	51851 ± 36537	76876 ± 43987
3	LT-R72 (25 µg) + HA (25 µg) + carbopol (0.5% m/m)	87951 ± 40543	160255 ± 78956	127882 ± 61443
4	LT-R72 (25 µg) + HA (25 µg) + HPMC (0.5% m/m)	17556 ± 9106	49985 ± 40641	36052 ± 10271

Assim, é descrito o uso de bioadesivos e adjuvantes para administrar os antigénios. As modalidades preferidas do objecto da invenção foram descritas com algum detalhe.

Lisboa, 14 de Dezembro de 2010

REIVINDICAÇÕES

1- Uma composição compreendendo pelo menos um bioadesivo, pelo menos um adjuvante e pelo menos um antigénio viral, caracterizada por o, pelo menos, um adjuvante compreender um mutante destoxificado LT-R72 ou LT-K63 duma toxina bacteriana ADP-ribosilada, em que o, pelo menos um, bioadesivo é um mucoadesivo seleccionado a partir de derivados de ligação cruzada do poli (ácido acrílico).

2- A composição, de acordo com a reivindicação N.º.1, caracterizada por o antigénio estar presente em cerca de 0.1% a 40% (m/m) de antigénio para bioadesivo, e o adjuvante estar presente em cerca de 0.1% a 40% (m/m) de adjuvante para bioadesivo.

3- A composição, de acordo com a reivindicação N.º.1, caracterizada por o derivado de ligação cruzada do poli (ácido acrílico) ser carbopol ou polycarbofil.

4- A composição, de acordo com qualquer reivindicação precedente, caracterizada por o, pelo menos um, adjuvante compreender ainda um adjuvante seleccionado a partir do grupo que consiste em alum, formulações de emulsões de óleo-em-água, e péptidos de muramil.

5- A composição, de acordo com qualquer reivindicação precedente, caracterizada por o antigénio viral ser um antigénio influenza.

6- A composição, de acordo com qualquer reivindicação precedente, caracterizada por o bioadesivo ser fornecido como uma microesfera.

7- A composição, de acordo com a reivindicação N.º.6, caracterizada por o antigénio ser encapsulado dentro da microesfera.

8- A composição, de acordo com a reivindicação N.º.6, caracterizada por o antigénio ser adsorvido à microesfera.

9- Uma composição farmacêutica, caracterizada por compreender a composição, de acordo com qualquer reivindicação precedente, e pelo menos um excipiente de mucosas farmaceuticamente aceitável.

10- Um método de realização de uma composição farmacêutica, caracterizado por compreender a combinação da composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações N°.1 a N°.8 e, pelo menos, um excipiente para mucosas farmaceuticamente aceitável.

11- A composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações N°.1 a N°.8, caracterizada por ser utilizada no uso num medicamento.

12- O uso de pelo menos um bioadesivo, pelo menos um adjuvante e pelo menos um antigénio viral, no fabrico de um medicamento para imunização de um sujeito vertebrado, caracterizada por o, pelo menos um, adjuvante compreender um mutante destoxificado LT-R72 ou LT-K63 duma toxina bacteriana ADP-ribosilada, e sendo o, pelo menos um, bioadesivo ser um mucoadesivo seleccionado a partir de derivados de ligação cruzada de poli (ácido acrílico).

Lisboa, 14 de Dezembro de 2010

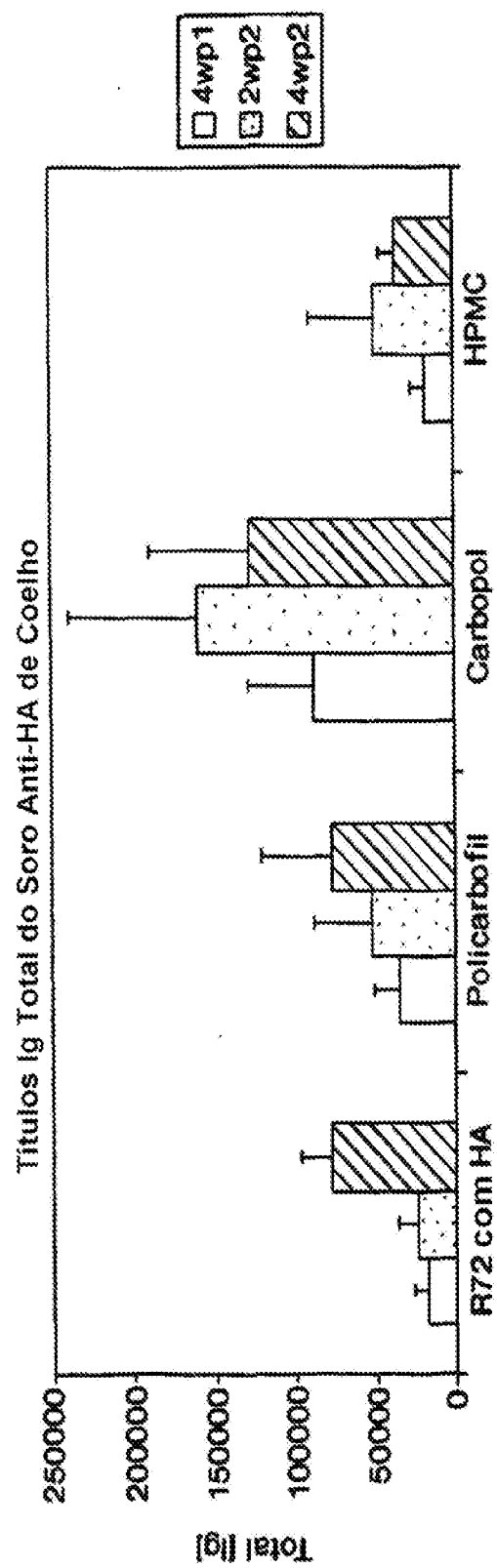


FIG. 1