



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

(21) PI0616978-3 A2



* B R P I 0 6 1 6 9 7 8 A 2 *

(22) Data de Depósito: 05/10/2006
(43) Data da Publicação: 05/07/2011
(RPI 2113)

(51) Int.CI.:
A61K 39/39 2006.01
A61K 39/395 2006.01
C07H 21/02 2006.01
C07K 14/52 2006.01

(54) Título: COMBINAÇÃO IMUNO-ESTIMULANTE PARA A PROFILAXIA E TRATAMENTO DE HEPATITE C, SUA UTILIZAÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE A CONTÉM, KIT PARA SUA ADMINISTRAÇÃO, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA RESPOSTA IMUNE E VACINA CONTRA O VÍRUS DA HEPATITE C

(30) Prioridade Unionista: 07/10/2005 ES P200502446, 09/06/2006 ES P200601563

(73) Titular(es): Proyecto de Biomedicina Cima, S.L.

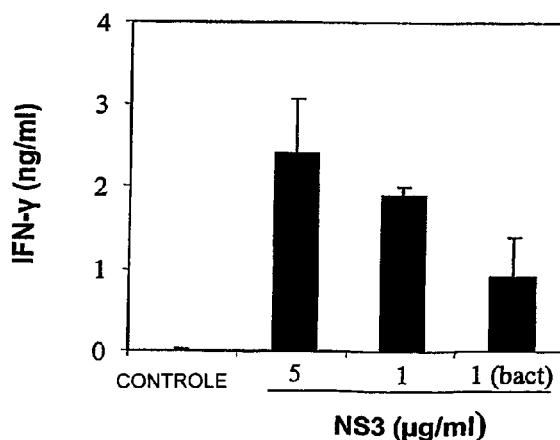
(72) Inventor(es): AINTZANE ZABAleta AZPIROZ, FRANCISCO BORRAS CUESTA, JESÚS PRIETO VALTUEÑA, JUAN JOSÉ LASARTE SAGASTIBELZA, PABLO SAROBE UGARRIZA

(74) Procurador(es): VIEIRA DE MELLO ADVOGADOS

(86) Pedido Internacional: PCT ES2006000554 de 05/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/042583de 19/04/2007

(57) Resumo: COMBINAÇÃO IMUNO-ESTIMULANTE PARA A PROFILAXIA E TRATAMENTO DE HEPATITE C, SUA UTILIZAÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE A CONTEM, KIT PARA SUA ADMINISTRAÇÃO, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA RESPOSTA IMUNE E VACINA CONTRA O VÍRUS DE HEPATITE C. A presente invenção refere-se a uma combinação imuno-estimulante para profilaxia e tratamento de hepatite, caracterizada pelo fato de que compreende um agonista de TLR3, um agonista de CD40 e a proteína NS3 do vírus de hepatite C. Além disso, a invenção refere-se a composições farmacêuticas que compreendem a dita combinação imuno-estimulante, ao seu uso e a um kit composto das ditas composições farmacêuticas. Finalmente, a presente invenção refere-se a um método para produzir uma resposta imune ao vírus da hepatite C e a uma vacina contra o dito vírus.



COMBINAÇÃO IMUNO-ESTIMULANTE PARA A PROFILAXIA E
TRATAMENTO DE HEPATITE C, SUA UTILIZAÇÃO, COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA QUE A CONTÉM, KIT PARA SUA ADMINISTRAÇÃO,
MÉTODO PARA PRODUZIR UMA RESPOSTA IMUNE E VACINA CONTRA

5

O VÍRUS DE HEPATITE C

Campo Técnico da Invenção

Refere-se a presente invenção a uma combinação imuno-estimulante para a profilaxia e tratamento de hepatite C, que incorpora a proteína NS3 de HCV, em conjunto com adjuvantes selecionados pela sua capacidade de induzirem respostas potentes e duradouras específicas de CD8+ e CD4+ contra o vírus HCV.

Estado da Técnica

Com uma preponderância mundial estimada atualmente em mais de 170 milhões de pessoas infectadas pelo vírus da hepatite C (HCV) isto implica em um peso do ônus para a saúde pública. E esta é uma preponderância que presumivelmente permanecerá invariável nos anos vindouros.

A infecção pelo HCV é caracterizada por uma alta tendência no sentido de cronicidade. O HCV persiste em 70% dos indivíduos infectados, 20% dos quais desenvolvem cirrose e 2,5% derivam para gerar câncer do fígado.

A atual ferramenta terapêutica de referência compreende protocolos terapêuticos baseados no uso de interferon. Não obstante, estas terapias antivírus são economicamente dispendiosas, relativamente tóxicas

e somente efetivas em 50-60% dos pacientes tratados. Portanto, é necessário e desejável desenvolver novas estratégias terapêuticas que sejam mais efetivas e melhor toleradas pelo paciente.

5 Uma consideração atualizada do HCV pode ser encontrada em Nature ("Insights: Hepatite C". Nature 2005, Supplements; Vol. 436, Nr. 7053, pp 929-978).

Muito embora, lamentavelmente, ainda não tenhamos uma vacina efetiva contra o vírus da hepatite C, existem dados experimentais e evidência que nos leva a pensar que é possível uma vacina efetiva. Muito embora anticorpos antivírus sejam sintetizados em resposta à infecção, o estado crônico é caracterizado pela ausência de imuno respostas celulares na parte das células T citotóxicas (CD8+) e células T auxiliares (CD4+). Assim, postula-se que a HCV desenvolveu estratégias que lhe permitem especificamente esquivar-se das imunes respostas antivírus, onde a potência e qualidade das respostas das citotóxicas T e das auxiliares T determinam se os pacientes se recuperarão (seja espontaneamente ou em resposta a um tratamento) ou se eles desenvolverão uma infecção crônica.

O objetivo principal de qualquer vacina é estimular a imunidade adquirida específica de antígeno, cujos mediadores são os linfócitos B e T. Neste contexto, as células que apresentam抗ígenos (APCs) desempenham uma função importante na iniciação das imunes respostas específicas e em particular na ativação de

linfócitos T. As APCs, principalmente as células dendríticas, capturam抗igenos nos órgãos periféricos e, depois de receberem um estímulo de ativação, elas migram para os órgãos linfáticos. Nesse caso, as células dendríticas apresentam na sua superfície, unidos às moléculas reais do complexo de histocompatibilidade principal MHC, os produtos peptídicos derivados da degradação dos抗igenos (epitopes), e simultaneamente produzem quimioquinas e citoquinas a fim de atrair e de ativar as células T. O processo de ativação de células dendríticas, também conhecido como maturação, é caracterizado por uma alta expressão de moléculas de MHC (sinal 1), moléculas co-estimuladoras (sinal 2) e citoquinas de polarização, tais como interleucina-12 (IL-12) (sinal 3). A maturação é induzida por fatores tais como componentes ou moléculas patogênicos do hospedeiro que são freqüentes nos processos de inflamação ou danificação de células. Estes fatores agem nas células dendríticas por intermédio de receptores específicos para Produtos derivados de microorganismos, tais como receptores do tipo TLR (receptores semelhantes a Toll), receptores para citoquinas (TNF- α , IL-1, IFN- α) ou receptores para ligantes nas superfícies das células (por exemplo, CD40).

O estímulo e ativação das diferentes populações de células T pelas APCs é restrinido pelo tipo de moléculas de MHC, por um lado, e pelo outro, pelas características dos epitopes que formam complexos com

aquelas moléculas de MHC. Assim, por exemplo, identificaram-se determinados fragmentos das proteínas virais que especificamente induzem a ativação de CD8+ T-Linfócitos citotóxicos (CTL), conhecidos como epítopes de linfócitos ou T-células CD8+ ou epítopes CD8+; ou epítopes que induzem especificamente a ativação de T-Linfócitos auxiliares CD4+ (HTL), epítopes CD4+. A base de dados "HCV Immunology Database" (<http://hcv.lanl.gov/content/immuno/immuno-main.html>) promove a compilação dos epítopes para T-Linfócitos, ambos dos CD8+ CTL e dos CD4+ HTL, identificados na base de proteínas virais de diferentes variedades e isolados do vírus da hepatite C.

O desenvolvimento de protocolos de imunização baseados no uso de epítopes na forma de peptídeos requer, desta forma, a seleção prévia daqueles peptídeos que são adequados para cada indivíduo, na dependência do moléculas de MHC que eles apresentam. Isto subentende que, na dependência do MHC de cada indivíduo, terá de ser escolhida uma combinação de peptídeos particular que seja capaz de comportar-se como epítopes nesse contexto. O uso de antígenos amplos permite que este problema seja superado, uma vez que eles são normalmente poliepitópicos e dentro de sua seqüência eles apresentam vários epítopes, os dois para CD8+ CTL e para CD4+ HTL, que podem ser apresentados por moléculas de MHC de diferentes indivíduos. Desta maneira, um único antígeno pode ser usado como uma vacina em indiví-

duos com MHC diferentes.

Dentro das diferentes proteínas de HCV, o núcleo e NS3 apresentam grande imunogenicidade e naqueles indivíduos que se refazem da infecção, são detectadas 5 potentes respostas de CD8+ CTL e de CD4+ HTL contra elas. Não obstante, existem dados que mostram que o núcleo também pode ter efeitos prejudiciais para as células do sistema imune, quando ele fica em contacto com elas, o que o torna desaconselhável como um antígeno em 10 estratégias de vacinação. Por outro lado, a NS3 é uma proteína que dificilmente demonstrou este tipo de efeito e poderia ser uma boa candidata como um antígeno para a indução de respostas de CD8+ CTL e CD4+ HTL.

As CD4+ HTL desempenham uma função na imunidade adquirida, entre outros mecanismos por meio de 15 ativação de APC, ativação de CTL e indução de memória. Em particular, descreveu-se que as células CD4+ específicas para HCV são necessárias para manutenção de CATALISADOR antivírus (Grakoui A. et al., "HCV persistence 20 e immune evasion in the absence of memory T-cell help"; Science, 2003; 302: 659-662). Portanto, uma vacina eficaz contra o vírus da hepatite C tem de proporcionar a potência máxima na indução não apenas de respostas de CD8+ CTL, mas também de respostas de CD4+ HTL. Uma vacina destas irá, portanto, requerer uma seleção de antígenos específicos que proporcionarão essas respostas. 25

Não obstante, não parece que uma combinação de antígenos pode, por si mesma, ser capaz de pro-

porcionar uma vacina eficaz contra o HCV. Considerando-se que a maturação de células dendríticas constitui um requisito para a iniciação eficaz e ativação de T-Linfócitos, uma vacina destas poderia beneficiar-se da inclusão na combinação imune-estimulante de alguns adjuvantes, que estimulariam a maturação das células dendríticas. Como adjuvantes, poderiam utilizar-se os ligantes dos receptores de TLR, de receptores de citoquinas ou de receptores para ligantes intercelulares já citados, ou melhor, ainda uma combinação sinérgica desses adjuvantes.

Assim, por exemplo, o US2004/0141950 descreve combinações imune-estimulantes que incluem um antagonista de TLRs e um antagonista de moléculas das superfamílias do fator de necrose de tumor (TNF) ou de seus receptores (TNFR), que também podem incluir um antígeno. Entre as numerosas combinações possíveis ele apresenta a combinação de um ligante de CD40 (um anticorpo anti-CD40) e de poli(I:C), um ligante sintético de TLR3, uma combinação para a qual um efeito sinérgico é demonstrado na expansão de CD8+ T-Linfócitos. De forma assemelhada, Ahonen *et al.*, (J. Exp. Med. 2004; 199: 775-784) apresentam dados na capacidade sinérgica de agonistas de TLR/CD40 para induzirem a expansão e diferenciação de CD8+ CTL específico de抗ígenos de uma maneira que é independente dos CD4+ T-Linfócitos. Muito embora estes trabalhos descrevam a capacidade da TLR/CD40 para ativar CD8+ T-Linfócitos de memória espe-

cífica de antígenos, os ditos trabalhos não permitem estabelecer-se se a combinação de agonistas TLR/CD40 também pode intensificar as respostas de CD4+ HTL.

No caso de infecção por HCV, encontraram-se diferenças claras nas respostas de CD4+ HTL quando pacientes infectados são comparados a pacientes que não foram capazes de eliminar a infecção. Não obstante, muito embora com menor intensidade do que em pacientes curados, as respostas de CD8+ CTL são ainda suscetíveis de ser detectadas nos pacientes infectados. Conseqüentemente, muito embora os CTL se comportem como uma população de órgão motor importante no aclaramento da infecção de HCV, as células de CD4+ também desempenham uma função importante no controle da enfermidade. Além disto, descreveu-se que a indução de CD4+ T-Linfócitos é importante para a manutenção das respostas de CATALISADOR antivírus (Grakoui A. et al., "HCV persistence e immune evasion in the absence of memory T-cell help"; Science, 2003; 302: 659-662). Estes dados sugerem que para a vacinação e terapia de enfermidades virais devidas a HCV, a indução de respostas antivírus potentes e prolongadas, tanto de CD8+ quanto de CD4+, é importante.

Constitui, portanto, o objetivo da presente invenção selecionar combinações imune-estimulantes de antígenos e adjuvantes adequados para a profilaxia e tratamento de hepatite C, que proporcionará um estímulo de respostas tanto de CD8+ quanto de CD4+ que são mais

potentes, completas e prolongadas.

Descrição Detalhada da Invenção

Um primeiro objetivo da invenção refere-se a uma combinação imuno-estimulante para profilaxia e tratamento de hepatite C, doravante referida como a combinação imuno-estimulante da invenção, que compreende um agonista de TLR3, um agonista de CD40 ou uma sequência de DNA que o codifica, e um polipeptídio que compreende a proteína NS3 do vírus da hepatite C, ou um fragmento da dita proteína NS3 com capacidade para induzir respostas de CD8+ e CD4+.

Um "agonista de TLR3" refere-se a um ligante que pode ser combinado ou unido aos receptores de TLR3 ("receptor 3 semelhante a portagem") e produz uma resposta celular. O TLR3 é um receptor para RNA trançado duplo que transmite sinais, os quais ativam NF- κ B e a produção de interferons (IFN) do tipo I (IFN- α e IFN- β) e que estimula a maturação das células dendríticas. Camundongos deficientes em expressão de TLR3 mostraram uma redução nas suas respostas a poli(I:C) - um ligante de TLR3 similar ao RNA trançado duplo gerado durante a replicação de vírus do tipo HCV -, juntamente com resistência ao efeito letal de poli(I:C) quando sensibilizado com D-galactosamina e uma redução na produção de citoquinas inflamatórias (Alexopoulou et al. Nature, 2001, Vol. 413, pp. 732-738). Em uma concretização particular da invenção, o dito ligante de TLR3 pode ser um RNA trançado duplo viral ou uma cadeia du-

pla de ácido poliinosínico-policitidílico, poli(I:C).

Um "agonista de CD40" refere-se a um ligante, o qual pode ser combinado ou unidos aos receptores de CD40 induzindo similarmente uma resposta celular. A CD40 é uma molécula expressada na membrana de diferentes tipos de células, tais como B-Linfócitos ou células que apresentam抗igenos (macrófagos, células dendríticas, e assemelhadas). O ligante natural de CD40 (CD40L ou CD154) é expresso principalmente em T-Linfócitos que foram ativados em seguida ao reconhecimento do抗igeno. A interação de CD40L com CD40 presente na célula apresentadora de抗igeno induz uma maturação da última. Este fenômeno, de uma maneira assemelhada aos estímulos provenientes dos agentes patogênicos, faz com que a célula apresentadora de抗igeno tenha uma capacidade maior para induzir respostas imunológicas. Desta forma, o agonista de CD40 da composição imuno-estimulante da invenção refere-se, por um lado, ao ligante de CD40L ou a um fragmento dessa CD40L que conserva a capacidade para unir-se a CD40 e induzir uma resposta celular ou imuno. Em uma concretização particular, o ligante pode ser um anticorpo específico para CD40 (anti-CD40) ou um fragmento do mesmo que conserva a capacidade para unir-se a CD40. Além disto, o ligante de CD40 ou seu fragmento pode estar presente na combinação imuno-estimulante, seja na forma de proteína ou também como um ácido nucléico recombinante (DNA) o qual codifica este ligante, por exemplo, em um vetor.

viral para transferência ou terapia de gene.

Um "antígeno" refere-se a qualquer substância que é capaz de induzir uma resposta imuno, tanto humoral quanto celular, no organismo de um indivíduo 5 (homem ou um animal), ou que pode induzir uma resposta imuno celular (expansão, ativação e/ou maturação de células imuno, produção de citoquinas, ou anticorpos) quando ele entra em contacto com células de imunização. Em particular, um antígeno pode ser uma proteína viral, 10 um peptídio ou um fragmento da dita proteína viral, uma proteína recombinante dessas proteínas virais, ou mesmo um peptídio sintético capaz de induzir as respostas sinalizadas.

O "epítope indutor de CD8+" refere-se a um 15 fragmento ou cadeia de polipeptídios parcial de um antígeno que é capaz de induzir especificamente a ativação a ativação of T-Linfócitos citotóxicos CD8+ (CTL). Um "epítope indutor de CD4+" refere-se a um fragmento de cadeia de polipeptídio parcial de um antígeno que é 20 capaz de induzir especificamente a ativação de T-Linfócitos auxiliares CD4+ (HTL).

A "proteína NS3" refere-se à proteína NS3 não-estrutural do vírus da hepatite C, uma proteína de 67 kDa que inclui 2 domínios, uma serin-proteínaase que 25 cobre 189 aminoácidos da extremidade N-terminal e um domínio com atividade de helicase-nucleoside trifosfatase que cobre 442 aminoácidos da extremidade terminal C. A seqüênciā da proteína NS3 incluída no polipeptí-

dio da combinação imuno-estimulante da invenção pode corresponder a qualquer variedade ou isolado do vírus da hepatite C, em particular qualquer variedade ou isolado do vírus da hepatite C humano. Em uma concretização particular, o polipeptídio, o qual compreende a proteína NS3, foi obtido por meio de tecnologia recombinante. Em uma concretização não-limitativa específica da invenção, uma proteína NS3 recombinante é usada com uma seqüência SEQ ID. NO: 1 (correspondente aos números de Genebank Accession DQ068198.1 e AAY84763.1, VRL 28-NOV-2005). Os inventores usaram também outra seqüência de proteínas de recombinação SEQ ID. NO: 2 (correspondente ao número Genebank Accession D90208).

Em outra concretização alternativa da invenção, é possível também utilizar um polipeptídio que compreende um fragmento da proteína NS3, de uma maneira tal que o dito fragmento é capaz de induzir respostas de CD4+ e CD8+. Portanto, o dito fragmento terá de incluir pelo menos um epítope indutor de CD8+ e um epítope indutor de CD4+.

Em uma concretização específica, a combinação imuno-estimulante da invenção compreende poli(I:C), um anticorpo anti-CD40, e um polipeptídio que contém a proteína NS3.

Em uma concretização preferida da invenção, a combinação imuno-estimulante possui todos os componentes que formam parte da mesma composição farmacêutica, onde cada um dos componentes está presente em

quantidades farmaceuticamente aceitáveis. Além disso, a invenção também se refere à dita composição farmacêutica.

Em outra concretização específica da presente invenção, os componentes da combinação imuno-estimulante são para ser encontrados fazendo parte de pelo menos duas composições farmacêuticas. De forma assemelhada, a invenção refere-se ao uso da dita combinação imuno-estimulante caracterizado por as ditas composições farmacêuticas serem administradas simultaneamente. Em outra concretização da invenção, o uso da dita combinação imuno-estimulante é caracterizado pelo fato de que as ditas composições farmacêuticas são administradas em momentos diferentes, por meio da mesma via de administração ou por meio de vias diferentes. Desta forma, uma concretização específica da invenção refere-se a um kit para a administração da combinação imuno-estimulante descrita anteriormente, caracterizado por compreender pelo menos duas composições farmacêuticas diferentes.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método para produzir uma imuno resposta ao vírus da hepatite C, caracterizado pelo fato de consistir em administrar uma combinação estimuladora definida anteriormente, em uma quantidade efetiva para induzir uma imuno resposta. Em uma concretização preferida, o método da invenção consiste de um tratamento profilático. Em uma concretização de maior preferência, o método da

invenção consiste de um tratamento terapêutico.

Finalmente, a invenção também se refere a uma vacina contra o vírus da hepatite C, caracterizada pelo fato de compreender uma combinação imuno-
5 estimulante definida anteriormente e que constitui o objeto desta invenção.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1. Imanização com anti-CD40 e poli(I:C) em conjunto com a proteína NS3 induz respostas multi-epitópicas CD4+ e CD8+ T. Camundongos HHD (dois por grupo) foram injetados com 50 g de anti-CD40 (i.p.). Quatro horas mais tarde, eles foram injetados com 50 g de poli(I:C) (i.v.) e 500 g de proteína NS3 de recombinação (i.p.) (SEQ. ID. NO: 1). Seis dias depois, os animais foram sacrificados e as passarinhos foram extraídas para seu estímulo *in vitro* com diferentes抗ígenos e a análise da resposta de imunização induzida. (A) As células foram estimuladas durante cinco dias com os epítopes CD8+ 1073, 1406 ou 1038 (10 µM) na presença de IL-2. Depois disso, para cada grupo de passarinhos a resposta lítica foi medida quanto às células visadas que foram carregadas (peptídio; barras pretas) ou não (controle; barras brancas) com o peptídio correspondente. Os resultados obtidos foram ilustrados com uma proporção de órgão motor:alvo de 100:1.
20 B) Da mesma maneira, as passarinhos foram cultivadas com diferentes concentrações (0,1-10 µM) dos peptídios 1073 (círculos pretos), 1406 (triângulos brancos) ou
25 1038 (hexágonos pretos).

1038 (triângulos pretos), e na cultura dos sobrenadantes obtidos depois de 48 horas de estímulo o teor de IFN- γ foi medido por meio de ELISA. (C) As passarinhas também foram estimuladas durante 48 h com 5 ou 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ da proteína NS3 usada na imunização (SEQ. ID. NO: 1), com 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ da proteína NS3 produzida nas bactérias (SEQ. ID. NO: 3), ou com meio de cultura (controle) a fim de medir a resposta de CD4+. Em seguida a este período de tempo, os sobrenadantes foram coletados e por meio de ELISA mediu-se a quantidade de IFN- γ produzido.

Figura 2. Medição da quantidade de proteína NS3 necessária para induzir respostas de CD4+ e CD8+ T na imunização com poli(I:C) e anti-CD40. Camundongos HHD (dois por grupo) foram imunizados com proteína NS3 (SEQ. ID. NO: 1) (500, 250, 125 ou 25 $\mu\text{g}/\text{camundongo}$) em conjunto com poli(I:C) e anti-CD40, seguindo-se o protocolo descrito na Figura 1. Igualmente incluído foi um grupo de controle imunizado da mesma maneira, o qual usou como antígenos 5 μg de NS3 (SEQ. ID. NO: 1) e 50 μg dos peptídeos 1073 e 1038, juntamente com poli(I:C) e anti-CD40. Seis dias mais tarde os animais foram sacrificados e as passarinhas foram extraídas e estimuladas com diferentes抗ígenos (A). A fim de se medir a resposta lítica induzida as células foram estimuladas durante cinco dias com a epítope CD8+ 1073 (10 μM) e IL-2. Depois disso, esta resposta foi medida confrontando-se diferentes quantidades de células de órgão mo-

tor contra um número fixo de células visadas carregadas com os peptídeos. Além disso, a resposta de CD8+ que tinha sido induzida também foi analisada por meio da produção de IFN- γ . Para fazer isto, as células foram estimuladas com diferentes concentrações de peptídeos 1073 (B) e 1038 (C). As células foram estimuladas com a proteína NS3 (SEQ. ID. NO: 1) (D), a fim de quantificar a resposta de CD4+. Depois de 48 horas, mediu-se a quantidade de IFN- γ presente nos sobrenadantes.

Figura 3. Imunização com poli(I:C) e o anti-CD40 em conjunto com a proteína NS3 induz respostas de CD4+ e CD8+ em outras variedades de camundongos com MHC diferentes. Camundongos C57BL6 (que tinham moléculas MHC do tipo H-2b) (dois por grupo) receberam uma (quadrados brancos) ou duas (quadrados pretos) imunizações com 100 μ g de NS3 (SEQ. ID. NO: 1) em conjunto com poli(I:C) e anti-CD40, seguindo-se o protocolo indicado na Figura 1. Seis dias depois, os animais foram sacrificados e as passarinhos foram cultivadas com抗ígenos diferentes com a finalidade de medir as respostas de CD8+ e CD4+ induzidas. A epitope de restrição H-2 Db 1629-1637 (GAVQNEVTL) (SEQ. ID. NO: 7) foi usada para estimular as passarinhos e medir as respostas de CD8+ (A). A proteína NS3 (SEQ. ID. NO: 1) (B) foi usada como estímulo para determinação da resposta de CD4+. Depois de dois dias de cultura, os sobrenadantes foram coletados e a quantidade de IFN- γ produzida foi medida.

Figura 4. Imunização com proteína NS3 em

conjunto com poli(I:C) e anti-CD40 induz respostas de CD8+ capazes de reconhecerem células que expressam proteínas do HCV. (A) Camundongos HHD (dois por grupo) foram injetados com 100 µg de proteína NS3 (SEQ. ID. NO: 2) mais poli(I:C) e anti-CD40 conforme indicado na Figura 1. Seis dias depois, os animais foram sacrificados e suas passarinhas foram estimuladas com células T1/HCVcon (células T1 transfectadas com um plasmídio que expressa as proteínas do HCV) tratadas com mitomicina, na presença de IL-2. Depois de 5 dias de estímulo, mediu-se a capacidade das passarinhas reconhecerem as células T1/HCVcon em ensaios de atividade lítica. Para fazer isto, diferentes quantidades de passarinhas foram confrontadas com um número fixo de células T1/HCVcon (círculos pretos) ou células de controle T1 sem serem transfectadas (círculos brancos).

Figura 5. Imunização com poli(I:C) e anti-CD40 em conjunto com proteína NS3 induz respostas duradouras de T CD4+ e CD8+. Camundongos HHD (dois por grupo) foram injetados com 100 µg de proteína NS3 (SEQ. ID. NO: 2) mais poli(I:C) e anti-CD40 conforme indicado na Figura 1. Duas semanas mais tarde, os animais receberam uma segunda imunização sob as mesmas condições. Sessenta dias depois da segunda imunização os animais foram sacrificados e as suas passarinhas foram extraídas para se estudar a resposta duradoura de CD8+ e CD4+ T. (A) As passarinhas foram estimuladas com o epítope CD8+ 1073 (10 µM) ou na ausência de antígeno, e 48 ho-

ras mais tarde os sobrenadantes da cultura foram cole-
tados para se medir a quantidade de IFN-γ produzido.
(B) As passarinhas foram cultivadas durante 5 dias com
o peptídio 1073 (10 µM) e IL-2 e estudou-se, então,
5 sua capacidade para lisar as células visadas carregadas
com o peptídio 1073. Para fazer isto, diferentes quan-
tidades de células de órgão motor foram confrontadas
com um número fixo de células visadas carregadas com o
peptídio 1073 (círculos pretos) ou não carregadas com
10 peptídio (círculos brancos). (C) A resposta de CD4+
foi estudada por meio de estímulo das passarinhas com a
proteína NS3 (1 µg/ml) (SEQ. ID. NO: 2) ou com ausência
de antígeno. Depois de 48 horas, os sobrenadantes fo-
ram coletados e mediu-se a quantidade de IFN-γ produzi-
15 do.

Modalidade de Concretização da Invenção

Os exemplos seguintes, sem serem de forma
alguma limitativos, ajudam a ilustrar a concretização
da invenção que constitui o presente pedido de patente.

20 Material Relativo e Métodos

Epítopes, antígenos e reagentes

Os peptídios ou epítopes usados foram sin-
tetizados manualmente em um sintetizador de múltiplos
peptídeos utilizando-se química Fmoc (Wellings DA. e
25 Atherton E. Methods Enzymol 1997; 289: 44-67). Utili-
zou-se o teste de ninhidrina de Kaiser para monitorar
cada etapa. Ao final da síntese eles foram emendados e

desprotegidos com ácido trifluoroacético e lavados com dietil éter. A pureza dos peptídios foi o tempo todo mais alta do que 90% determinada por HPLC.

Tabela 1. Peptídeos e epítopes sintetizados e usados
5 nos exemplos.

Peptídio ou Epítope	Seqüência
1038-1047	GLLGCIITSL; SEQ. ID. NO: 4
1073-1081	CVNGVCWTV; SEQ. ID. NO: 5
1406-1415	KLVALGINAV; SEQ. ID. NO: 6
1629-1637	GAVQNEVTL; SEQ. ID. NO: 7

A numeração do peptídio ou epítope refere-se à sua posição de CVH relativa, tomando como referência a seqüência completa na variedade H de hepatite C humana que é usualmente tomada como o protótipo (GeneBank Accession Number M67463). Desta forma, por exemplo, a base de dados "HCV Immunology Database" (<http://hcv.lanl.gov/content/immuno/immuno-main.html>) compila os epítopes para T-Linfócitos, tanto dos T-Linfócitos citotóxicos, quanto dos T-Linfócitos auxiliares, identificados nas proteínas virais de diferentes variedades e isolados do vírus da hepatite C, todos elas também ordenados de acordo com a sua posição relativa com relação à variedade H do vírus de acordo com a referência de GeneBank estabelecida.

Como agente imunogênico utilizou-se um po-

lipeptídio de recombinação de 655 aminoácidos o qual contém a seqüência completa de uma proteína NS3 (SEQ. ID. NO: 1; número de acesso do Genebank AAY84763.1, VRL 28-NOV-2005; 631 aminoácidos). Da mesma maneira que os 5 631 aminoácidos da proteína NS3, o polipeptídio também inclui uma ponta com uma seqüência c-myc, para detecção com o anticorpo monoclonal anti-myc, e uma ponta de Histidinas. A proteína foi produzida em Pichia pastoris. Ela é mantida em suspensão em uma solução de Tris 10 22,5 mM / Urea 3,76 M / NaCl 300 mM. A proteína foi purificada por meio de cromatografia de coluna de Ni.

Outro polipeptídio de recombinação também foi usado como agente imunogênico, o qual contém os 635 aminoácidos que compreendem a seqüência completa de uma 15 proteína NS3 (SEQ. ID. NO: 2; número de acesso Genebank D90208). Da mesma maneira que os aminoácidos correspondentes a NS3, a poliproteína também inclui uma ponta de Histidinas para a sua purificação. A seqüência de DNA correspondente a NS3 foi obtida por digestão com 20 Sal I e Not I do plasmídio gWIZ, que continha a seqüência de NS3 (fornecida por Dr. G. Inchauspe, Lyon, France). O produto da digestão foi克lonado entre os locais BsrG I e Not I do plasmídio pET-45 (+) (Novagen, Madison WI). Ele foi expresso com E. coli e purificado por 25 meio de cromatografia de afinidade em uma coluna de níquel seguida por cromatografia por permuta iônica.

De maneira assemelhada, para os ensaios *in vitro* utilizou-se como antígeno um polipeptídio de re-

combinação (Mikrogen; número de catálogo 94302), o qual contém os últimos 20 aminoácidos da proteína não-estrutural NS2 e os primeiros 508 aminoácidos da proteína NS3 do HVC (SEQ. ID. NO: 3).

5 Como agonista de TLR3 utilizou-se poli(I:C) obtido a partir da Amersham (número de catálogo 27-4732-01).

10 Como agonistas de CD40, utilizaram-se anticorpos anti-CD40, purificados a partir do hibridoma FGK-45 (Rolink A. et al., Immunity 1996. 5: 319-330).

Todos os reagentes continham <1 unidade de endotoxina per mg de produto, determinada por meio do ensaio de lisado QCL-1000 do límulo amebócito (Bio Whittaker).

15 *Camundongos*

Camundongos C57B1/6 de seis a oito semanas foram obtidos a partir da Harlan. Também foram usados camundongos HHD, transgênicos para moléculas humanas HLA-A2.1 (Pascolo S. et al., J. Exp. Med. 1997. 185: 2043-2051). Todos os animais foram mantidos sob condições isentas de agentes patogênicos e foram tratados de acordo com as regras da instituição.

Linhos de células

Utilizaram-se células T2 (Salter R. et al. 25 Immunogenetics, 1985 21: 235-246) como células alvo para ensaios de liberação de cromo com T-Linfócitos (CTL) citotóxicos provenientes de camundongos HHD.

Utilizaram-se células T1, transfetadas

com um plasmídio carreador da região de codificação do HCV (células T1/HCVcon), para os ensaios de reconhecimento de células que expressaram as proteínas do HCV. Estas células foram proporcionadas pelo Dr. D. Moradpour (Freiburg, Germany; Volk B. et al., J Gen Virol. 2005; 86: 1737-1746). Também foram usadas células T1 sem transfecção (ATCC, No. de catálogo CRL-1991) como controle.

Todas as células foram desenvolvidas em meio completo (RPMI 1640 10% de soro bovino fetal, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2 mM de glutamina e 50 µM de 2-mercaptopetanol). A cultura da linha T1/HCVcon também continha 2 mg/ml de G418 (Gibco).

15 Imunização

Grupos de dois camundongos foram imunizados por meio da via i.p. com 50 µg de anti-CD40. Quatro horas depois, eles foram injetados com 50 µg de poli(I:C) (i.v.) e diferentes quantidades dos抗igenos: Proteína NS3 ou misturas de NS3 com peptídeos (i.p.).

Estímulo de células esplênicas para a produção de citoquinas

Células esplênicas foram resuspensas em meio completo e chapeadas a 8 x 10⁵ células/cavidade em 0,2 ml em placas de 96 cavidades com fundo em forma de "U", na ausência ou presença de peptídeos ou da proteína NS3 de recombinação do HCV.

Dois dias depois, os sobrenadantes foram coletados para medição da presença de IFN- γ por meio de ELISA (BD-Pharmingen), seguindo-se as instruções do fabricante.

5 *Medição da atividade lítica de CTL*

Com a finalidade de se medirem as respostas de CTL, as passarinhos provenientes dos animais imunizados foram incubadas com peptídeos (10 μ M) durante 2 horas a 37°C, lavadas duas vezes e cultivadas em placas 10 de 24 cavidades com uma confluência de 7,5 x 106 células/cavidade. Em experiências conduzidas para se medir o reconhecimento das células T1/HCVcon, cultivaram-se 7,5 x 106 passarinhos de camundongos HHD com 7,5 x 105 de células T1/HCVcon previamente tratadas com Mitomycin 15 C (Sigma). Em todos os casos, dois dias depois, adicionaram-se 2,5 U/ml de IL-2 (Boehringer-Mannheim GmbH, Germany) às cavidades e 5 dias mais tarde as células foram recuperadas com a finalidade de realizar ensaios de liberação de cromo.

20 A atividade lítica foi medida por incubação de quantidades diferentes de células de órgão motor durante 4 horas com 3000 células alvo T2 previamente carregadas com ^{51}Cr , com e sem peptídio (alvo). No caso de células estimuladas com T1/HCVcon, as células de 25 órgão motor foram confrontadas com T1/HCVcon ou T1, previamente carregadas com ^{51}Cr . Os sobrenadantes da cultura foram coletados depois de 4 horas de incubação.

A percentagem de lise específica foi cal-

culada de acordo com a fórmula:

$$\text{(cpmexperimental} - \text{cpmespontânea}) / (\text{cpmmáxima} - \text{cpmespontânea}) \times 100$$

em que a lise espontânea (medida como cpm espontânea) corresponde às células alvo incubadas na ausência de 5 células de órgão motor, e a lise máxima (cpm máxima) é obtida por incubação das células alvo com 5% Tritonx100.

EXEMPLO 1

A imunização com anti-CD40 e poli(I:C) em conjunto com 10 uma proteína NS3 induz respostas de CD4+ e CD8+ T multi-epitópicos.

A imunização com anti-CD40 e poli(I:C) mostrou por si mesma ser muito eficiente para a indução de respostas de CD8+ por meio da utilização, como agentes imunogênicos, de peptídeos sintéticos que representam epítopes de células CD8+. Muito embora esta estratégia induza respostas potentes, foi demonstrado que quando ela é co-imunizada com pequenas quantidades de proteína NS3 (5 µg/camundongo), que induz resposta de 20 CD4+, ela aumenta a magnitude da resposta de CD8+ e também aumenta a resposta de CD8+ de alta afinidade, em outras palavras, aquela que reconhece baixas concentrações de antígeno. Além disso, a imunização com peptídios é apenas efetiva naquelas pessoas que possuem moléculas de HLA da mesma restrição que os epítopes escondidos. Com o objetivo de atacar estes dois pontos, realizou-se um estudo de se imunização com maiores 25 quantidades de proteína NS3 de recombinação seria capaz

de induzir respostas, não apenas de CD4+, mas também de CD8+. Para fazer isto, camundongos foram imunizados com NS3 juntamente com poli(I:C) e anti-CD40, e as respostas induzidas foram estudadas. Desta forma, camundongos HHD (dois por grupo) foram injetados i.p. com 50 µg de anti-CD40. Quatro horas mais tarde, eles foram injetados com 50 µg de poli(I:C) (i.v.) e 500 µg de proteína NS3 de recombinação (i.p.) (SEQ. ID. NO: 1). Seis dias mais tarde, os animais foram sacrificados e 10 as passarinhos foram extraídos. Com o objetivo de analisar a capacidade de NS3, quando o adjuvante poli(I:C) + anti-CD40 é formulado para induzir respostas de CD8+ e CD4+ T, as passarinhos foram estimuladas *in vitro* com抗ígenos diferentes que ativam especificamente estas 15 populações de células. (A) Com a finalidade de analisar as respostas de CD8+, em uma primeira experiência as passarinhos foram estimuladas durante cinco dias com os epítopes CD8+ 1073, 1406 ou 1038 na presença de IL-2. Depois disso, para cada grupo de células estimuladas com um peptídio, a sua capacidade foi medida para 20 efetuar a lise das células alvo que foram carregadas com o correspondente peptídio (barras pretas) ou para controlar células alvo sem peptídio (barras brancas). A Figura 1A mostra os resultados obtidos com uma relação órgão motor:alvo de 100:1. (B) A resposta de CD8+ 25 induzida depois de imunização com NS3 também foi analisada por meio de estudo da produção de IFN-γ no sentido dos mesmos epítopes de CD8+. Para fazer isto, as pas-

sarinhas foram cultivadas com quantidades diferentes de 1073 (círculos pretos), 1406 (triângulos brancos) ou 1038 (triângulos pretos). Depois de 48 horas de cultura, os sobrenadantes foram coletados e mediu-se o conteúdo de IFN- γ . (C) Com o objetivo de analisar a resposta de CD4+ induzida, as passarinhas foram estimuladas com a proteína NS3 usada na imunização (SEQ. ID. NO: 1). Também, as células foram estimuladas com proteína NS3 comercial produzida na bactéria (SEQ. ID. NO: 3). Da mesma maneira que no ponto anterior, o grau de ativação foi medido por meio da produção de IFN- γ .

Antes de qualquer coisa, foi possível checar que este antígeno foi capaz de induzir respostas de CD8+, que puderam ser detectadas tanto nos ensaios de liberação de cormo (Figura 1A) quanto por meio da indução da produção de IFN- γ (Figura 1B). Além disso, esta resposta foi multi-epitópica, sendo dirigida no sentido de vários epítopes de CD8+, que foram caracterizados dentro da seqüência de NS3 (por exemplo: peptídeos 1073, 1406 e 1038). Finalmente, também foi confirmado que foi capaz de induzir respostas de CD4+, que reconheceram a proteína NS3 usada na imunização e a proteína NS3 comercial produzida na bactéria (Figura 1C). A resposta no sentido desta última foi mais baixa, presumivelmente devido ao fato de que existiram algumas alterações na seqüência das duas proteínas e que a proteína expressada nas bactérias foi mais curta, com o que ela poderia perder alguns epítopes reconhecidos pelos

CD4+ T-Linfócitos.

EXEMPLO 2

A administração de 25 µg de recombinante NS3 em conjunto com poli(I:C) e anti-CD40 é suficiente para induzir
5 respostas de CD4+ e CD8+ T.

A partir de experiências anteriores os inventores souberam que com 5 µg de NS3 foram induzidas respostas de CD4+, mas não de CD8+, e portanto desejaram descobrir a quantidade mínima de NS3 que seria suficiente para induzir respostas de CD8+. Com esta finalidade, imunizaram-se camundongos HHD com 500, 250, 125 e 25 µg de NS3 (SEQ. ID. NO: 1). Também incluído como controle estava um grupo imunizado com peptídeos correspondentes aos epítopes CD8+, que induziriam respostas de CD8+, mais 5 µg de NS3 (SEQ. ID. NO: 1), que induziria respostas de CD4+. Para isto, em cada grupo de animais imunizados com uma dose de NS3 conduziu-se uma análise da resposta de CD8+ e da resposta de CD4+. A resposta de CD8+ foi analisada como a capacidade ligar células alvo carregadas com o epítope CD8+ 1073 (Fig. 2A), juntamente com a capacidade de produzir IFN-γ com relação às diferentes concentrações dos epítopes CD8+ 1073 (Figura 2B) e 1038 (Figura 2C). As respostas de CD4+ foram medidas por meio da capacidade de produzir IFN-γ com relação a diferentes concentrações de NS3 (SEQ. ID. NO: 1) (Figura 2D). Esta experiência demonstrou que todas as quantidades de NS3 ensaiadas foram capazes de induzir respostas de CD8+, quando as res-

postas líticas ao peptídio 1073 foram estudadas (Figura 2A), com a dose de 25 µg sendo aquela que induziu a resposta de intensidade mais fraca. Além disso, todas as doses foram capazes de induzir a produção de IFN-γ 5 com relação aos epítopes 1073 (Figura 2B) e 1038 (Figura 2C), que indicaram que a capacidade de induzir respostas multi-epitópicas foi mantida mesmo quando as doses foram reduzidas. Finalmente, e como era esperado, todas elas induziram respostas de CD4+. Considerando- 10 se que, na maior parte dos casos, a resposta induzida foi menos quando se utilizaram 25 µg de NS3, para experiências posteriores escolheu-se uma dose de 100 µg/camundongo, dose essa a partir da qual não se observou aumento na indução de respostas.

15 EXEMPLO 3

A imunização com poli(I:C) e anti-CD40 em conjunto com uma proteína NS3 induz respostas de CD4+ e CD8+ em outras variedades de camundongos com diferentes MHC.

Considerando-se que em um antígeno tão amplo quanto uma proteína NS3, é possível encontrar epítopes de CD4+ e CD8+, que podem ser apresentadas por diferentes moléculas de MHC, foi estudada a capacidade deste protocolo de imunização para induzir respostas de CD4+ e CD8+ em outra variedade de camundongo com diferentes moléculas de MHC. Para isto, camundongos C57/B16, que têm moléculas de MHC de restrição a H-2b, foram imunizados com 100 µg de NS3 (SEQ. ID. NO: 1). Com a finalidade de aperfeiçoar as respostas, um grupo

recebeu uma única imunização e o outro grupo recebeu uma segunda imunização de reforço. Antes de qualquer coisa, mediu-se a resposta de CD8+, como a produção de IFN- γ contra o peptídio 1629-1637 (SEQ. ID. NO: 7), que 5 contém um epitope de CD8+ apresentado pelas moléculas de MHC da classe I H-2 Db. Tal como pode ser observado na Figura 3A, uma resposta capaz de ser detectada foi induzida nos dois grupos de camundongos, posto que os níveis foram consideravelmente maiores no grupo que ti- 10 nha recebido duas imunizações (quadrados pretos) do que naqueles que receberam uma imunização (quadrados brancos). A resposta de CD4+, medida como a produção de IFN- γ contra a proteína NS3 de recombinação (SEQ. ID. NO: 1) também foi detectada nos dois grupos (Figura 15 3B), e novamente demonstrou que duas imunizações (qua- drados pretos) induziram respostas mais potentes do que uma única imunização (quadrados brancos).

EXEMPLO 4

A imunização com proteína NS3 em conjunto com poli(I:C) 20 e anti-CD40 induz respostas de CD8+ capazes de reconhecerem células que expressam proteínas do HCV.

Com a finalidade de estudar se imunização utilizando-se proteína NS3 em conjunto com poli(I:C) e anti-CD40 seria capaz de induzir respostas que pudessem 25 potencialmente exterminar células infectadas com HCV, utilizou-se um modelo *in vitro* de células alvo transfectadas com um plasmídio que expressou as proteínas do HCV (T1/HCVcon). Estas células expressaram os mesmos

peptídeos nas suas moléculas MHC de Class I, como seriam expressos por uma célula infectada com HCV; portanto, poderia supor-se como uma resposta contra a última de qualquer resposta contra elas. A proteína NS3 (SEQ. ID. NO: 1) usada nas experiências das Figuras 1 a 3 corresponde a uma variedade viral diferente da variedade viral presente nas células T1/HCVcon. Estas duas variedades apresentam algumas diferenças nos epítopes CD8+ estudados até agora. Com o objetivo de aperfeiçoar a capacidade de reconhecimento dos epítopes CD8+ presentes nas células T1/HCVcon, para esta experiência utilizou uma Proteína NS3 (SEQ. ID. NO: 2) como agente imunogênico, cuja seqüência teve um grau de homologia maior do que a proteína presente nas células T1/HCVcon.

Seis dias depois da imunização de camundongos HHD com 100 µg de NS3, as passarinhas foram estimuladas com células T1/HCVcon. A capacidade de reconhecimento das células T1/HCVcon foi analisada em ensaios de atividade lítica. Para isto, passarinhas estimuladas foram confrontadas com células T1/HCVcon e células de controle T1. Conforme ilustrado na Figura 4, a imunização com NS3 induziu respostas com uma capacidade maior para a lise de células T1, que expressaram proteínas do HCV (círculos pretos) do que as células de controle T1 (círculos brancos).

EXEMPLO 5

A imunização com poli(I:C) e com anti-CD40 em conjunto com a Proteína NS3 induz respostas de T CD4+ e CD8+ du-

radouras.

Uma das propriedades principais que um protocolo de vacinação tem de possuir é a sua capacidade de induzir respostas de imunização duradouras, de maneira a proteção conferida pela imunização possa persistir em longo prazo. Com a finalidade de estudar se imunização com anti-CD40 e poli(I:C) em conjunto com uma proteína NS3 seriam capazes de induzir esta espécie de resposta, camundongos HHD foram imunizados com 100 µg de NS3 de acordo com o protocolo descrito no Exemplo 1. Com o objetivo de reforçar a resposta, depois de 15 dias os animais receberam uma dose de reforço sob as mesmas condições. Sessenta dias depois da segunda imunização os animais foram sacrificados e suas passarinhos foram estimuladas com diferentes抗ígenos a fim de se analisarem as respostas de CD8+ e CD4+ T que persistiam nesse momento. A fim de se estudar a resposta de CD8+ T, as células foram estimuladas com o epitope 1073 e realizou-se a medição da produção de IFN-γ e da atividade lítica. Tal como se encontra ilustrado na Figura 5A, sessenta dias depois da segunda imunização, as passarinhos dos camundongos imunizados com anti-CD40 e poli(I:C) em conjunto com a proteína NS3 foram capazes de produzir grandes quantidades de IFN-γ quando estimuladas com o peptídio 1073, mas não na ausência de antígeno. Além disso, estas células foram capazes de lisar células alvo pulsadas com o peptídio 1073 (círculos pretos), mas não as células alvo que não continham

antígeno (círculos brancos) (Figura 5B). Finalmente, também se estudou a resposta de CD4+, utilizando-se como antígeno uma proteína NS3 usada na imunização. A Figura 5C mostra que este protocolo de imunização também induz respostas de CD4+ potentes e duradouras, que especificamente reconhecem o NS3.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> PROJETO DE BIOMEDICINA CIMA S.L.

<120> COMBINAÇÃO IMUNO-ESTIMULANTE PARA PROFILAXIA E TRATAMENTO DE
HEPATITE C

<130> 05009

<160> 7

<170> Patentin Versão 3.1

<210> SEQ ID. NO.: 1

<211> 631

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<220>

<221> CONFIGURAÇÃO--MISC

<223> Proteína NS3 não-estrutural

<400>

Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys
1 5 10 15

Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu
20 25 30

Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys Ile
35 40 45

Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Lys Thr Ile
50 55 60

Ala Ser Ser Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln
 65 70 75 80

Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu Thr Pro
 85 90 95

Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp
 100 105 110

Val Ile Pro Val Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser
 115 120 125

Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu
 130 135 140

Cys Pro Ala Val His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr
 145 150 155 160

Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Gly Leu Glu
 165 170 175

Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro Ala
 180 185 190

Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser
 195 200 205

Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys
 210 215 220

Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala
 225 230 235 240

Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Ile Ile Arg Thr Gly Val
 245 250 255

Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys
 260 265 270

Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile
 275 280 285

Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Asp
 290 295 300

Thr Val Leu Asp Gin Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val Leu
305 310 315 320

Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile
325 330 335

Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys
 340 345 350

Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys
355 360 365

His Ser Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Leu
370 375 380

Gly Val Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile
385 390 395 400

Pro Ala Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr
405 410 415

Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val
 420 425 430

Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr
435 440 445

Thr Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly Arg
450 455 460

Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Thr Pro Gly Glu
465 470 475 480

Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp
485 490 495

Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg
500 505 510

Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His
515 520 525

Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala
530 535 540

His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr Leu
 545 550 555 560

Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro
 565 570 575

Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu
 580 585 590

His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu
 595 600 605

Ile Thr Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser
 610 615 620

Ala Asp Leu Glu Val Val Thr
 625 630

<210> SEQ. ID. NO.: 2

<211> 635

<212> PRT

<213> **Vírus da hepatite C**

<220>

<221> Configuração--Misc

<223> Proteína NS3 não-estrutural

<400> 2

Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys
 1 5 10 15

Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Asp Gly Glu
 20 25 30

Val Gln Val Leu Ser Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys Val
 35 40 45

Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu
 50 55 60

Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln
 65 70 75 80

Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr Pro
 85 90 95

Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp
 100 105 110

Val Val Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser
 115 120 125

Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu
 130 135 140

Cys Pro Ser Gly His Val Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr
 145 150 155 160

Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met Glu
 165 170 175

Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Ala
 180 185 190

Val Pro Gln Thr Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser
 195 200 205

Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys
 210 215 220

Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala
 225 230 235 240

Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Glu Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val
 245 250 255

Arg Thr Ile Thr Thr Gly Gly Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Cys Lys
 260 265 270

Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile
 275 280 285

Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ser Thr Thr Ile Leu Gly Ile Gly
 290 295 300

Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu
 305 310 315 320

Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Ile Thr Val Pro His Pro Asn Ile
 325 330 335

Glu Glu Val Ala Leu Ser Asn Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys
 340 345 350

Ala Ile Pro Ile Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys
 355 360 365

His Ser Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Thr Gly Leu
 370 375 380

Gly Leu Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile
 385 390 395 400

Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr
 405 410 415

Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val
 420 425 430

Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr
 435 440 445

Thr Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Ala Gln Arg Arg Gly Arg
 450 455 460

Thr Gly Arg Gly Arg Ser Gly Ile Tyr Arg Phe Val Thr Pro Gly Glu
 465 470 475 480

Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp
 485 490 495

Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Ser Val Arg
 500 505 510

Leu Arg Ala Tyr Leu Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His
 515 520 525

Leu Glu Phe Trp Glu Ser Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala
 530 535 540

His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ala Gly Asp Asn Leu Pro Tyr Leu
 545 550 555 560

Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro
 565 570 575

Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu
 580 585 590

His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu
 595 600 605

Val Thr Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Tyr Ile Met Ala Cys Met Ser
 610 615 620

Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val
 625 630 635

<210> SEQ. ID. NO.: 3

<211> 528

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Proteína de recombinação quimérica obtida a partir de proteínas NS2 e NS3 do vírus da hepatite C

<400> 3

Gly Arg Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly Met Ala Ser Lys Gly
 1 5 10 15

Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly
 20 25 30

Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln
 35 40 45

Val Glu Gly Glu Val Gln Ile Val Pro Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu
 50 55 60

Ala Thr Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly
 65 70 75 80

Thr Arg Thr Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Ser
 85 90 95

Asn Val Asp Lys Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg
 100 105 110

Ser Leu Ala Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr
 115 120 125

Lys His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly
 130 135 140

Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Pro Leu Leu Cys Pro Val Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala
 165 170 175

Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Ala Asp Phe Ile Pro Val
 180 185 190

Glu Asn Leu Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser
 195 200 205

Ser Pro Pro Val Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala
 210 215 220

Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala
 225 230 235 240

Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu
 245 250 255

Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile
 260 265 270

Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser
 275 280 285

Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ala Gly Gly Ala Tyr
 290 295 300

Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile
 305 310 315 320

Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Gly Glu Thr Ala Gly Ala Lys
325 330 335

Leu Val Val Phe Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro
340 345 350

His Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro
355 360 365

Phe Tyr Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His
 370 375 380

Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Arg Lys Cys Asp Glu Leu Ala Thr Lys
385 390 395 400

Leu Val Ala Met Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp
405 410 415

Val Ser Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp
420 425 430

Ala Leu Met Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys
435 440 445

Thr Ile Glu Thr Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln
465 470 475 480

Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val
485 490 495

Ala Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys
500 505 510

Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu
 515 520 525

<210> SEQ. ID. NO.: 4

<211> 10

<213> Vírus da hepatite C

<220>

<221> configuração--misc

<223> Epítope 1038-1047 correspondente à proteína
NS3 viral

<400> 4

Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu
1 5 10

<210> SEQ. ID. NO.: 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<220>

<221> configuração--misc

<223> Epítope 1073-1081 correspondente à proteína
NS3 viral

<400> 5

Cys Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val
1 5

<210> SEQ. ID. NO.: 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<220>

<221> configuração--misc

<223> Epítope 1406-1415 correspondente à proteína viral

<400> 6

Lys Leu Val Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val
1 5 10

<210> SEQ. ID. NO.: 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 7

Gly Ala Val Gln Asn Glu Val Thr Leu
1 5

REIVINDICAÇÕES

1 - Combinação imuno-estimulante para a profilaxia e tratamento de hepatite C, **caracterizada** pelo fato de compreender:

- 5 a) um agonista de TLR3,
 b) um agonista de CD40 ou uma seqüência de DNA que o codifica, e
 c) um polipeptídio, que compreende a proteína NS3 do vírus da hepatite C, ou um fragmento da dita proteína NS3 com capacidade para induzir respostas de CD8+ e CD4+.
- 10

2 - Combinação imuno-estimulante, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o agonista de TLR3 é poli(I:C).

15 3 - Combinação imuno-estimulante, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que o agonista de CD40 é selecionado a partir de entre um anticorpo anti-CD40, CD40L, e fragmentos dos mesmos, que conserva sua capacidade de junção a CD40.

20 4 - Combinação imuno-estimulante, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo fato de que o agonista de CD40 é um anticorpo anti-CD40.

25 5 - Combinação imuno-estimulante, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de compreender:

- a) poli(I:C),
 b) um anticorpo anti-CD40, e
 c) um polipeptídio que contém a proteína NS3.

6 - Combinação imuno-estimulante, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, **caracterizada** pelo fato de que o polipeptídio que contém a proteína NS3 é um polipeptídio com SEQ ID. NO: 1.

5 7 - Combinação imuno-estimulante, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o agonista de que todos os componentes formam parte de uma única composição farmacêutica.

8 - Combinação imuno-estimulante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizada** pelo fato de que todos os componentes formam parte de pelo menos duas composições farmacêuticas diferentes.

9 - Utilização de uma combinação imuno-estimulante de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que as ditas composições farmacêuticas são administradas simultaneamente.

10 - Utilização de uma combinação imuno-estimulante de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada** pelo fato de que as ditas composições farmacêuticas são administradas em momentos diferentes.

11 - Utilização de uma combinação imuno-estimulante de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada** pelo fato de que as ditas composições farmacêuticas são administradas por meio de vias de administração diferentes.

12 - Composição farmacêutica que contém uma combinação imuno-estimulante de acordo com qualquer

uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizada** pelo fato de que cada um dos componentes está presente em quantidades farmaceuticamente aceitáveis.

13 - Kit para administração de uma combinação imuno-estimulante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que ele compreende pelo menos duas composições farmacêuticas diferentes.

14 - Método para produzir uma resposta imune ao vírus da hepatite, **caracterizado** pelo fato de que consiste em administrar uma combinação estimulante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em uma quantidade efetiva para induzir uma resposta imune.

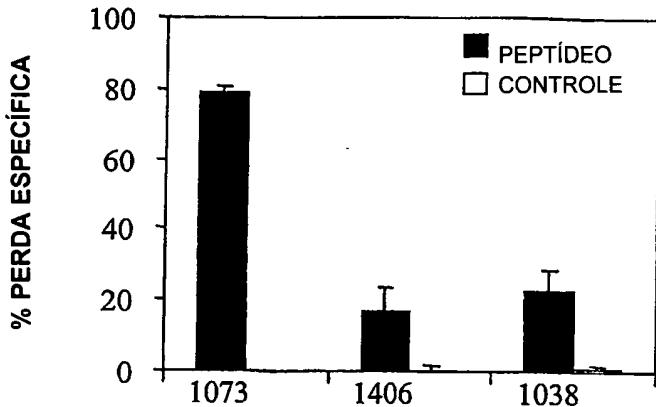
15 - Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que consiste de um tratamento profilático.

16 - Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que consiste de um tratamento terapêutico.

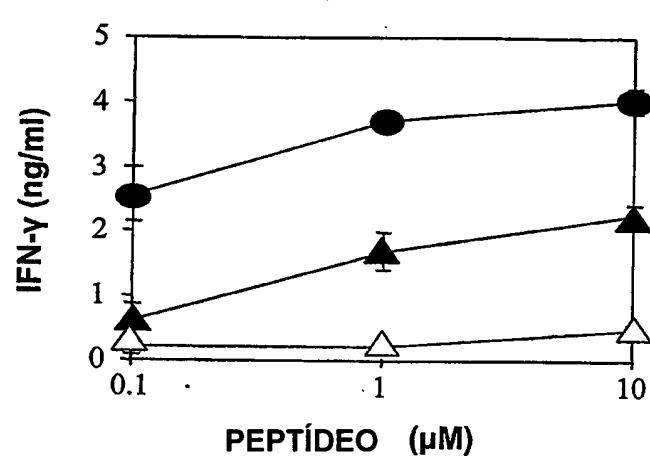
20 17 - Vacina contra o vírus da hepatite, **caracterizada** pelo fato de que compreende uma combinação imuno-estimulante definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 8.

1/5

A



B



C

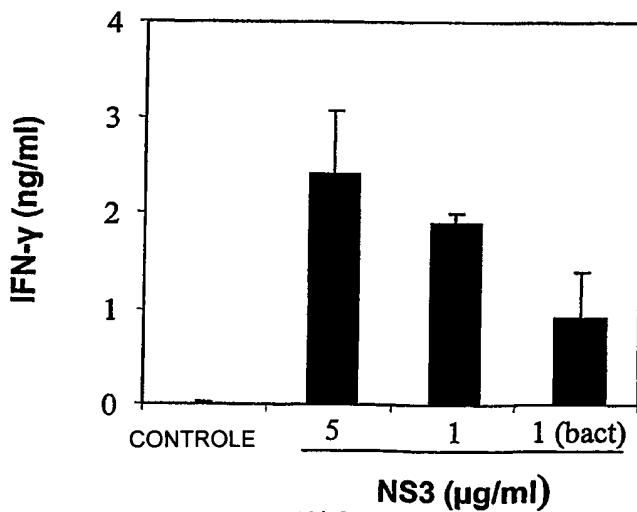
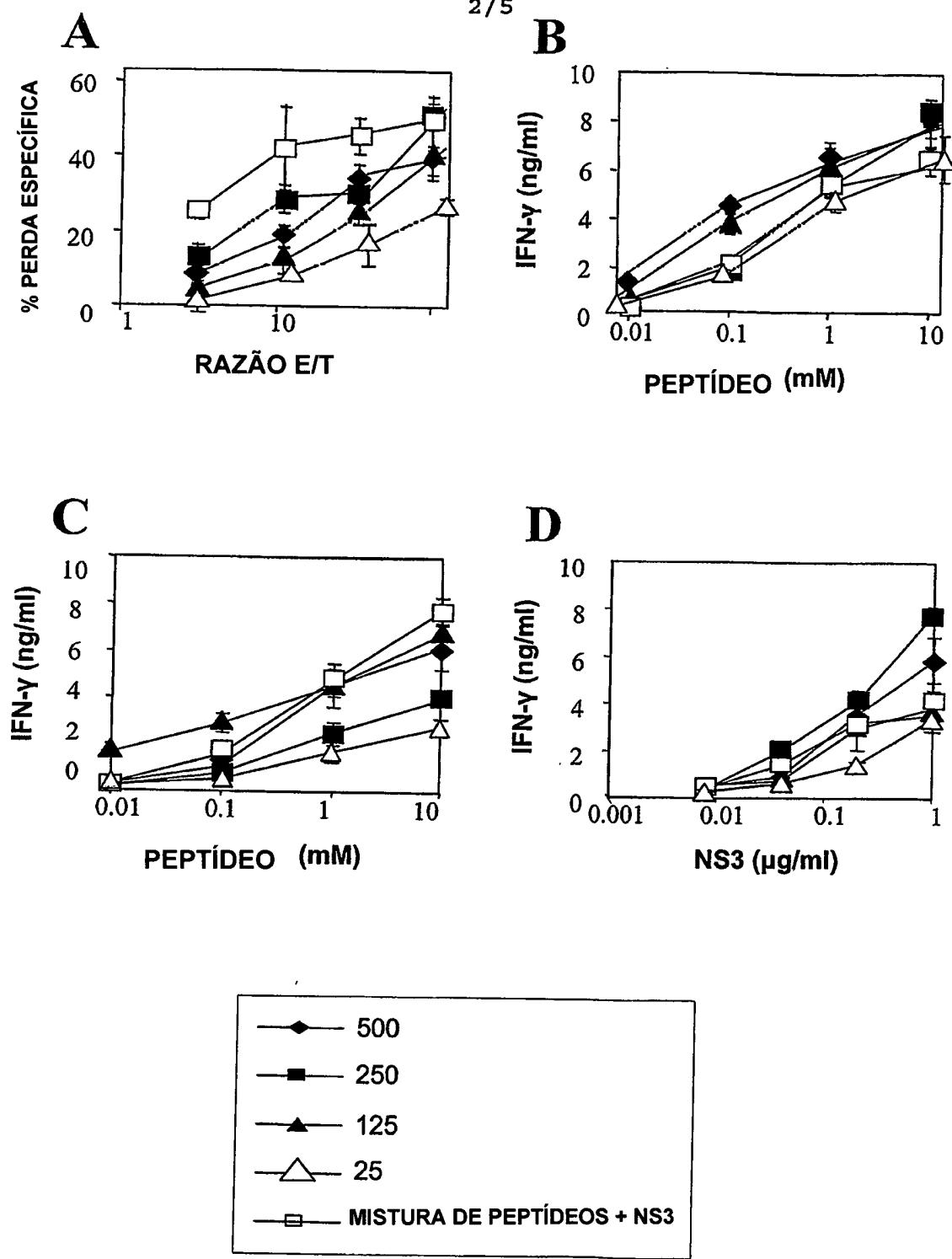
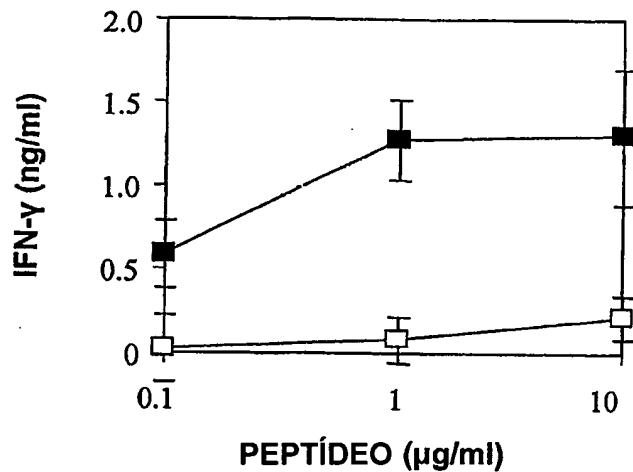


Figura 1

**Figura 2**

3/5

A



B

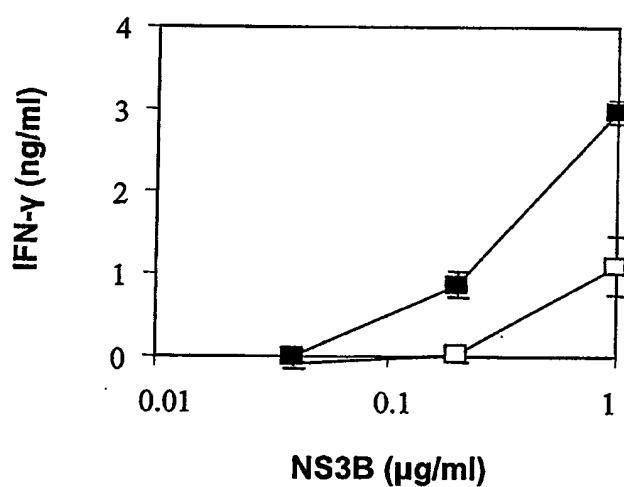


Figura 3

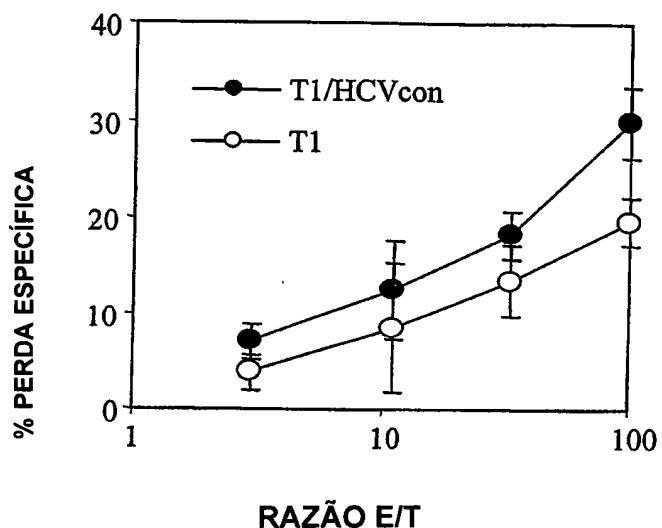
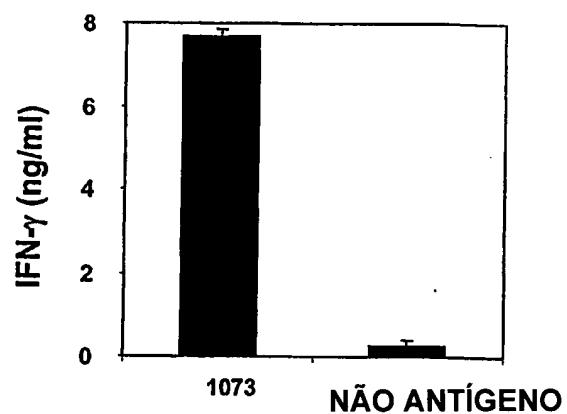


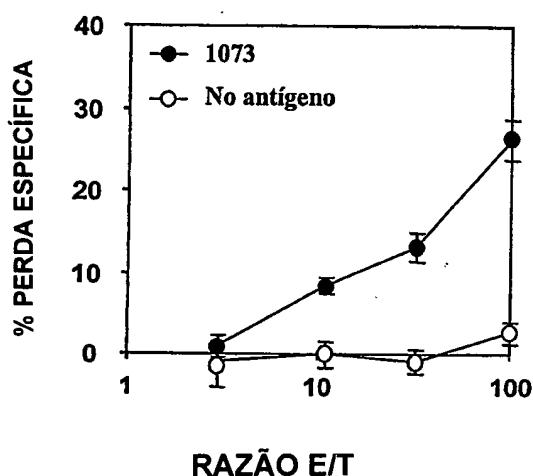
Figura 4

5/5

A



B



C

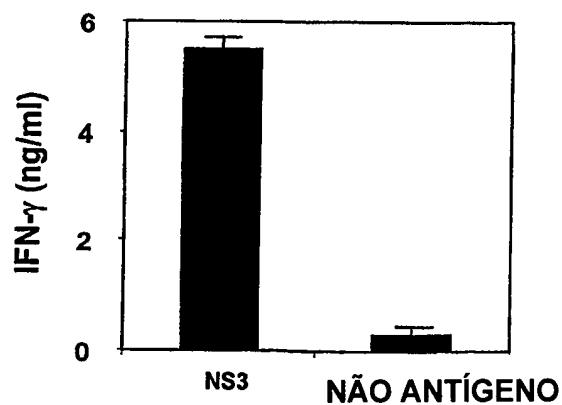


Figura 5

B0616978-3

RESUMO

COMBINAÇÃO IMUNO-ESTIMULANTE PARA A PROFILAXIA E
TRATAMENTO DE HEPATITE C, SUA UTILIZAÇÃO, COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA QUE A CONTÉM, KIT PARA SUA ADMINISTRAÇÃO,
5 MÉTODO PARA PRODUZIR UMA RESPOSTA IMUNE E VACINA CONTRA
 O VÍRUS DE HEPATITE C

A presente invenção refere-se a uma combinação imuno-estimulante para profilaxia e tratamento de hepatite, caracterizada pelo fato de que compreende um
10 agonista de TLR3, um agonista de CD40 e a proteína NS3 do vírus de hepatite C. Além disso, a invenção refere-se a composições farmacêuticas que compreendem a dita combinação imuno-estimulante, ao seu uso e a um kit composto das ditas composições farmacêuticas. Finalmente,
15 a presente invenção refere-se a um método para produzir uma resposta imune ao vírus da hepatite C e a uma vacina contra o dito vírus.