INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 827509 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 14/775 (2006.01) ***C07K 14/47*** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) ***A61K 39/00*** (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **1996.05.01**

(30) Prioridade(s): **1995.05.01 US 0432483**

(43) Data de publicação do pedido: **1998.03.11**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.08.16**
001/2007

(73) Titular(es):
AVANT IMMUNOTHERAPEUTICS, INC.
119 FOURTH AVENUE NEEDHAM, MA 02494-2725 **US**

(72) Inventor(es):
CHARLES W. RITTERSHAUS **US**
LAWRENCE J. THOMAS **US**

(74) Mandatário:
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **AGENTE MELHORADOR DO METABOLISMO ÓSSEO**

(57) Resumo:

RESUMO

"Modulação da actividade da proteína de transferência de éster colesterílico (CETP)"

A presente invenção refere-se a péptidos compreendendo uma porção de epítopo de célula T auxiliar e uma porção de epítopo de célula B para eliciar uma resposta imunitária contra a actividade da proteína de transferência de éster colesterílico (CETP - *Cholesteryl Ester Transfer Protein*) endógena, para prevenir ou tratar uma doença cardiovascular, tal como aterosclerose.

DESCRIÇÃO

"Modulação da actividade da proteína de transferência de éster colesterílico (CETP)"

Este é um pedido continuação-em-parte do pedido de patente dos Estados Unidos Nº. 08/432,483, apresentado em 1 de Maio, 1995.

Campo Genérico da Invenção

A presente invenção está genericamente no campo de vacinas à base de péptidos para controlar, tratar ou reduzir o risco de actividade aterogénica no sistema circulatório de seres humanos e outros animais. Em particular, a presente invenção proporciona composições e métodos para proporcionar meios para inibir a actividade da proteína de transferência de éster colesterílico (CETP - *Cholesteryl Ester Transfer Protein*) endógena para tratar uma doença cardiovascular, profilática ou terapeuticamente, ou para modular os níveis relativos de lipoproteínas para produzir uma condição correlacionada com um risco reduzido de doença cardiovascular, tal como aterosclerose.

Antecedentes da Invenção

O colesterol circula através do corpo predominantemente na forma de componentes de partículas de lipoproteína (lipoproteínas), que são compostas por uma porção proteína, denominadas apolipoproteínas (Apo) e vários lípidos, incluindo fosfolípidos, triglicéridos, colesterol e ésteres colesterílicos. Existem dez classes principais de apolipoproteínas: Apo A-I, Apo A-II, Apo-IV, Apo B-48, Apo B-100, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III, Apo D e Apo E. As lipoproteínas são classificadas pela densidade e composição. Por exemplo, as lipoproteínas de alta densidade (HDL), das quais uma função é mediar o transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, possuem uma densidade usualmente na gama de aproximadamente 1,063-1,21 g/mL. As HDL contêm várias quantidades de Apo A-I, Apo A-II, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III, Apo D, Apo E, assim como várias

quantidades de lípidos, tais como colesterol, ésteres colesterílicos, fosfolípidos e triglicéridos.

Em contraste com as HDL, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que geralmente possuem uma densidade de aproximadamente 1,019-1,063 g/ml, contêm Apo B-100 em associação com vários lípidos. Em particular, as quantidades dos lípidos, colesterol e ésteres colesterílicos são consideravelmente superiores nas LDL relativamente às HDL, quando medidas na forma de percentagem de massa seca. As LDL são particularmente importantes na entrega do colesterol a tecidos periféricos.

As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) possuem uma densidade de aproximadamente 0,95-1,006 g/ml e diferem também em composição das outras classes de lipoproteínas, tanto no seu teor de proteína como de lípido. As VLDL possuem geralmente uma quantidade de triglicéridos muito superior à das HDL ou das LDL e são particularmente importantes na entrega de triglicéridos sintetizados endogenamente do fígado para tecidos adiposos e outros tecidos. As características e funções de várias lipoproteínas foram revistas (veja-se, por exemplo, Mathews, C.K e van Holde, K.E., Biochemistry, pp. 574-576, 626-630 (The Benjamin/Cummings Publishing Co., Redwood City, California, 1990); Havel, R.J., *et al.*, "Introduction: Structure and metabolism of plasma lipoproteins", em The Metabolic Basis of Inherited Disease 6th ed., pp. 1129-1138 (Scriver, C.R, *et al.*, eds.) (McGraw-Hill, Inc., New York, 1989); Zannis, V.L, *et al.*, "Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors, and their enzymes", em Advances in Human Genetics. Vol. 21, pp. 145-319 (Plenum Press, New York, 1993)).

Uma susceptibilidade reduzida à doença cardiovascular, tal como aterosclerose, está geralmente correlacionada com níveis absolutos aumentados de HDL em circulação e também a níveis aumentados de HDL relativamente aos níveis em circulação de lipoproteínas de menor densidade tais como as VLDL e as LDL (veja-se, *e.g.*, Gordon, D.J., *et al.*, *N. Engl. J. Med, 321:*1311-1316 (1989); Castelli, W.P., *et al.*, *J. Am. Med. Assoc., 256:* 2835-2838 (1986); Miller, N.E., *et al.*, *Am. Heart J., 113:* 589-597 (1987); Tall, A.R, *J. Clin. Invest.*,

89: 379-384 (1990); Tall, A.R., *J. Internal Med., 237:* 5-12 (1995)).

A proteína de transporte de éster colesterílico (CETP) medeia a transferência de ésteres colesterílicos da HDL para lipoproteínas ricas em TG tais como VLDL e LDL, e também a permuta recíproca de TG de VLDL para HDL (Tall, A.R., *J Internal Med, 237:* 5-12 (1995); Tall, A.R., *J. Lipid Res., 34:* 1255-1274 (1993); Hesler, C.B., *et al., J. Biol. Chem., 262:* 2275-2282 (1987); Quig, D.W. *et al., Ann. Rev. Nutr., 10:* 169-193 (1990)). A CETP pode desempenhar um papel na modulação dos níveis de ésteres colesterílicos e triglicéridos associados a várias classes de lipoproteínas. Uma elevada actividade de transferência de ésteres colesterílicos da CETP foi correlacionada com níveis aumentados de colesterol associado a LDL e colesterol associado a VLDL, que por sua vez estão correlacionados com um risco aumentado de doença cardiovascular (veja-se, *e.g.*, Tato, F., *et al., Arterioscler. Thromb. Vascular Biol., 15:* 112-120 (1995)).

Daqui para a frente, LDL-C será utilizado para referir o colesterol total, incluindo ésteres colesterílicos e/ou colesterol não esterificado, associado a lipoproteína de baixa densidade. VLDL-C será utilizado para referir o colesterol total, incluindo ésteres colesterílicos e/ou colesterol não esterificado, associado a lipoproteína de muito baixa densidade. HDL-C será utilizado para referir o colesterol total, incluindo ésteres colesterílicos e/ou colesterol não esterificado, associado com a lipoproteína de alta densidade.

A CETP isolada de plasma humano é uma glicoproteína hidrófoba possuindo 476 aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 66 000 a 74 000 daltons sobre géis de dodecilsulfato de sódio (SDS)-poliacrilamida (Albers, J.J., *et al., Arteriosclerosis, 4:* 49-58 (1984); Hesler, C.B., *et al., J. Biol. Chem., 262:* 2275-2282 (1987); Jarnagin, S.S., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:* 1854-1857 (1987)). Foi clonado e sequenciado um ADNc que codifica CETP humana (Drayna, D., *et al., Nature, 327:* 632-634 (1987)). Foi recentemente relatado polimorfismo na CETP humana que pode estar associado a uma doença no metabolismo dos lípidos (Fumeron *et al., J. Clin. Invest., 96:* 1664 - 1671 (1995); Juvonen *et al., J. Lipid*

Res., 36: 804 - 812 (1995)). Mostrou-se que a CETP liga CE, TG, fosfolípidos (Barter, P.J. *et al., J. Lipid Res., 21*:238-249 (1980)), e lipoproteínas (veja-se, e.g., Swenson, T.L., *et al., J. Biol. Chem., 264:* 14318-14326 (1989)). Mais recentemente, mostrou-se que a região de CETP definida pelos 26 aminoácidos do terminal carboxilo, e em particular os aminoácidos 470 a 475, é especialmente importante para a ligação de lípidos neutros envolvidos na transferência de lípidos neutros (Hesler, C.B., *et al., J. Biol. Chem., 263:* 5020-5023 (1988)), mas não na ligação de fosfolípidos (veja-se, Wang, S., *et al., J. Biol. Chem., 267:* 17487-17490 (1992); Wang, S., *et al., J. Biol. Chem., 270:* 612-618 (1995)).

Produziu-se um anticorpo monoclonal (Mab), TP2 (anteriormente designado por 5C7 na literatura), que inibe completamente a actividade de transferência de éster colesterílico e triglicéridos da CETP, e, em menor extensão, a actividade de transferência de fosfolípidos (Hesler, C.B., *et al., J. Biol. Chem., 263:* 5020-5023 (1988)). O epítopo de TP2 foi localizado nos 26 aminoácidos do terminal carboxilo, *i.e.*, nos aminoácidos desde a arginina-451 à serina-476, da molécula de CETP humana de 74 000 dalton (veja-se, Hesler, C.B., *et al.*, (1988)). Foi relatado que o TP2 inibe a actividade da CETP tanto humana como de coelho, *in vitro,* e da CETP de coelho *in vivo* (Yen, F.T., *et al., J. Clin. Invest., 83:* 2018-2024 (1989) (o TP2 reagindo com CETP humana); Whitlock *et al., J. Clin. Invest., 84:* 129 - 137 (1989) (o TP2 reagindo com CETP de coelho)). Análises adicionais da região da CETP ligada por TP2 revelaram que os aminoácidos entre a fenilalanina-463 e a leucina-475 são necessários para a ligação de TP2 e para a actividade de transferência de lípidos neutros (*e.g.*, éster colesterílico) (veja-se, Wang, S., *et al.*, 1992).

Vários estudos *in vivo* utilizando modelos animais ou humanos indicaram que a actividade da CETP pode afectar o nível de HDL contendo colesterol na circulação. Uma actividade de transferência de éster colesterílico da CETP aumentada pode produzir uma diminuição nos níveis de HDL-C relativamente aos níveis de LDL-C e/ou de VLDL-C, que por sua vez está correlacionada com uma susceptibilidade aumentada à aterosclerose. A injecção de CETP humana parcialmente

purificada a ratos (que normalmente não têm actividade de CETP), resultou num desvio do éster colesterílico da HDL para a VLDL, consistente com a transferência promovida por CETP de éster colesterílico da HDL para a VLDL (Ha, Y.C., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta, 833:* 203-211 (1985); Ha, Y.C., *et al.*, *Comp. Biochem. Physiol., 83B:* 463-466 (1986); Gavish, D., *et al.*, *J. Lipid Res., 28:* 257-267 (1987)). Foi relatado que ratinhos transgénicos que expressam CETP humana exibem uma diminuição significativa no nível de colesterol associado à HDL (veja-se, *e.g.*, Hayek, T., *et al. J Clin Invest., 90:* 505-510 (1992); Breslow, J.L., *et al.*, *Proc. Natl Acad Sci. USA, 90:* 8314-8318 (1993)). Adicionalmente, enquanto ratinhos do tipo selvagem são normalmente altamente resistentes à aterosclerose (Breslow, J.L., *et al.*;, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:* 8314-8318 (1993)), foi relatado que os ratinhos transgénicos que expressam uma CETP de símio têm uma distribuição alterada de colesterol associado a lipoproteínas, nomeadamente, níveis elevados de LDL-C e VLDL-C e níveis diminuídos de HDL-C (Marotti, K.R., *et al., Nature, 364:* 73-75 (1993)). Os ratinhos transgénicos que expressam CETP de símio também foram mais susceptíveis a aterosclerose grave induzida pela dieta em comparação com ratinhos de controlo que não a expressam e desenvolveram lesões ateroscleróticas nas suas aortas significativamente maiores em área do que as encontradas nos animais de controlo e possuindo um surgimento focal grande, mais típico das encontradas em lesões ateroscleróticas em seres humanos (Marotti *et al.*, *id*). A infusão intravenosa de anticorpos monoclonais (Mab) anti-CETP humana em *hamsters* e coelhos inibiu a actividade de CETP *in vivo* e resultou em níveis significativamente aumentados dos níveis de HDL-C, níveis diminuídos de HDL-triglicérido, e dimensão aumentada de HDL; novamente implicando um papel crítico para a CETP na distribuição de colesterol em lipoproteínas em circulação (Gaynor, B.J., *et al.*, *Atherosclerosis, 110:* 101-109 (1994) (*hamsters*); Whitlock, M.E., *et al.*, *J. Clin. Invest., 84*: 129-137 (1989) (coelhos)).

A deficiência em CETP foi também estudada em seres humanos. Por exemplo, em certos estudos familiares no Japão, irmãos que eram homozigóticos para alelos não funcionais do gene da CETP não tinham actividade de CETP detectável. Não eram exibidas virtualmente nenhumas placas ateroscleróticas

por estes indivíduos, que também apresentaram uma tendência no sentido da longevidade nas suas famílias (veja-se, *e.g.*, Brown, M.L., *et al.*, *Nature, 342*: 448-451 (1989); Inazu, A., *et al.*, *N. Engl. J. Med, 323:* 1234-1238 (1990); Bisgaier, C.L., *et al.*, *J. Lipid Res., 32:* 21-23 (1991)). Também se mostrou que estes indivíduos deficientes em CETP homozigóticos possuem um perfil de lipoproteína anti-aterogénica como evidenciado por níveis elevados de HDL em circulação rica em éster colesterílico, assim como níveis globais de HDL elevados, e HDL excepcionalmente grande, *i.e.*, até quatro a seis vezes o tamanho da HDL normal (Brown, M.L., *et al.*, 1989, p. 451). A frequência desta mutação no Japão é relativamente elevada, e pode ser responsável por um nível elevado de HDL numa fracção significativa da população japonesa.

Os estudos anteriores indicam que a CETP desempenha um papel principal na transferência de éster colesterílico da HDL para a VLDL e para a LDL, e assim na alteração do perfil relativo de lipoproteínas em circulação para um que está associado a um risco aumentado de doença cardiovascular (*e.g.*, níveis diminuídos de HDL-C e níveis aumentados de VLDL-C e LDL-C). Marotti *et al.* (acima) interpretaram os seus resultados como indicando que uma alteração induzida por CETP na distribuição do colesterol era a principal razão porque as lesões arteriais se desenvolviam mais rapidamente em ratinhos transgénicos, que expressam CETP, do que em ratinhos de controlo não transgénicos, quando ambos os grupos eram alimentados com uma dieta aterogénica. Em conjunto, as presentes evidências sugerem que níveis aumentados de actividade de CETP podem ser preditivos de um risco aumentado de doença cardiovascular. A modulação ou a inibição da actividade de CETP endógena constituem assim um método terapêutico atractivo para a modulação dos níveis relativos de lipoproteínas para reduzir ou prevenir a progressão de, ou para induzir a regressão de, doenças cardiovasculares, tais como a aterosclerose.

Seria vantajoso, portanto, identificar compostos e métodos para controlar a actividade de CETP, que seriam úteis na prevenção ou no tratamento de doença cardiovascular. Para ser um terapêutico farmacológico eficaz, um composto, quando administrado a uma maioria significativa de beneficiários,

idealmente, não eliciaria uma resposta imunitária que neutralizasse a actividade ou efeito benéficos do composto terapêutico, não pode promover um estado hipersensível no indivíduo que recebe o composto terapêutico, e não pode produzir efeitos secundários adversos. Seria também vantajoso se esses compostos e métodos evitassem a necessidade de tratamentos contínuos ou frequentemente repetidos.

Sumário da invenção

A presente invenção proporciona compostos e métodos úteis para a modulação ou inibição da actividade da proteína de transferência de éster colesterílico (CETP). Em particular, descrevem-se péptidos de vacina que, quando administrados a um mamífero, criam uma resposta de anticorpos contra a própria CETP endógena do mamífero, desse modo promovendo um efeito profilático ou terapêutico contra uma doença cardiovascular, tal como aterosclerose. Estes péptidos de vacina compreendem uma porção de epítopo de célula T auxiliar compreendendo um epítopo de célula T auxiliar imunogénico "universal" ou "de gama larga", ligada, preferivelmente de forma covalente, a uma porção de epítopo de célula B compreendendo um ou mais epítopos de célula B de CETP, tal como encontrado na porção carboxilo-terminal da proteína CETP humana que está envolvida na ligação de um lípido neutro ou na actividade de transferência da CETP. Outros epítopos de célula B de CETP podem também ser utilizados. Preferivelmente, os epítopos de célula B de CETP utilizados na porção de epítopo de célula B dos péptidos de vacina da presente invenção induzem anticorpos contra CETP endógena (anticorpos autorreactivos) que ou bloqueiam a função da CETP ou conduzem a depuração da CETP em circulação no sangue. Em adição, os epítopos de célula B utilizados nos péptidos de vacina da presente invenção preferivelmente não compreendem também um epítopo de célula T de CETP de modo a evitar a possibilidade de danos auto-imunes mediados por células T no fígado.

Os péptidos de vacina da presente invenção incluem várias concretizações "plurivalentes". Por exemplo, os péptidos plurivalentes apresentam ao sistema imunitário mais do que um único epítopo de célula B ou de célula T auxiliar universal ou de larga gama. Estes péptidos de vacina plurivalentes incluem

aqueles que possuem múltiplas (duas ou mais) cópias do mesmo, ou de um diferente, epítopo imunogénico universal ou de gama larga de célula T auxiliar e/ou múltiplas cópias do mesmo, ou de um diferente, epítopo de célula B da proteína CETP. Os péptidos que possuem mais do que um epítopo de célula B único, ao qual se podem ligar diferentes anticorpos, podem promover a formação de complexos imunitários para eficazmente depurar a CETP do sistema circulatório.

Numa concretização preferida, a porção de epítopo de célula T auxiliar de um péptido de vacina da presente invenção é derivada de uma sequência de aminoácidos de um epítopo de célula T auxiliar universalmente (de gama larga) imunogénico, tal como as encontradas nos toxóides do tétano e da difteria, ou em péptidos antigénicos conhecidos da vacina da tosse convulsa, Bacilo de Calmette-Guerin (BCG), vacina da poliomielite, vacina da varicela, vacina do sarampo, vacina da rubéola, derivado purificado da proteína (PPD) da tuberculina, hsp-70 de *Mycobacterium tuberculosis* e hemocianina de lapa *Fissurella*. Adicionalmente, vários epítopos antigénicos universais (ou de gama larga) de célula T auxiliar podem ser ligados uns aos outros para formar porções de epítopo de célula T auxiliar antigénico universal múltiplas (*i.e.*, plurivalentes) dos péptidos de vacina da presente invenção.

Numa concretização mais preferida de um péptido de vacina da presente invenção, um resíduo amino-terminal de cisteína é ligado covalentemente a uma sequência de aminoácidos de um epítopo de célula T auxiliar antigénico de gama larga ou universal do toxóide do tétano que forma a sequência CQYIKANSKFIGITE (aminoácidos 1 a 15 de SEQ ID NO:2), que está covalentemente ligada a uma porção de epítopo de célula B de um péptido de vacina possuindo a sequência de aminoácidos carboxilo-terminal de CETP, FGFPEHLLVDFLQSLS (aminoácidos 16 a 31 de SEQ ID NO:2).

Noutra concretização preferida, um péptido de vacina plurivalente compreende uma sequência de aminoácidos de um epítopo de célula T auxiliar antigénico de gama larga ou universal do toxóide do tétano, que por sua vez está covalentemente ligada a uma porção de epítopo de célula B que consiste em dois epítopos de célula B de CETP. Numa destas

concretizações preferidas da presente invenção, o péptido de vacina plurivalente possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:8: CQYIKANSKFIGITELFPRPDQQHSVAYTFEEDIFGFPEHLLVDFLQSLS em que uma cisteína amino-terminal está ligada a um epítopo de célula T do toxóide do tétano (aminoácidos 2 a 15 de SEQ ID NO:8) ligado a uma sequência de aminoácidos contendo dois epítopos de célula B de CETP humana, *i.e.*, aminoácidos 349 a 367 e aminoácidos 461 a 476 da sequência de aminoácidos para a CETP humana madura (SEQ ID NO:4). Em ainda outra concretização preferida da presente invenção, um péptido de vacina plurivalente da presente invenção contém epítopos de célula B das regiões homólogas da CETP de coelho (*i.e.*, aminoácidos 350 a 368 e 481 a 496 de SEQ ID NO:6) e possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:9: MQYIKANSKFIGITERFPRPDGREAVAYRFEED IFGFPKHLLVDFLQSLS, em que uma metionina amino-terminal está ligada a um epítopo de célula T de toxóide do tétano (aminoácidos 2 a 15 de SEQ ID NO: 8) que está ligado a uma sequência de aminoácidos contendo os dois epítopos de célula B de CETP de coelho.

Os péptidos da presente invenção podem também estar ligados uns aos outros através de uma molécula ligante bifuncional ou uma molécula ligante peptídica possuindo um mínimo ou nenhuma imunogenicidade. Em adição, os péptidos podem estar ligados a uma molécula comum para formar montagens de péptidos em que múltiplas cópias dos péptidos estão dispostas próximas umas das outras. Estas montagens de péptidos de múltiplas cópias (plurivalentes) podem ser mais imunogénicas, ou seja, produzem uma resposta imunitária mais eficaz à CETP endógena do que vacinas compreendendo os péptidos individuais não associados.

Os compostos de vacina da presente invenção também podem ser utilizados em combinação com um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

Os péptidos de vacina imunogénicos da presente invenção eliciam a produção de anticorpos que são reactivos com, ou reconhecem, a CETP endógena. A administração de péptidos de vacina a animais de teste resultou numa diminuição nos níveis relativos de colesterol total e HDL-C e resultou numa diminuição no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. Os

anticorpos anti-CETP endógena eliciados promovem assim uma condição fisiológica correlacionada com um risco diminuído de doença cardiovascular, e parecem ter um efeito directo sobre a prevenção ou diminuição da formação de placas de aterosclerose.

Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1. Diagrama de fluxos do protocolo para administração de um péptido de vacina a (vacinação de) coelhos e para a colheita de amostras de sangue para análise da eficácia da vacina. Um coelho de controlo não recebeu péptido de vacina.

Figura 2. Densidade óptica (D.O.) a 450 nm *versus* diluição de plasma baseada em ELISA para ligação de anticorpo anti-CETP a CETP recombinante em amostras de plasma diluídas colhidas de coelhos (rb#1 - #4) no Dia 70. Os quadrados a branco (coelho rb#4) referem-se ao plasma de um coelho a que não foi administrado o péptido de vacina (controlo). Os quadrados, círculos e losangos a cheio referem-se aos coelhos rb# 1, #2, e #3, respectivamente, a que foi administrado um péptido de vacina possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

Figura 3. Densidade óptica (D.O.) a 450 nm *versus* diluição de plasma para amostras de plasma sanguíneo de coelhos (rb#1 - #4, veja-se a descrição da Fig. 2, atrás) baseadas em ELISA competitivo para inibição da ligação do anticorpo monoclonal (Mab) TP2 a CETP humana recombinante por anticorpo anti-CETP em amostras de plasma de sangue de coelho diluídas, colhidas no Dia 70.

Figura 4. Concentração de colesterol total (mg/dl) em amostras de plasma de coelhos (rb#1- #4, veja-se a descrição da Fig. 2, atrás) *versus* o tempo (Dias) em protocolo de vacinação.

Figura 5. Concentração de HDL-C (mg/dl) em amostras de plasma de coelhos (rb#1 - #4, veja-se a descrição da Fig. 2, atrás) *versus* o tempo (Dias) em protocolo de vacinação.

Figura 6. Razão Não-HDL/HDL em coelhos brancos New Zealand no Dia 70. Coelho de controlo não vacinado (N=1) rb#4 (barra a cheio); média (N=3) de coelhos vacinados rb# 1, 2 e 3 (tracejado).

Figura 7. Densidade óptica (D.O.) a 450 nm *versus* diluição de plasma (gráfico semi-logarítmico) baseada em ELISA para ligação de anticorpo anti-CETP a CETP recombinante em amostras de plasma diluídas colhidas de ratinhos transgénicos com CETP humana no Dia 70 no protocolo de vacinação. Os resultados para cada ratinho a que se administrou um péptido de vacina possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 estão indicados por "+" e uma linha contínua. Os resultados para cada ratinho de controlo estão indicados por "x" e uma linha tracejada. As diluições de plasma estenderam-se numa gama de 1:10 a 1:1 000 000 (1E+1 a 1E+6).

Figuras 8A e 8B. Representações típicas de Hidrofilicidade, Probabilidade Superficial, Índice Antigénico e Hélice Amfifílica (Figura 8A) e Folhas Amfifílicas e Estrutura Secundária (Figura 8B) para CETP humana madura.

Figura 9. Título de anticorpo contra CETP humana recombinante dos Grupos I e II do Modelo de Aterosclerose baseado em ELISA. D.O. a 405 nm *versus* diluição de plasma de coelho.

Figuras 10A e 10B. Títulos de anticorpo no plasma de coelhos para CETP de coelho no Modelo de Aterosclerose baseado em ELISA. Plasma pré-vacinação (Figura 10A). Plasma pós-vacinação (Figura 10B). D.O. a 405 nm *versus* diluição de plasma de coelho.

Figura 11. Colesterol total em animais pré- e pós-vacinados no Modelo de Aterosclerose. Colesterol total (mg/dl) *versus* dia e grupo.

Figura 12. HDL-C em animais pré- e pós-vacinados no Modelo de Aterosclerose. HDL-C (mg/dl) *versus* dia e grupo.

Figura 13. Gráfico de barras da média percentual da área total de aorta coberta por lesões ateroscleróticas em coelhos

vacinados e de controlo sob dietas suplementadas com colesterol. Pontos de dados individuais (losangos), média percentual de área aórtica coberta por lesões (barra sombreada), desvio padrão de pontos de dados (barra a branco), p <0,01 indica significância estatística entre gráficos de barras.

Descrição Detalhada da invenção

Como notado atrás, um risco diminuído de aterosclerose foi correlacionado com níveis relativamente baixos de LDL e VLDL em circulação e níveis relativamente elevados de HDL. Os níveis destas lipoproteínas em circulação são directamente influenciados, pelo menos em parte, pelos níveis endógenos de actividade de CETP. Em particular, uma elevada actividade de CETP promove a transferência de lípidos neutros, tais como ésteres colesterílicos, de HDL para VLDL e LDL. Deste modo, a CETP é um alvo relativamente preciso em seres humanos e outros animais para alterar os níveis relativos de LDL, VLDL e HDL no sistema circulatório (veja-se, e.g., Tato, F., *et al.*, *Arteriosclero. Thromb. Vascular Biol., 15:* 112-120 (1995); Tall, A.R, *J. Internal Med., 237*: 5-12 (1995)). A presente invenção é dirigida ao controlo da actividade de CETP endógena proporcionando péptidos de vacina de CETP úteis para promover uma resposta imunitária em indivíduos contra a sua CETP endógena, desse modo promovendo uma condição fisiológica, *e.g.*, nível aumentado de HDL ou nível diminuído de LDL, correlacionada com um risco diminuído de aterosclerose. Em adição, a promoção de uma resposta imunitária contra CETP endógena utilizando os péptidos de vacina da presente invenção pode proporcionar, prevenir ou inibir a progressão de lesões em tecido susceptível a aterosclerose.

1. Péptidos e Composições para Modulação da Actividade de CETP

Como aqui se utiliza, um péptido de vacina de CETP é um péptido compreendendo uma porção de epítopo de célula T auxiliar compreendendo uma sequência de aminoácidos de um epítopo de célula T auxiliar antigénico universal (*i.e.*, de gama larga) e uma porção de epítopo de célula B compreendendo uma sequência de aminoácidos de um epítopo de célula B de CETP, tal como a região carboxilo-terminal de CETP envolvida

na ligação de lípidos neutros e/ou na actividade de transferência de lípidos neutros. Estes péptidos de vacina de CETP são antigénicos, ou seja, eliciam a produção de anticorpos específicos para esse péptido que ligam CETP endógena. Assim, os péptidos de vacina de CETP da presente invenção são porções imunogénicas que possuem a capacidade de estimular a formação de anticorpos que ligam especificamente CETP endógena e inibem a actividade de CETP endógena.

A. Porção de Epítopo de Célula T Auxiliar de Péptidos de Vacina

Os péptidos úteis nas composições e métodos da presente invenção compreendem uma porção de epítopo de célula T auxiliar e uma porção de epítopo de célula B. A porção de epítopo de célula T auxiliar (ou simplesmente, "porção de epítopo de célula T") possui uma sequência de aminoácidos derivada de pelo menos um epítopo de célula T auxiliar antigénico universal (ou imunogénico universal ou de gama larga) (também denominado um péptido transportador imunogénico), que é definida como um péptido, ou um seu derivado, que pode ser apresentado por múltiplos haplótipos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e desse modo activar células T auxiliares que, por sua vez, estimulam o crescimento e diferenciação de células B. Como adicionalmente discutido adiante, a porção de epítopo de célula B (também denominada uma porção de péptido relacionado com CETP) dos péptidos de vacina aqui descritos possui uma sequência de aminoácidos compreendendo um epítopo de célula B da proteína CETP, tal como uma porção da região carboxilo-terminal da enzima CETP que está envolvida na ligação de lípidos neutros e/ou na transferência de lípidos neutros.

Exemplos do que se denominam epítopos de célula T auxiliar antigénicos "universais" ou "de gama larga", que foram utilizados como péptidos transportadores imunogénicos para vacinação humana, são conhecidos na especialidade. Estes incluem, por exemplo, epítopos do toxóide do tétano (tt) e do toxóide da difteria (dt) (veja-se, *e.g.*, Panina-Bordignon, P., *et al.*, *Eur. J. Immunol., 19*: 2237-2242 (1989) (caracterização de péptidos de epítopo de célula T auxiliar de toxóide do tétano universais); Etlinger, H., *Immunol. Today, 13:* 52-55

(1992); Valmori, D., *et al., J. Immunol., 149:* 717-721 (1992) (utilização de epítopos de tt universais em candidato a vacina anti-malária); Talwar, G.P., *et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA, 91:* 8532-8536 (1994) (utilização de tt e dt como epítopos universais em vacina anti-gonadotropina coriónica humana); Talwar, G.P., *et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA, 91:* 8532-8536 (1994)). Em adição a tt e dt, outras sequências de epítopo de célula T auxiliar úteis na presente invenção incluem as que são derivadas de péptidos antigénicos conhecidos da vacina da tosse convulsa, Bacilo de Calmette-Guerin (BCG), vacina da poliomielite, vacina do sarampo, vacina da papeira, vacina da rubéola, e o derivado purificado da proteína (PPD) da tuberculina (veja-se, *e.g.*, Etlinger, H., *Immunol. Today, 13:* 52-55 (1992)); aqui incorporados por referência). Adicionalmente, duas ou mais cópias do mesmo ou de vários diferentes epítopos de célula T auxiliar antigénicos universais, podem ser ligadas umas às outras para formar porções de epítopo de célula T auxiliar múltiplas ou plurivalentes dos péptidos de vacina da presente invenção. Por exemplo, pode ser sintetizado um péptido de vacina da presente invenção contendo uma porção de epítopo de célula T auxiliar múltipla ou plurivalente compreendendo uma sequência de aminoácidos de um epítopo de célula T auxiliar de tt e um epítopo de célula T auxiliar de dt.

Em adição, a imunogenicidade de um péptido de vacina da presente invenção pode ser adicionalmente aumentada através da ligação da porção de epítopo de célula T auxiliar a uma sequência peptídica de uma CETP xenogénica ou uma proteína homóloga a CETP relacionada. Uma tal abordagem foi anteriormente utilizada numa vacina humana contra gonadotropina coriónica humana (veja-se, Talwar, G.P., *et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA., 91:* 8532-8536 (1994)); dímero heteroespécies formado entre uma sequência de aminoácidos da subunidade β da gonadotropina coriónica humana e uma sequência de aminoácidos da subunidade β de hormona luteinizante ovina). Os exemplos de proteínas relacionadas com CETP que podem ser utilizados nesta abordagem incluem, por exemplo, proteína de transferência de fosfolípidos e proteína bactericida de neutrófilos (veja-se, Dia, J.R., *et al., J. Biol. Chem., 269:* 9388-91 (1994); Gray, P.W., *et al., J. Biol. Chem., 264:* 9505-9509 (1989)).

Outras moléculas transportadoras imunogénicas tais como hemocianina de lapa *Fissurella* (KLH) podem também ser utilizadas sozinhas ou em combinação com outros epítopos de célula T auxiliar antigénicos universais. Por exemplo, a KLH contém múltiplos resíduos de lisina na sua sequência de aminoácidos. Cada uma destas lisinas é um potencial local em que pode ser ligado um péptido de vacina aqui descrito (por exemplo, KLH activada por maleimida, N°. de Catálogo 77106, Pierce, Rockford, IL). Este arranjo é uma montagem de péptido de vacina que é extensamente plurivalente tanto para os epítopos de célula T auxiliar (*i.e.*, os epítopos de célula T auxiliar da sequência de aminoácidos de KLH em combinação com os epítopos de célula T auxiliar das múltiplas cópias dos péptidos de vacina ligados) como de epítopos de célula B de CETP (*i.e.*, os epítopos de célula B de CETP nas múltiplas cópias dos péptidos de vacina ligados à sequência de aminoácidos da KLH).

Recentemente, mostrou-se que outra molécula transportadora imunogénica, hsp70 de *Mycobacterium tuberculosis,* é um antigénio especialmente potente contendo múltiplos epítopos de células B e T (Suzue e Young, *J. Immunol., 156:* 873 - 879 (1996)). A proteína hsp70 pode ser ligada por agentes de ligação cruzada *standard* a péptidos de vacina da presente invenção para aumentar a imunogenicidade. Alternativamente, moléculas de ácido nucleico que codificam para péptidos de vacina da presente invenção podem ser inseridas num vector de expressão que permite a expressão de uma proteína recombinante que consiste no péptido de vacina fundido com o terminal amino de hsp70.

Preferivelmente, a porção de epítopo de célula T auxiliar dos péptidos de vacina da presente invenção compreende um epítopo de célula T auxiliar de tt ou dt, antigénico universal. Numa concretização mais preferida, os péptidos do pressente pedido utilizam epítopos de célula T auxiliar de tt antigénicos universais possuindo as sequências de aminoácidos QYIKANSKFIGITE (aminoácidos 2 a 15 de SEQ ID NO:2) e FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO:3). Mais preferivelmente, os péptidos da presente invenção utilizam o epítopo de célula T auxiliar de tt antigénico universal possuindo a sequência de

aminoácidos QYIKANSKFIGITE (aminoácidos 2 a 15 de SEQ ID NO:2).

Em adição aos vários exemplos de epítopos de célula T auxiliar atrás discutidos, se um outro péptido ou proteína é útil como epítopo de célula T auxiliar para a porção de epítopo de célula T dos péptidos de vacina da presente invenção, pode ser determinado utilizando um ensaio de proliferação *standard* para epítopos de célula T de classe II (auxiliar) (veja-se, por exemplo, páginas 3.12.9 - 3.12.14, em Current Protocols in Immunology. Vol. I (Coligan *et al.*, eds.) (John Wiley & Sons, Inc., New York, New York, 1994)).

B. Porção de Epítopo de Célula B (Relacionada com CETP) de Péptidos de Vacina

A porção de epítopo de célula B dos péptidos de vacina aqui descritos compreende um ou mais epítopos de célula B da proteína CETP endógena do mamífero vacinado, ou um ou mais epítopos de célula B de uma CETP diferente da CETP endógena mas que é imunologicamente reactiva (anticorpo) cruzadamente com a CETP endógena.

A porção de epítopo de célula B dos péptidos de vacina da presente invenção podem compreender um ou mais epítopos de célula B da CETP endógena do indivíduo a vacinar para criar anticorpos que inibem a actividade da CETP endógena. Contudo, está também no âmbito da presente invenção que a porção de epítopo de célula B dos péptidos de vacina da presente invenção compreenda epítopos de célula B de moléculas de CETP que são similares, mas não idênticas, à CETP endógena do indivíduo a vacinar. Certos epítopos de célula B destas proteínas CETP similares, mas não idênticas, podem conter epítopos que aumentam a resposta imunitária no indivíduo vacinado. Geralmente, as moléculas de CETP que possuem sequências de aminoácidos que são pelo menos aproximadamente 80 porcento homólogas à CETP endógena podem ser utilizadas como fonte de epítopos de célula B na porção de epítopo de célula B dos péptidos de vacina da presente invenção. Como exemplo, as proteínas CETP de coelho e humana possuem uma homologia de sequência de aminoácidos de aproximadamente 80 porcento. A CETP de coelho madura possui a sequência de

aminoácidos de SEQ ID NO:6 e a CETP humana madura de fígado possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:4. Deste modo, num exemplo de uma concretização dos péptidos de vacina da presente invenção, a porção de epítopo de célula B compreende um ou mais epítopos de célula B de uma CETP de coelho e/ou humana, e este péptido de vacina pode ser utilizado quer em coelhos quer em humanos para inibir a actividade da CETP endógena.

Em adição, a porção de epítopo de célula B dos péptidos de vacina da presente invenção compreende uma porção da sequência de aminoácidos da proteína CETP madura (SEQ ID NO: 4) que consiste em sequências de pelo menos 6 aminoácidos de comprimento e que não estimula significativamente, se estimular, a proliferação de células T *in vitro*.

Numa concretização preferida, os péptidos de vacina da presente invenção possuem porções de epítopo de célula B plurivalentes de péptidos de vacina da presente invenção que compreendem dois ou mais epítopos de célula B diferentes de CETP. Estas porções de epítopo de célula T auxiliar plurivalentes são especialmente preferidas porque apresentam múltiplos locais alvo em que anticorpos eliciados se podem ligar à CETP endógena, promovendo desse modo uma mais extensa formação de complexos imunitários e/ou a probabilidade de inibir a actividade de transferência de colesterilo da CETP.

Em adição, prefere-se que uma porção de epítopo de célula B dos péptidos de vacina não compreenda um epítopo de célula B que também compreende um epítopo de célula T que possa ser apresentado pelas moléculas do MHC de classe I endógenas. Estes epítopos de célula T de CETP podem ser apresentados sobre a superfície de hepatócitos no contexto do MHC de classe I e eliciar uma resposta de células T citotóxicas e desse modo danificar o tecido do fígado. Se um epítopo de célula B particular de CETP compreende um epítopo de célula T de classe I, pode ser determinado utilizando um ensaio de células T citotóxicas *standard* (veja-se, por exemplo, páginas 3.11.4 - 3.11.7, em Current Protocols in Immunology. Vol. 1 (John Wiley & Sons, Inc., New York; New York, 1994)).

Noutra concretização, a porção de epítopo de célula B dos péptidos de vacina da presente invenção compreende os 26 aminoácidos do terminal carboxilo de CETP humana (veja-se SEQ ID NO:1) ou seus fragmentos que retêm uma conformação ou uma actividade da região de 26 aminoácidos carboxilo-terminais de CETP, *e.g.*, fragmentos do terminal carboxilo de CETP que têm pelo menos seis aminoácidos consecutivos de comprimento e que estão envolvidos na ligação específica de lípidos neutros e/ou na actividade específica de transferência de lípidos neutros da CETP. Mais preferivelmente, a porção de epítopo de célula B (ou relacionado com CETP) dos péptidos de vacina da presente invenção compreende qualquer fragmento da região carboxilo-terminal de CETP que tem pelo menos onze aminoácidos consecutivos de comprimento, que retém a conformação da região carboxilo-terminal de 26 aminoácidos da CETP, que está envolvido na ligação de lípidos neutros e/ou na actividade de transferência da CETP, e que está acessível para ligação de anticorpos (veja-se, *e.g.*, Wang, S., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, *267:* 17487-17490 (1992); Wang, S., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, *268:* 1955-1959 (1993)). Em adição, foram gerados vários Mab para esta região, incluindo o Mab TP2, que bloqueia a função da CETP humana e também da CETP de coelho, implicando que este epítopo é conservado por proteínas CETP humanas e de coelho (Whitlock *et al.*, *J. Clin Invest.*, *84:* 129 - 137 (1989). Isto é confirmado pelo facto de os 22 aminoácidos carboxilo-terminais de CETP humana e de coelho diferirem em apenas uma posição, *i.e.*, o resíduo de ácido glutâmico na posição 465 na sequência de aminoácidos de CETP humana em SEQ ID NO: 4 é substituído por uma lisina na posição homóloga (posição 485) na sequência de coelho (SEQ ID NO:6; veja-se também, Nagashima *et al.*, *J. Lipid Res.*, 29: 1643 - 1649 (1988)).

Alternativamente, a porção de epítopo de célula B compreende um derivado da região de 26 aminoácidos carboxilo-terminal de CETP contendo alterações de aminoácidos (deleções, adições ou substituições) que não nem destroiem nem alteram significativamente a ligação de lípidos neutros ou a actividade de transferência de CETP (veja-se, Wang *et al.*, *id*, (1992); Wang *et al.*, *id.*, (1993)). Estas alterações na sequência de aminoácidos de uma CETP endógena alvo incluem, mas não se lhes limitam, o que se conhece genericamente como substituições conservativas de aminoácidos, tais como a

substituição de um aminoácido da sequência de CETP por outro de estrutura, carga ou hidrofobicidade similares. Qualquer adição ou substituição na sequência de CETP que mantenha a ligação a, e/ou a actividade de transferência de, lípidos neutros, mas melhore a estabilidade *in vivo* ou *in situ*, melhore a purificação, ou proporcione locais para ligação cruzada (*e.g.*, por via da formação de ligações dissulfureto cisteína-cisteína) é também útil no desenho de um péptido de vacina da presente invenção.

Como a transferência mediada por CETP de lípidos neutros requer necessariamente a ligação do lípido neutro (*e.g.*, triglicéridos, éster colesterílico), as porções da sequência de aminoácidos da CETP que estão envolvidas na ligação de lípidos neutros são também úteis no desenho dos péptidos de vacina da presente invenção. Algumas porções da sequência de aminoácidos da CETP utilizadas no desenho dos péptidos de vacina da presente invenção podem estar envolvidas tanto na ligação de lípidos neutros como no verdadeiro local catalítico da transferência de lípidos neutros da CETP. Evidências recentes sugerem que a CETP contém locais de ligação separados para éster colesterílico e triglicéridos (Melchior, G.W., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, *270:* 21068-21074 (1995)). Deste modo, a incorporação da sequência de aminoácidos para um local de ligação a um lípido específico num péptido de vacina pode proporcionar um meio para modular interacções de CETP com esse lípido específico, promovendo desse modo um perfil anti-aterogénico mesmo que os anticorpos eliciados contra a CETP não promovam a depuração (reduzam a semivida sérica) da CETP em circulação. Por exemplo, para modular especificamente o teor de triglicéridos da HDL, um epítopo de célula B derivado da região de ligação de triglicéridos da CETP pode ser incorporado na porção de epítopo de célula B de um péptido de vacina da presente invenção. Similarmente, para modular especificamente o teor de éster colesterílico da HDL, um epítopo de célula B derivado da região de ligação de éster colesterílico da CETP pode ser incorporado no desenho de um péptido de vacina da presente invenção. Estes péptidos de vacina são assim desenhados para eliciar anticorpos que bloqueiam locais de ligação de lípidos específicos na CETP e desse modo influenciam o lípido específico transferido entre HDL e CETP.

São também úteis as sequências de aminoácidos de CETP que têm pelo menos seis aminoácidos consecutivos de comprimento, uma dimensão mínima de um epítopo numa proteína (veja-se, *e.g.*, Watson *et al.*, Molecular Biology of the Gene, 4th edition, página 836 (The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., Menlo Park, CA, 1987), e mais preferivelmente, que têm pelo menos onze aminoácidos consecutivos de comprimento da região de 26 aminoácidos carboxilo-terminal de CETP codificada por quaisquer polimorfismos de ocorrência natural do gene da CETP.

As moléculas de CETP de sequência de aminoácidos conhecida podem ser analisadas quanto à localização de potenciais epítopos de célula B utilizando algoritmos que podem identificar potenciais motivos antigénicos na sequência de aminoácidos. Por exemplo, combinando análises de gráficos de hidrofilicidade, probabilidade superficial, hélice amfifílica, folhas amfifílicas e estrutura secundária (Figuras 8A e 8B), pode ser calculado um Índice Antigénico (veja-se Figura 8A) da totalidade da sequência de aminoácidos da proteína que conduz à identificação de epítopos de célula B potencialmente úteis nos péptidos de vacina da presente invenção.

Os métodos para o teste de moléculas de CETP quanto a ligação de lípidos neutros ou o seu efeito sobre a actividade de transferência de lípidos neutros são bem conhecidos na especialidade, (veja-se, e.g., Swenson, T.L., *et al.*, *J. Biol. Chem., 263:* 5150-5157 (1988) (ensaio para ligação de lípidos); Hesler, C.B., *et al.*, *J. Biol. Chem., 262:* 2275-2282 (1987) (ensaio para transferência de lípidos); Bisgaier, C.L., *et al.*, *J. Lipid Res., 34:* 1625-1634 (1993) (utilização de microemulsões de éster colesterílico fluorescentes em ensaio da actividade de transferência de colesterilo mediada por CETP); Gaynor, B.J., *et al.*, *Atherosclerosis, 110:* 101-109 (1994) (ensaio para transferência de lípidos da CETP); Wang *et al.* (1992) (ensaio de mutantes de deleção de CETP para actividade de transferência); Wang *et al.*, (1993) (ensaio de formas mutantes de um único aminoácido de CETP); aqui incorporados por referência). Os ensaios à actividade de transferência da CETP estão também comercialmente disponíveis

(*e.g.*, ensaio funcional de CETP por Diagnescent Technologies, Yonkers, New York).

Preferivelmente, a porção de epítopo de célula B dos péptidos de vacina de CETP da presente invenção compreende a sequência de aminoácidos LFPRPDQQHSVAYTFEEDI (aminoácidos 16 a 34 de SEQ ID NO:8) e/ou a sequência de aminoácidos FGFPEHLLVDFLQSLS (aminoácidos 35 a 50 de SEQ ID NO:8).

C. Produção de Péptidos de Vacina

As porções de epítopo de célula T auxiliar e de epítopo de célula B (relacionado com CETP) dos péptidos de vacina de CETP da presente invenção estão ligadas mutuamente para formar porções imunogénicas. As porções de epítopo de célula T auxiliar e de epítopo de célula B podem ser ligadas covalentemente, directamente (*e.g.*, por via de uma ligação peptídica) ou por via de uma molécula de ligação cruzada. Quando são utilizadas moléculas de ligação cruzada, estas têm que unir as porções de epítopo de célula T auxiliar e de epítopo de célula B do péptido de vacina mutuamente sem tornar o péptido tóxico ou sem interferir significativamente, ou reduzir, a imunogenicidade global do péptido de vacina. As moléculas de ligação cruzada adequadas incluem aminoácidos, por exemplo, a utilização de um ou mais resíduos de glicina para formar uma "ponte de glicina" entre as porções de epítopo de célula T auxiliar e de epítopo de célula B dos péptidos de vacina da presente invenção. Estão também contempladas a formação de pontes de dissulfureto entre resíduos de cisteína que foram adicionados às porções de epítopo de célula T auxiliar e de epítopo de célula B, ou a utilização de moléculas de ligação cruzada tais como glutaraldeído (Korn, A.H., *et al.*, *J. Mol. Biol.*, *65:* 525-529 (1972)) e EDC (Pierce, Rockford, IL) ou outras moléculas de ligação cruzada bifuncionais para ligar uma porção de epítopo de célula T auxiliar a uma porção de epítopo de célula B. As moléculas de ligação cruzada bifuncionais possuem dois locais reactivos distintos; um dos locais reactivos pode reagir com um grupo funcional na porção de epítopo de célula T auxiliar para formar uma ligação covalente e o outro local reactivo pode reagir com um grupo funcional numa porção de epítopo de célula B para formar outra ligação covalente, unindo as duas

porções. Os métodos gerais para moléculas de ligação cruzada estão revistos por Means e Feeney *(Bioconjugate Chem., .1:* 2-12 (1990)).

As moléculas de ligação cruzada homobifuncionais possuem dois locais reactivos que são quimicamente iguais. Os exemplos de moléculas de ligação cruzada homobifuncionais incluem glutaraldeído; N,N'-bis(3-maleimidopropionil}-2-hidroxi-1,3-propanodiol (um agente de ligação cruzada homobifuncional específico de sulfidrilo); certos ésteres de N-succinimida, tais como suberato de dissuccinimidilo e ditio-bis-(propionato de succinimidilo) e seus ácidos e sais bis-sulfónicos solúveis (*e.g.*, como disponíveis de Pierce Chemicals, Rockford, Illnnois; Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri). Para esta concretização, as concentrações relativas de porções de epítopo de célula T auxiliar e de epítopo de célula B deverão ser ajustadas para maximizar o número de porções de epítopo de célula T auxiliar e de epítopo de célula B que são ligadas mutuamente e para minimizar a ligação de porções de epítopo idênticas umas às outras (*i.e.*, para evitar, por exemplo, a formação de homodímeros epítopo de célula T auxiliar-epítopo de célula T auxiliar ou epítopo de célula B-epítopo de célula B).

Preferivelmente, a molécula de ligação cruzada bifuncional é uma molécula ligante heterobifuncional, o que significa que a molécula ligante possui pelo menos dois locais reactivos que podem estar ligados covalentemente, de forma separada, a um epítopo de célula T e a um epítopo de célula B. A utilização destas moléculas ligantes heterobifuncionais permite a adição, quimicamente separada e por passos (conjugação vectorial) de cada um dos locais reactivos da molécula ligante às porções de epítopo de célula T auxiliar e de célula B do péptido de vacina. As moléculas de ligação cruzada heterobifuncionais que podem ser utilizadas para ligar porções de epítopo de célula T auxiliar e de célula B umas às outras com outras incluem éster de m-maleimidobenzoíl-N-hidroxissuccinimida (veja-se, Green, N., *et al., Cell, 28:* 477-487 (1982); Palker *et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA, 84:* 2479-2483 (1987); éster de m-maleimidobenzoílsulfossuccinimida; éster de N-hidroxissuccinimida do ácido γ-maleimidobutírico; e 3-(2-

piridilditio)propionato de N-succinimidilo (veja-se, Carlsson, J., *et al.*, *Biochem. J., 173*: 723-737 (1978); Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri).

Adicionalmente, as porções de epítopo de célula T auxiliar e de epítopo de célula B podem ser ligadas a uma molécula transportadora comum, tal como albumina sérica ou uma resina ou uma conta polimérica. A ligação das porções de epítopo de célula T auxiliar e de epítopo de célula B a um transportador comum pode ser realizada utilizando uma molécula de ligação cruzada tal como glutaraldeído ou outra molécula de ligação cruzada bifuncional (veja-se atrás). Para esta concretização, as concentrações relativas da porção de epítopo de célula T auxiliar, da porção de epítopo de célula B e da molécula transportadora comum deverão ser ajustadas de modo a maximizar o número de porções de epítopo de célula T auxiliar e de epítopo de célula B que são ligadas ao transportador comum e minimizar tanto a ligação de moléculas idênticas umas às outras (*i.e.*, formação de homodímeros) como a ligação de porções de epítopo de célula T auxiliar e de epítopo de célula B umas às outras (*i.e.*, formação de heterodímeros). A ligação das porções de epítopo de célula T auxiliar e de epítopo de célula B a outra molécula ou a uma superfície (*e.g.*, a superfície de uma resina ou uma conta polimérica) não deverá romper significativamente nem reduzir as características imunogénicas das sequências da porção de epítopo de célula T auxiliar antigénico universal ou da porção de epítopo de célula B (relacionada com CETP). O efeito resultante da utilização destas moléculas de ligação cruzada bifuncionais é que são ligadas múltiplas cópias das porções de epítopo de célula T auxiliar e de epítopo de célula B de um péptido de vacina a um transportador comum que podem aumentar uma resposta imunitária e a produção de anticorpos que se ligam à CETP endógena.

Mostrou-se também que arranjos de péptidos antigénicos múltiplos (MAP) são antigénios e imunogénios altamente eficazes (veja-se, e.g., Tam, J.P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:* 5409-5413 (1988); Wang, C.Y., *et al.*, *Science, 254:* 285-288 (1991); Marguerite, M, *et al.*, *Mol. Immunol., 29:* 793-800 (1992)). Esta tecnologia de MAP, em que as porções de epítopo de célula T auxiliar e de epítopo de célula B dos

péptidos de vacina aqui descritos são ligadas a uma molécula nuclear comum, proporciona outra maneira de preparar arranjos de péptidos plurivalentes para eliciar anticorpos contra a CETP endógena.

Preferivelmente, as porções de epítopo de célula T auxiliar e de epítopo de célula B dos péptidos de vacina da presente invenção são ligadas covalentemente extremidade-com-extremidade para formar um péptido contínuo. Mais preferivelmente, uma porção de epítopo de célula T auxiliar antigénica universal seleccionada forma a porção amino-terminal do péptido de vacina com o seu resíduo de aminoácido carboxilo-terminal covalentemente ligado numa ligação peptídica ao aminoácido amino-terminal de uma sequência de aminoácidos relacionada com CETP seleccionada (porção de epítopo de célula B) do péptido de vacina. Contudo, a ordem inversa pode também ser utilizada, *i.e.*, a sequência de aminoácidos relacionada com CETP (porção de epítopo de célula B) dos péptidos de vacina da presente invenção pode estar posicionada para formar a região amino-terminal de um péptido de vacina e um epítopo de célula T auxiliar antigénico universal ou uma sequência de aminoácidos transportadora imunogénica podem constituir a porção carboxilo-terminal do péptido de vacina.

Os péptidos de vacina da presente invenção podem ser tornados mais imunogénicos ligando-os covalentemente a múltiplas cópias da proteína do complemento C3d (Dempsey *et al.*, *Science, 271:* 348 - 350 (1996)). Alternativamente, os péptidos de vacina podem ser derivatizados com estruturas de hidratos de carbono que activam o complemento e ficam covalentemente ligadas a C3d (Fearon *et al.*, *Science, 272:* 50-54 (1996)). Por exemplo, as proteínas expressas em certas células hospedeiras de ovário de *hamster* chinês mutantes podem ser glicosiladas com estruturas de hidratos de carbono específicas (Stanley, *Mol. Cell. Biol.*, *9*:377-383 (1989)). Evidências recentes demonstram que C3d promove o reconhecimento de antigénios pelo sistema imunitário adquirido eliciando uma resposta imunitária vigorosa (Dempsey *et al.*, 1996).

Os péptidos da presente invenção podem ser produzidos por qualquer dos métodos disponíveis conhecidos na especialidade para produzir péptidos de sequências de aminoácidos definidas. Por exemplo, está disponível aos peritos na especialidade a síntese automática de péptidos utilizando sintetizadores automáticos de péptidos (*e.g.*, o sintetizador de péptidos Synergy™ da Applied Biosystems; AMS 422 da Abimed, Langenfeld, Alemanha). A síntese destes péptidos é realizada por encomenda como um serviço comercial por muitas companhias de serviços de síntese de péptidos comerciais, *e.g.*, Quality Controlled Biochemicals, Inc., Hopkinton, Massachusetts); Chiron Mimotopes Peptide Systems (San Diego, California); Bachem Bioscience, Inc. (Philadelphia, Pennsylvania); Severn Biotech Ltd. (Kiddeminster, Inglaterra).

Alternativamente, os péptidos da presente invenção podem ser produzidos utilizando a tecnologia do ácido nucleico sintético e recombinante. Por exemplo, uma pessoa competente na matéria pode desenhar a partir do código genético conhecido uma sequência de ácido nucleico de 5' para 3' que codifica um péptido da presente invenção. A sequência de aminoácidos para uma CETP madura de fígado humano é conhecida (SEQ ID NO:4), tal como a sua correspondente sequência de ADN (SEQ ID NO:5) (veja-se, Drayna *et al.*, *Nature, 327:* 632 - 634 (1987)). Adicionalmente, são conhecidas as sequências de aminoácidos para uma variedade de epítopos de célula T de gama larga ou "universais" (veja-se, por exemplo, Panina-Bordignon *et al.*, *Eur. J. Immunol., 19:* 2232 - 2242 (1989), Etlinger *et al.* (1990), Pillai *et al.*, *Infect. Immun., 63:* 1535 - 1540 (1995)).

Uma molécula de ADN contendo as sequências de codificação de um epítopo de célula T auxiliar e uma ou mais porções de epítopo de célula B seleccionadas (e qualquer péptido de ligação, tal como poliglicina, ou outro(s) resíduo(s) adicional(ais), tais como uma cisteína amino- e/ou carboxilo-terminal, se assim desejado) pode ser prontamente sintetizada utilizando um sintetizador automático de ADN (*e.g.*, Sintetizador de ADN Oligo 1000, Beckman Corp.) ou contratando um serviço de síntese de ADN comercial (*e.g.*, Genset Corp., La Jolla, California). A molécula de ADN sintetizada pode então ser inserida em qualquer um de uma variedade de sistemas de

expressão de genes disponíveis (*e.g.*, plasmídeos bacterianos; vectores de expressão bacteriofágicos, vectores de expressão retrovirais, vectores de expressão baculovirais), utilizando métodos *standard* disponíveis na especialidade (*e.g.*, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. 1-3 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989)) e/ou conforme indicado pelo fabricante de um sistema de expressão de genes particular comercialmente disponível (*e.g.*, sistema de expressão de células bacterianas pPROEX™-1; sistema de expressão de células eucarióticas SFV; o sistema de expressão de baculovírus BAC-TO-BAC™; Life Technologies, Inc., Gaithersburg, Maryland). O péptido expresso é então isolado a partir do sistema de expressão utilizando métodos *standard* para purificar péptidos. A purificação dos péptidos da presente invenção pode ser expedita empregando cromatografia de afinidade ou imunoprecipitação com base na utilização de anticorpos contra a sequência de aminoácidos do epítopo de célula T auxiliar ou do epítopo de célula B (porção relacionada com CETP) particulares de um péptido de vacina da presente invenção. Por exemplo, o Mab TP2 liga-se aos 26 aminoácidos carboxilo-terminais de CETP humana, e pode ser útil num ou mais passos de imunoafinidade num esquema de purificação (Hesler, C.B., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, *263:* 5020-5023 (1988)).

É evidente que, se estiverem disponíveis moléculas de ADN que codificam cada um dos epítopos de célula T e de célula B para um péptido de vacina particular, podem ser empregues metodologias *standard de* ácido nucleico recombinante, incluindo a reacção em cadeia com polimerase (PCR), para produzir moléculas de ácido nucleico recombinantes que codificam os péptidos de vacina. Estas moléculas de ácido nucleico recombinantes podem ser inseridas em qualquer um de uma variedade de vectores de expressão que podem ser transfectados ou transformados em células hospedeiras apropriadas para expressar o péptido de vacina em cultura (veja-se, *e.g.*, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. 1-3 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989)). Por exemplo, a sequência de ADN que codifica a CETP humana madura de fígado possui a sequência nucleotídica de SEQ ID NO: 5 e a sequência de ADN que codifica a CETP de coelho madura possui a sequência

nucleotídica de SEQ ID NO:7. As sequências particulares que codificam vários epítopos de célula B de cada uma destas proteínas CETP podem ser recombinadas com sequências nucleotídicas que codificam epítopo(s) de célula T seleccionados e inseridas num vector de expressão para a expressão numa célula hospedeira apropriada.

Um exemplo de um plasmídeo recombinante que pode ser utilizado para produzir um péptido de vacina é o plasmídeo pCMV-CETP/TT em que o promotor de CMV dirige a transcrição de uma sequência de codificação de um péptido de vacina possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:9: MQYIKANSKFIGITERFPRPDGREAVAYRFEEDIFGFPKHLLVDFLQSLS, em que uma metionina amino-terminal está ligada a um epítopo de célula T do toxóide do tétano (aminoácidos 2 a 15 de SEQ ID NO:2) - e dois epítopos de célula B de CETP de coelho (aminoácidos 350 a 368 e 481 a 496 de SEQ ID NO:6). O plasmídeo pCMV-CETP/TT foi depositado na American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) e foi-lhe atribuído o nº. de acesso 98038.

Numa concretização preferida, um péptido da presente invenção também contém um resíduo de cisteína amino-terminal, ou outro resíduo, covalentemente ligado ao aminoácido amino-terminal da porção de epítopo de célula T auxiliar do péptido de vacina da presente invenção para utilização em ligação ou acoplamento do péptido a si próprio para formar dímeros de péptidos de vacina ou a outras moléculas, tais como moléculas transportadoras ou de ligação cruzada. Mais preferivelmente, o péptido de vacina da presente invenção possui a sequência de aminoácidos CQYIKANSKFIGITEFGFPEHLLVDFLQSLS (SEQ ID NO:2). É ainda mais preferido um péptido de vacina da presente invenção possuindo pelo menos dois epítopos de célula B de CETP. Um exemplo de um tal péptido de vacina possui a sequência CQYIKANSKFIGITELFPRPDQQHSVAYTFEEDIFGFPEHLLVDFLQSLS (SEQ ID NO:8).

D. Produção de Vacina

Os péptidos da presente invenção são utilizados para preparar vacinas que eliciam a produção de anticorpos endógenos que se ligam especificamente a CETP e modulam (*i.e.*, diminuem ou inibem) a actividade da CETP endógena. As vacinas

anti-CETP da presente invenção podem conter um ou vários péptidos diferentes da presente invenção. Por exemplo, péptidos possuindo diferentes porções de epítopo de célula T auxiliar (*e.g.*, epítopos de célula T auxiliar universais diferentes) e/ou diferentes porções de epítopo de célula B (*e.g.*, diferentes porções relacionadas com CETP dos 26 aminoácidos carboxilo-terminais de CETP) podem ser combinados e administrados na forma de uma única composição de vacina.

Adjuvantes farmaceuticamente aceitáveis, tais como alúmen, podem ser misturados com os péptidos de vacina aqui descritos para produzir vacinas da presente invenção. O alúmen é o único adjuvante actualmente aprovado para utilização na administração de vacinas a seres humanos (veja-se, Eldrige, J.H., *et al.*, em Immunobiology of Proteins and Peptides V: Vaccines; Mechanisms, Design, and Applications, Atassi, M.Z., ed. (Plenum Press, New York, 1989), página 192). Recentemente, o alúmen foi utilizado em combinação com um derivado de ftalilo de sódio de lipopolissacárido para administrar uma vacina que se mostrou ser eficaz contra a gonadotropina coriónica humana a seres humanos (veja-se, Talwar, G.P., *et al.*, *Proc. Natl. Acad Sci. USA, 91:* 8532-8536 (1994)).

Outros adjuvantes convencionais podem ser utilizados consoante sejam aprovados para uma utilização particular. Por exemplo, microesferas biodegradáveis constituídas por poli(DL-lactido-co-glicolido) foram estudadas como adjuvantes para administração oral ou parentérica de vacinas (Eldridge, J.H., *et al.*, em Immunobiology of Proteins and Peptides V: Vaccines; Mechanisms, Design, and Applications, Atassi, M.Z., ed. (Plenum Press, New York, 1989), pp. 191-202).

Foram utilizados outros adjuvantes para a administração de vacinas a mamíferos não humanos. Por exemplo, o Adjuvante Completo de Freund (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), o Adjuvante Incompleto de Freund (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), e o Sistema Adjuvante RIBI™ (RAS; RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Montana) são adjuvantes bem conhecidos e rotineiramente utilizados para administrar antigénios a animais que não seres humanos. Em adição, as estruturas adjuvantes podem também ser misturadas ou,

preferivelmente, covalentemente incorporadas em péptidos da presente invenção, por exemplo no resíduo de aminoácido amino- ou carboxilo-terminal dos péptidos. Estes adjuvantes incorporados incluem N-palmitoíl-S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-propil)]cisteína ("Pam_3-Cys-OH") lipófila no terminal amino dos péptidos da presente invenção; os lipopéptidos anfifílicos, solúveis em água, tais como Pam_3-Cys-Ser-Lys_4 e Pam_3-Cys-Ser-Glu_4; os glicopéptidos tais como N-acetil-glucosaminil-N-acetilmuramil-alanil-D-isoglutamina ("GMDP"), dipéptidos de muramilo, e alanil-N-adamantil-D-glutamina; e adjuvantes de poliamida à base de gel que podem ser facilmente ligados a péptidos durante a sua síntese química *in vitro* (veja-se, Synthetic Vaccines, Nicholson, B.H., ed. (Blackwell Scientific Publications, Cambridge, Massachusetts, 1994), pp. 236-238).

Em adição, os péptidos de vacina da presente invenção podem ser ligados a outras moléculas que podem aumentar a imunogenicidade dos péptidos. Por exemplo, a ligação dos péptidos da presente invenção a uma superfície de uma molécula maior, tal como albumina sérica, pode aumentar a imunogenicidade porque os epítopos dos péptidos de vacina são apresentados ao sistema imunitário de um indivíduo na forma de múltiplas cópias repetidas adjacentes (veja-se, e.g., Tam, J.P., *Proc. Natl. Acad Sci. USA, 85:* 5409-5413 (1988); Wang, C.Y., *et al., Science, 254:* 285-288 (1991); Marguerite, M., *et al., Mol. Immunol., 29:* 793-800 (1992)). Estes arranjos "múltiplos" ou "plurivalentes" dos péptidos de vacina da presente invenção podem ser criados utilizando moléculas de ligação cruzada (veja-se atrás). Por exemplo, como atrás notado, as moléculas de ligação cruzada bifuncionais possuem dois locais reactivos, um dos locais pode ligar o ligante a um péptido de vacina da presente invenção e o outro local está disponível para reagir com uma molécula diferente, *e.g.*, uma proteína maior como albumina sérica ou uma resina ou uma conta polimérica. Assim, as moléculas de ligação cruzada covalente podem ser utilizadas para ligar péptidos de vacina a outras proteínas ou substratos para formar arranjos de múltiplas cópias dos péptidos (montagens de múltiplas cópias de péptidos).

A ligação de péptidos de vacina da presente invenção a outra molécula ou superfície deverá ser realizada de uma maneira que não rompa significativamente ou reduza as características imunogénicas das porções de epítopo de célula T auxiliar e de epítopo de célula B (relacionada com CETP) ligadas dos péptidos de vacina. Preferivelmente, a utilização destas moléculas ligantes aumenta a imunogenicidade dos péptidos de vacina da presente invenção como evidenciado, por exemplo, por um aumento mais rápido do título de anticorpo anti-CETP e/ou pela produção de anticorpos anti-CETP de maior afinidade do que quando aos indivíduos são administrados péptidos de vacina que não estão ligados. Estas moléculas de ligação cruzada podem também ser utilizadas para ligar um péptido da presente invenção a uma molécula "potenciador imunogénico" tal como factor estimulante de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), que se mostrou servir como potenciador imunogénico eficaz para gerar a produção de anticorpos antitumorais específicos (*e.g.*, Tao, M.H., *et al.*, *Nature, 362:* 755-758 (1993)). Outro destes potenciadores imunogénicos é a hemocianina de lapa *Fissurella* (KLH) (veja-se, Ada, G.L., em Fundamental Immunology, third edition, W.E. Paul, ed. (Raven Press Ltd., New York, 1993), pp. 1309-1352). Como atrás notado, um exemplo de um arranjo plurivalente utilizando KLH é a ligação de péptidos de vacina a qualquer um de vários resíduos de cisteína da molécula de KLH por via da formação de pontes de dissulfureto.

2. Utilização de Péptidos de Vacina

Os métodos gerais de administração e teste de vacinas são bem conhecidos dos peritos na especialidade (veja-se, *e.g.*, Talwar, G.P., *et al.*, *Proc. Natl. Acad Sci. USA, 91:* 8532-8536 (1994)). Os péptidos da presente invenção são especificamente desenhados para serem administrados, sozinhos ou em associação com um ou mais transportadores ou adjuvantes farmaceuticamente aceitáveis, como vacina que irá eliciar uma resposta de anticorpos contra a CETP endógena do beneficiário da vacina. Em algumas concretizações da presente invenção, os péptidos de vacina podem também ser combinados e administrados com vacinas para outras doenças ou desordens.

A resposta imunitária a CETP endógena deverá significativamente inibir a actividade da CETP, alterar a semivida sérica da CETP, causar a depuração da CETP através da formação de complexos imunitários, alterar o tráfego de colesterol-HDL, desviar o equilíbrio do teor de colesterol de lipoproteínas, alterar o catabolismo do colesterol e/ou reduzir o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. O controlo dos níveis de LDL, VLDL e/ou HDL é um indicador ou ponto final aceite no tratamento de doença cardiovascular pois esses níveis estão correlacionados com um risco diminuído de doença cardiovascular ou progressão adicional dessa doença (Mader, S.S., em Human Biology. 4th ed., pp. 83, 102 (Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa, 1995)). Desse modo, o efeito profiláctico ou terapêutico desejado de acordo com a presente invenção é evidenciado pela eliciação de anticorpos num indivíduo que se ligam a CETP e/ou inibem a actividade de CETP, ou por uma diminuição relativa dos níveis de LDL e/ou VLDL em comparação com os níveis de HDL à medida que o título de anticorpos dirigidos contra a CETP endógena aumenta, ou por uma elevação dos níveis absolutos de HDL em circulação com a produção de anticorpos anti-CETP, ou por uma inibição ou diminuição no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em tecido cardiovascular.

Como aqui demonstrado, a administração de péptidos de vacina num modelo de coelho de aterosclerose conduziu a uma diminuição significativa no desenvolvimento de placas ateroscleróticas em animais alimentados com uma dieta suplementada com colesterol. Esta evidência indica que a vacinação para eliciar anticorpos contra a CETP endógena pode ser um método útil para o tratamento ou prevenção de aterosclerose. Esta é a primeira evidência de que a eliciação de uma resposta imunitária contra CETP pode inibir o desenvolvimento de aterosclerose.

Estes anticorpos produzidos endogenamente contra a CETP do próprio indivíduo é vantajosa relativamente a outras possíveis abordagens terapêuticas. Por exemplo, a utilização de inibidores polipeptídicos de CETP, tais como um isolado recentemente de babuínos (veja-se, *e.g.*, WO 93/11782; Kushwaha, R.S., *et al.*, *J. Lipid Res.*, *34:* 1285-1297 (1993); *Genetic Engineering News, 14:* 44 (1994); *Science, 262:* 1974-

1975 (1993)), ou infusão de anticorpos anti-CETP produzidos exogenamente (estranhos) que inibem a actividade de CETP, ambos provavelmente eliciam uma reacção imunitária dirigida contra estas moléculas inibidoras de CETP estranhas. Esta resposta imunitária pode rapidamente inactivar e/ou depurar do corpo o inibidor de CETP fornecido exogenamente. Teoricamente, esta resposta imunitária contra o inibidor de CETP fornecido exogenamente pode ser ultrapassada pela administração de doses crescentes do inibidor. Contudo, múltiplas administrações de doses de um inibidor de CETP estranho, particularmente múltiplas doses de quantidades sempre crescentes destas moléculas estranhas, apresenta a possibilidade de uma reacção de hipersensibilidade, pondo em risco a saúde do indivíduo a tratar. Estes problemas associados à utilização de inibidores de CETP produzidos exogenamente são evitados utilizando as vacinas à base de péptidos da presente invenção, que recrutam anticorpos do sistema imunitário do próprio indivíduo para inibir especificamente a CETP endógena. A dosagem repetida, a dosagem graduada e os efeitos secundários indesejáveis (tais como uma resposta de anticorpos humanos anti-ratinho (HAMA)) são evitados empregando a abordagem de vacina anti-CETP aqui descrita.

As composições de péptidos de vacina de CETP da presente invenção podem ser administradas por qualquer via utilizada para vacinação, incluindo: a parentérica, tal como intraperitoneal, interperitoneal, intradérmica (subcutânea), intramuscular, intravenosa ou oral. Preferivelmente, as vacinas da presente invenção são administradas por via parentérica, *e.g.*, intraperitoneal, interperitoneal, intradérmica, intramuscular ou intravenosa. Se for desejada a administração oral de um péptido de vacina, pode ser misturado qualquer excipiente oral farmaceuticamente aceitável com os péptidos de vacina da presente invenção, tal como, por exemplo, soluções aprovadas para utilização na vacina da poliomielite oral Sabin. Tal como com certas outras vacinas, tais como a do tétano, pode ser necessária a administração ocasional de reforços das composições de péptido de vacina de CETP, para manter um nível desejado de modulação ou inibição da CETP endógena. Tal como atrás notado, microesferas biodegradáveis, tais como as compostas por poli(DL-lactido-co-glicolido), mostraram-se úteis para a entrega eficaz da vacina

e imunização pelas vias oral ou parentérica (Eldridge, J.H., *et al.*, em Immunobiology of Proteins and Peptides V: Vaccines: Mechanisms, Design, and Applications, Atassi, M.Z., ed. (Plenum Press, New York, 1989), pp. 191-202).

As dosagens apropriadas das vacinas de péptidos da presente invenção são estabelecidas por metodologias gerais de vacinas utilizadas na especialidade com base em parâmetros mensuráveis os quais a vacina se propõe afectar, incluindo a monitoração de contra-indicações potenciais, tais como reacção de hipersensibilidade, eritema, indução, dor ao toque (veja-se, e.g:, Physician's Desk Reference. 49th ed., (Medical Economics Data Production Co., Mont Vale, New Jersey, 1995), pp. 1628, 2371 (com referência à vacina da hepatite B), pp. 1501, 1573, 1575 (com referência às vacinas do sarampo, da papeira e/ou da rubéola), pp. 904, 919, 1247, 1257, 1289, 1293, 2363 (com referência às vacinas da difteria, tétano e/ou tosse convulsa)) ; Talwar, G.P., *et al.*, *Proc. Natl. Acad Sci. USA, 91:* 8532-8536 (1994)). Uma abordagem comum e tradicional para a vacinação de seres humanos consiste em administrar uma dose inicial de uma vacina particular para sensibilizar o sistema imunitário e depois seguida de uma ou mais doses de "reforço" da vacina para eliciar uma resposta anamnéstica pelo sistema imunitário que foi sensibilizado pela administração inicial da vacina (vacinação). Este procedimento de administração principal e de "reforço" é bem conhecido e vulgarmente utilizado na especialidade, como por exemplo, no desenvolvimento e utilização das vacinas do sarampo, poliomielite, tétano, difteria e hepatite B.

Inicialmente, a quantidade de um péptido de vacina administrada a um indivíduo pode ser a necessária para eliciar uma resposta de anticorpos eficaz para neutralizar o nível aproximado de actividade de CETP endógena presente no indivíduo antes da vacinação, como pode ser determinado medindo a actividade de GETP em amostras de soro ou plasma do indivíduo, por exemplo como determinado utilizando um ensaio de CETP comercialmente disponível (*e.g.*, Diagnescent Technologies, Inc., Yonkers, New York). As amostras de plasma ou soro de um indivíduo vacinado podem também ser monitoradas para determinar se um aumento mensurável nos níveis de HDL total ou HDL-C é observado após a administração do péptido de

vacina utilizando ensaios comercialmente disponíveis (*e.g.*, disponíveis de Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, Virginia). Um aumento na concentração (título) de anticorpos anti-CETP em circulação pode ser medido em amostras de plasma ou soro, por exemplo, utilizando um ensaio ELISA (veja-se, *e.g.*, Exemplo 3). Assim, é possível e recomendado que inicialmente seja estabelecido se um aumento de anticorpos anti-CETP pode ser correlacionado com um aumento no nível de HDL ou HDL-C, ou com uma diminuição na actividade de CETP. Desse modo, é apenas necessário monitorar um aumento no título de anticorpo anti-CETP para determinar se foi administrada uma dosagem suficiente de péptido de vacina ou se é indicada uma dose de "reforço" para eliciar um nível elevado de anticorpo anti-CETP. Este é um procedimento comum com várias vacinações estabelecidas, tais como a vacinação contra o vírus da hepatite B.

Estão presentemente disponíveis métodos de imagiologia tridimensional arterial que podem ser utilizados para identificar lesões arteriais e monitorar o seu desenvolvimento ou regressão num indivíduo (veja-se, por exemplo, McPherson, *Scientific American Science & Medicine,* páginas 22-31, (Março/Abril, 1996)). Assim, estes métodos de imagiologia podem ser utilizados para monitorar a eficácia da vacinação com um péptido da presente invenção.

Uma apreciação mais completa da presente invenção e das suas vantagens, pode ser obtida dos exemplos não limitantes que se seguem.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1. Desenho e Síntese de um Péptido de Vacina Anti-CETP

Para investigar a possibilidade de eliciar uma resposta de anticorpos contra a CETP endógena, preparou-se um péptido possuindo uma porção de epítopo de célula T auxiliar compreendendo um epítopo de célula T auxiliar universal de toxóide do tétano e uma porção de epítopo de célula B compreendendo uma região carboxilo-terminal de CETP humana. Foi desenhado um péptido de 31 aminoácidos possuindo a sequência de aminoácidos CQYIKANSKFIGITEFGFPEHLLVDFLQSLS (SEQ

ID NO:2), em que QYIKANSKFIGITE (aminoácidos 2 a 15 de SEQ ID NO:2) é a mesma sequência de aminoácidos que os aminoácidos 830 a 843 da proteína do toxóide do tétano, FGFPEHLLVDFLQSLS (aminoácidos 16 a 31 de SEQ ID NO:2) é a mesma sequência de aminoácidos que os aminoácidos 461 a 476 de SEQ ID NO:4 contendo o domínio de transferência de lípidos neutros de CETP humana e que se sabe ser reconhecida pelo Mab anti-CETP humana TP2 (Wang, S., *et al., J. Biol. Chem., 267:* 17487-17490 (1992); Wang, S., *et al., J. Biol. Chem, 268:* 1955-1959 (1993)), e o resíduo de cisteína (C) amino-terminal está presente para utilização na ligação do péptido a si próprio ou a outras moléculas se desejado. A porção relacionada com CETP deste péptido sintético difere da porção correspondente da sequência de aminoácidos de CETP de coelho apenas no resíduo de ácido glutâmico (E) (veja-se, Nagashima, M., *et al., J. Lipid Res., 29:* 1643-6149 (1988) (clonagem do gene de CETP de coelho)). Contudo, um estudo anterior indicou que o Mab anti-CETP humana pode reconhecer esta região correspondente de CETP de coelho (veja-se, Hesler, C.B., *et al., J. Biol. Chem., 263:* 5020-5023 (1988)). O péptido foi sintetizado por encomenda utilizando métodos de síntese de péptidos *standard* pela Quality Controlled Biochemicals, Inc. (Hopkinton, Massachusetts).

EXEMPLO 2. Imunização de Coelhos Contra CETP Endógena

O péptido de vacina sintético (SEQ ID NO:2) do Exemplo 1 anterior foi injectado em Coelhos brancos New Zealand para testar a capacidade do péptido de vacina para eliciar uma resposta imunitária contra CETP endógena de coelho. O Grupo I continha três coelhos (rb#1 - #3), cada um dos quais submetido a um protocolo para administração do péptido de vacina. O Grupo II continha um coelho (rb#4) como controlo que não foi tratado.

O protocolo geral para o teste do péptido de vacina nos coelhos é mostrado na Figura 1. No Dia 1, suspendeu-se o péptido (100 µg) no sistema adjuvante RIBI™ (RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Montana) de acordo com as instruções do fabricante até um volume final de 1000 µl, e cada coelho do Grupo I foi injectado em dois locais intramusculares (250 µl por local), subcutaneamente em dois locais (100 µl por local),

e seis locais intradérmicos (50 µl por local). No Dia 28, administrou-se um reforço (100 µg de péptido em sistema adjuvante RIBI™) como no Dia 1. No Dia 56, administrou-se outro reforço (100 µg de péptido em sistema adjuvante RIBI™) como no Dia 1.

Colheram-se amostras de sangue (aproximadamente 1-5 ml) da orelha de cada coelho antes de cada injecção inicial ("pré-sangria") e nos Dias 42, 70 e 108, excepto que não houve pré-sangria para o coelho de controlo rb#4. Preparam-se amostras de plasma sanguíneo por métodos *standard* de centrifugação para separar os componentes celulares do plasma. Armazenaram-se as amostras de plasma a -70° C. Analisaram-se as amostras de plasma de ambos os Grupos I e II quanto à presença e aumento do título de anticorpos anti-CETP e quanto aos níveis de colesterol total no plasma e HDL-C no plasma.

EXEMPLO 3. Produção de Anticorpo Anti-CETP em Coelhos Vacinados

ELISA Directo para Titulação de Anticorpos Anti-CETP

Utilizou-se um ensaio imunossorvente com enzima ligada (ELISA) em sanduíche para titular as amostras de plasma contendo anticorpo anti-CETP. Neste caso, adsorveu-se CETP humana recombinante (rCETP humana, obtida da linha de células CHO recombinantes CHO(AT) licenciada de The Trustees of Columbia University, New York, New York) em poços de uma placa de microtítulo, e adicionaram-se várias diluições de plasma de coelho dos coelhos dos Grupos I e II a cada poço. Cada poço de uma placa de 96 poços NUNC Maxisorb foi revestido por exposição durante a noite a 4°C, a 100 µl de uma solução a 1 µg/ml de rCETP humana em PBS. A ligação não específica foi bloqueada por adição de uma solução a 1% de BSA em PBS e Tween a 0,05% a cada poço e incubação durante 2 horas à temperatura ambiente (20°-22°C) num agitador rotativo a 150 rpm. Lavaram-se depois os poços quatro vezes com tampão de lavagem de ELISA (PBS + Tween a 0,05%). Diluíram-se depois as amostras de plasma de 1:10 em tampão de diluição (BSA a 1% em PBS), seguindo-se 6 diluições em série de duas vezes no mesmo tampão. Adicionaram-se as amostras diluídas (100 µl) aos poços, incubaram-se durante 2 horas à temperatura ambiente num

agitador rotativo a 150 rpm, e depois lavaram-se 4 vezes com tampão de lavagem de ELISA (PBS + Tween a 0,05%). Para detectar os anticorpos anti-CETP ligados, adicionaram-se 100 µl de uma diluição de 1:10 000 de imunoglobulina de cabra anti-coelho marcada com peroxidase de rábano silvestre (HRP) (Southern Biotechnology Associates, Inc.; Birmingham, Alabama) em tampão de diluição, e incubara-se as placas durante 2 horas à temperatura ambiente num agitador rotativo a 150 rpm. Lavaram-se então os poços quatro vezes com tampão de lavagem de ELISA (veja-se atrás), adicionou-se substrato de peroxidase TMB (substrato de peroxidase TMB, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Maryland), e incubaram-se as placas 30 minutos à temperatura ambiente. A alteração da densidade óptica foi monitorada espectrofotometricamente a 450 nm utilizando um leitor de ELISA (*e.g.*, E-max, Molecular Device Corp., Menlo Park, California). Neste ensaio, a D.O. foi directamente proporcional à quantidade de anticorpos anti-CETP presentes nas amostras de plasma. Os resultados indicaram que todos os coelhos (rb#1 - rb#3) do Grupo I produziram anticorpo anti-CETP que foi específico para CETP humana recombinante. Não foi produzido anticorpo anti-CETP no coelho de controlo não tratado (rb#4) do Grupo I no Exemplo 2. Veja-se a Figura 2.

ELISA Competitivo para Detecção de Anticorpo Anti-CETP

Este ensaio foi desenhado para determinar se os coelhos vacinados tinham gerado anticorpos que se ligam ao mesmo epítopo que o Mab anti-CETP TP2 (licenciado de The Trustees of Columbia University, New York, New York). Adaptou-se um ELISA competitivo *standard* para detectar a presença de anticorpos anti-CETP em plasma de coelho. Neste ensaio, conjugou-se peroxidase de rábano silvestre (HRP) ao Mab anti-CETP TP2 que se liga especificamente ao fragmento de 26 aminoácidos carboxilo-terminais de CETP humana (Wang *et al., J. Biol. Chem., 267:* 17487-17490 (1992); Wang *et al., J. Biol. Chem., 268:* 1955-1959 (1993)).

Utilizou-se o método seguinte para conjugar a HRP ao anticorpo. Dialisou-se o anticorpo contra Na_2CO_3 (50 mM, pH 9,5). O anticorpo dialisado estava numa concentração de 2 a 5 mg/ml. Dissolveu-se a HRP (Boehringer-Manaheim) em tampão de

acetato de sódio (1,0 mM, pH 4,4) numa concentração de 6 mg/ml. A HRP foi depois activada por adição de 0,2 ml de periodato de sódio (tampão acetato a 21,4 mg/ml, feito imediatamente antes da utilização) a cada 1 ml de solução de HRP, e incubou-se a mistura de activação à temperatura ambiente num agitador rotativo durante 20 minutos. A HRP activada foi então passada sobre uma coluna G25 equilibrada com tampão acetato para dessalinizar a HRP activada. Uma densidade óptica (D.O.) a 403 nm corresponde a aproximadamente 1 mg de HRP/ml. A HRP activada dessalinizada, foi então adicionada ao anticorpo dialisado numa quantidade igual a metade da quantidade de anticorpo (em peso, por exemplo, para cada 1 mg de IgG, adicionam-se 0,5 mg de HRP activada), e incubou-se a mistura durante 2 horas à temperatura ambiente num agitador rotativo para permitir que a HRP se conjugue com as moléculas de anticorpo. Parou-se a reacção de conjugação por adição de 20 µl de boro-hidreto de sódio (10 mg/ml) por cada 1 ml da mistura de conjugação HRP-anticorpo, e incubou-se então a mistura em gelo durante 30 minutos. Dialisou-se a mistura de anticorpo conjugado com HRP durante a noite contra solução salina tamponada com fosfato (PBS) e depois centrifugou-se (Airfuge) durante 15 minutos a 30 psi. Adicionou-se timerosal ao sobrenadante (anticorpo conjugado com HRP) a 0,5 %, e adicionou-se albumina sérica bovina até 1%. Armazenou-se a preparação de anticorpo conjugado com BRP a 4°C e protegida da luz.

Revestiram-se os poços de uma placa de microtítulo de 96 poços com CETP por incubação em cada poço de 100 µl de uma solução a 300 ng/ml de CETP humana recombinante (obtida da linha de células CHO recombinantes CHO(AT), licenciada de The Trustees of Columbia University, New York, New York) em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Drenaram-se os poços e encheram-se os poços com uma solução a 1% (p/p) de albumina sérica bovina (BSA) em PBS e Tween a 0,05% (vol./vol.) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) e incubou-se durante 2 horas à temperatura ambiente num agitador rotativo (aproximadamente 150 rpm) para bloquear a ligação não específica. Lavaram-se os poços quatro vezes com tampão de lavagem de ELISA (PBS + Tween a 0,05%), e adicionaram-se 100 µl de amostras de plasma diluídas em tampão de diluição (BSA a 1% em PBS). Incubaram-se então as placas durante 1 hora

à temperatura ambiente num agitador rotativo como atrás, e depois lavaram-se quatro vezes com tampão de lavagem de ELISA. Em seguida adicionaram-se a cada poço 100 µl de uma diluição de 1:100 000 de Mab TP2 conjugado com peroxidase de rábano silvestre (marcado) em tampão de diluição. Incubaram-se as placas durante 1 hora à temperatura ambiente num agitador rotativo como atrás, depois lavaram-se quatro vezes com tampão de lavagem de ELISA. O substrato da peroxidase de rábano silvestre (*e.g.*, substrato de peroxidase TMB, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Maryland) foi adicionado a cada poço e monitorou-se a alteração da densidade óptica (D.O.) a 450 nm espectrofotometricamente utilizando um leitor de ELISA (*e.g.*, E-max, Molecular Devices Corp., Menlo Park, California). Neste ensaio, se foi produzido anticorpo contra a porção relacionada com CETP do péptido de vacina, estas moléculas de anticorpo anti-CETP não marcadas presentes nas amostras de plasma competem com o Mab TP2 marcado pela ligação à CETP adsorvida nas paredes dos poços e observa-se uma inibição do desenvolvimento de cor à medida que a concentração da amostra de plasma aumenta (*i.e.*, a D.O. é inversamente proporcional à quantidade de anticorpo anti-CETP presente em cada amostra de plasma).

Como mostrado na Figura 3, esta inibição da ligação de TP2 à CETP foi observada em amostras de plasma de dois dos três coelhos a que foi administrado o péptido de vacina, desse modo indicando produção de anticorpo específico de CETP (comparem-se os gráficos de soros de coelho rb#2 e rb#3 com plasma de coelho de controlo não tratado rb#4 na Figura 3). A inibição mais forte da ligação de TP2 à CETP foi exibida pelo plasma do coelho rb#3 (veja-se a Figura 3).

EXEMPLO 4. Níveis de Colesterol e HDL em Amostras de Plasma de Coelhos Vacinados

As amostras de plasma colhidas de coelhos dos Grupos I e II no Exemplo 2 em vários tempos (dias) no protocolo de vacinação foram também ensaiadas quanto à concentração de colesterol total (Figura 4) e HDL-C (Figura 5). Os níveis de colesterol total e HDL-C no plasma foram determinados utilizando ensaios *standard* comerciais (Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, Virginia). As amostras de plasma dos dois

coelhos (rb#2 e rb#3) que tinham os maiores títulos de anticorpo anti-CETP apresentaram um aumento de 2 a 5 vezes nas concentrações de HDL-C no Dia 70 em comparação com amostras de plasma pré-sangria. Os coelhos #2 e #3 também apresentaram concentrações de HDL no plasma crescentes ao longo do tempo em comparação com o coelho de controlo (rb#4) e o coelho com o menor título de anticorpo (rb#1), ambos exibindo concentrações decrescentes de HDL ao longo do tempo (Figura 5).

A Figura 6 mostra a razão entre colesterol não associado a HDL (Não-HDL) e colesterol HDL (HDL) no Dia 70 pós-vacinação. Os resultados mostram uma tendência no sentido de um perfil anti-aterogénico no grupo de coelhos vacinados (tracejada) em comparação com o coelho não vacinado (a branco). Embora não se observasse nenhuma diferença significativa no colesterol total nas amostras de plasma, a razão Não-HDL/HDL geralmente diminuiu com o aumento dos níveis de anticorpo anti-CETP nos coelhos vacinados do Grupo I.

EXEMPLO 5. Administração a Ratinhos Transgénicos que Expressam CETP Humana

Uma estirpe de ratinhos transgénicos que expressam CETP humana ficou recentemente disponível no comércio (Biodigm™-ratinhos CETP; Pharmakon USA, Waverly, Pennsylvania). Estes ratinhos expressam CETP humana nos seus fígados e refere-se que possuem níveis aproximadamente 50 porcento mais baixos de colesterol associado a HDL do que seus pares de ninhadas não transgénicas quando alimentados com uma dieta de ração normal. Estes animais transgénicos servem como modelo experimental adicional para adicionalmente testar os péptidos de vacina da presente invenção.

Utilizaram-se dois grupos que consistiam em seis ratinhos transgénicos que expressam CETP para testar o mesmo péptido de vacina que se utilizou nos Exemplos 1 a 4 anteriores. Cada ratinho do Grupo I recebeu injecções primárias do péptido de vacina dissolvido em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e emulsionado com adjuvante completo de Freund (1:1) para obter uma concentração final de 100 µg/100 µl. A cada ratinho foi administrada a mistura de péptido de vacina numa dose de 50 µl (50 µg) em cada um de dois locais subcutâneos.

No Dia 28, e novamente no Dia 56, administraram-se aos animais, similarmente, reforços da vacina de péptido (100 µg) em PBS, excepto que o péptido de vacina estava emulsionado com adjuvante Incompleto de Freund. Colheram-se amostras de sangue no Dia 42 e no Dia 63. Os ratinhos de controlo do Grupo II receberam injecções primárias e de reforço de PBS emulsionado com adjuvante, mas sem péptido de vacina, da mesma maneira que os ratinhos do Grupo I. Preparam-se as amostras de plasma como descrito atrás para as amostras de plasma de coelho.

Todos os ratinhos do Grupo I tinham títulos significativos de anticorpo anti-CETP como medido numa ampla gama de diluições de plasma (1:10 a 1:1 000 000) por ELISA directo como descrito atrás (veja-se a Figura 7). Adicionalmente, três dos seis ratinhos do Grupo I mostraram também ter anticorpo anti-CETP que competia com Mab TP2 pela ligação a CETP humana recombinante (como se verificou para os coelhos rb#2 e rb#3 no Exemplo 3, atrás).

EXEMPLO 6. Imunização de Coelhos Contra CETP Endógena num Modelo de Aterosclerose Alimentado com Colesterol

O péptido de vacina sintético (SEQ ID NO:2) do Exemplo 1 anterior foi injectado em coelhos brancos New Zealand para testar a capacidade do péptido de vacina para eliciar uma resposta imunitária contra CETP de coelho endógena e para proteger ou reduzir o desenvolvimento de aterosclerose. O Grupo I continha seis coelhos (rb#1-#6), cada um submetido a um protocolo para administração do péptido de vacina. O Grupo II de controlo continha seis coelhos (rb#7-12) que foram vacinados mas não alimentados com dieta de alto teor de colesterol. O Grupo III de controlo continha seis coelhos (rb#13-18) que não foram vacinados nem foram alimentados com uma dieta de alto teor de colesterol. O Grupo IV de controlo continha seis coelhos (rb#19-24) que não foram vacinados mas foram alimentados com uma dieta de alto teor de colesterol. A dieta de alto teor de colesterol foi administrada a partir de quatro semanas depois de um reforço final com a vacina e continuou durante um total de 17 semanas.

O protocolo geral para o teste do péptido de vacina nos coelhos é mostrado na Tabela 1 adiante. No Dia 0, suspendeu-se

o péptido (100 µg) no sistema adjuvante RIBI™ (RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Montana) de acordo com as instruções do fabricante até um volume final de 1000 µl, e cada coelho do Grupo I e II foi injectado em dois locais intramusculares (250 µl por local), subcutaneamente em dois locais (100 µl por local) e seis locais intradérmicos (50 µl por local). No Dia 28, administrou-se um reforço (100 µg de péptido em sistema adjuvante RIBI™) como no Dia 0. No Dia 49, administrou-se outro reforço (100 µg de péptido no sistema adjuvante RIBI™) como no Dia 0. No Dia 77, alimentaram-se os Grupos I e IV com dietas enriquecidas em colesterol a 0,25% (p/p) (ração para coelhos suplementada com colesterol (Farmer's Exchange, Framingham, MA). Os Grupos II e III foram alimentados com a mesma ração para coelhos mas não suplementada com colesterol (Farmer-s Exchange, Framingham, MA).

Colheram-se amostras de sangue (aproximadamente 1-5 ml) da orelha de cada coelho antes de cada injecção inicial ("pré-sangria") e posteriormente, por rotina, aproximadamente de duas em duas semanas. Prepararam-se as amostras de plasma sanguíneo por métodos *standard* de centrifugação para separar os componentes celulares do plasma. Armazenaram-se as amostras de plasma a -70°C. Analisaram-se as amostras de plasma de todos os Grupos quanto à presença e aumento do título de anticorpos anti-CETP e quanto aos níveis de colesterol total no plasma e HDL-C no plasma.

Tabela 1

ESQUEMA PARA COELHO

	procedimento, por grupo				RAÇÃO	RAÇÃO		
SEMANA	1	2	3	4	grupo 2 e 3	grupo 1 e 4	SEMANAS/DIETA	DIA ACTUAL
-2	B	B	B	B	Normal	Normal		-14
-1	B	B	B	B	Normal	Normal		-6
0	B,V	B,V	B	B	Normal	Normal		0
1					Normal	Normal		7
2	B	B	B	B	Normal	Normal		14
3					Normal	Normal		21
4	B,V	B,V	B	B	Normal	Normal		28
5					Normal	Normal		35
6					Normal	Normal		42
7	B,V	B,V	B	B	Normal	Normal		49
8					Normal	Normal		56
9					Normal	Normal		63
10	B	B	B	B	Normal	Normal		70
11					Transição	Transição	0	77
12					controlo	0,25% col	1	84
13	B	B	B	B	controlo	0,25% col	2	91
14					controlo	0,25% col	3	98
15	B	B	B	B	controlo	0,25% col	4	105
16					controlo	0,25% col	5	112
17	B	B	B	B	controlo	0,25% col	6	119
18					controlo	0,25% col	7	126
19	B	B	B	B	controlo	0,25% col	8	133
20					controlo	0,25% col	9	140
21	B	B	B	B	controlo	0,25% col	10	147
22					controlo	0,25% col	11	154
23	B	B	B	B	controlo	0,25% col	12	161
24					controlo	0,25% col	13	168
25	B	B	B	B	controlo	0,25% col	14	175
26					controlo	0,25% col	15	182
27					controlo	0,25% col	16	189
28	B,E			B,E	controlo	0,25% col	17	196

CHAVE:

1 = vacinado, dieta de alto teor de colesterol
2 = vacinado, dieta normal/controlo
3 = controlo, dieta normal/controlo
4 = controlo, dieta de alto teor de colesterol

B = amostra de sangue
V = vacinado
E = eutanásia

EXEMPLO 7. Produção de Anticorpo Anti-CETP em Coelhos Vacinados num Modelo Aterosclerótico (Hipercolesterolemia)

ELISA Directo para Titulação de Anticorpos Anti-CETP Humana Recombinante

Utilizou-se um ensaio imunossorvente com enzima ligada (ELISA) em sanduíche para titular amostras de plasma contendo anticorpo anti-CETP. Neste arranjo, adsorveu-se CETP humana recombinante (rCETP humana, obtida da linha de células CHO recombinantes CHO(AT) licenciadas de The Trustees of Columbia University, New York, New York) nos poços de uma placa de microtítulo, e adicionaram-se a cada poço várias diluições de plasma de coelho dos coelhos dos Grupos I - IV. Cada poço de uma placa NUNC Maxisorb de 96 poços foi revestido por exposição durante a noite a 4°C a 100 µl de uma solução a 1 µg/ml de rCETP humana em PBS. Bloqueou-se a ligação não específica por adição de uma solução a 1% de BSA em PBS e Tween a 0,05% a cada poço e incubação durante 2 horas à temperatura ambiente (20°-22°C) num agitador rotativo a 150 rpm. Lavaram-se então os poços quatro vezes com tampão de lavagem de ELISA (PBS + Tween a 0,05%). Diluíram-se então as amostras de plasma de 1:10 em tampão de diluição (BSA a 1% em PBS), seguindo-se 6 diluições em série de duas vezes no mesmo tampão. Adicionaram-se as amostras diluídas (100 µl) aos poços, incubaram-se durante 2 horas à temperatura ambiente num agitador rotativo a 150 rpm, e depois lavaram-se 4 vezes com tampão de lavagem de ELISA (PBS + Tween a 0,05%). Para detectar anticorpos anti-CETP ligados, adicionaram-se 100 µl de uma diluição de 1:10 000 de imunoglobulina de cabra anti-coelho marcada com peroxidase de rábano silvestre (HRP) (Southern Biotechnology Associates, Inc.; Birmingham, Alabama) em tampão de diluição, e incubaram-se as placas durante 2 horas à temperatura ambiente num agitador rotativo a 150 rpm. Lavaram-se então os poços quatro vezes com tampão de lavagem de ELISA (veja-se atrás), adicionou-se substrato de peroxidase TMB (substrato de peroxidase TMB, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Maryland), e incubaram-se as placas 30 minutos à temperatura ambiente. A alteração da densidade óptica foi monitorada espectrofotometricamente a 450 nm utilizando um leitor de ELISA (*e.g.*, E-max, Molecular Device Corp., Menlo Park,

California). Neste ensaio, a D.O. foi directamente proporcional à quantidade de anticorpos anti-CETP presentes nas amostras de plasma. Os resultados indicaram que cinco dos doze coelhos vacinados (Grupos I e II) produziram anticorpo anti-CETP que era específico para CETP humana recombinante (veja-se a Figura 9). Não foi produzido anticorpo anti-CETP humana recombinante nos Grupos III e IV de controlo não tratados.

ELISA Directo para Titulação de Anticorpos Autorreactivos Anti-CETP de Coelho (Endógena).

Um péptido (péptido de coelho) contendo uma sequência de aminoácidos da CETP de coelho endógena foi sintetizado por encomenda utilizando métodos *standard* de síntese de péptidos pela Quality Controlled Biochemicals, Inc. (Hopkinton, Massachusetts) possuindo a sequência de SEQ ID NO:7: LQMDFGFPKHLLVDFLQSLS, que corresponde aos aminoácidos 457 a 476 da região carboxilo-terminal da sequência de CETP humana mostrada em SEQ ID NO:4. Esta porção da sequência de aminoácidos de CETP de coelho difere da sequência da CETP humana por o resíduo de ácido glutâmico na posição 465 da sequência humana (SEQ ID NO:4) estar substituído por um resíduo de lisina (veja-se o aminoácido 9 em SEQ ID NO:7). Para os fins deste ensaio, adquiriu-se o péptido de coelho na forma de um derivado biotinilado (biotina covalentemente ligada ao resíduo de leucina amino-terminal).

As placas de microtítulo revestidas com estreptavidina pré-bloqueadas foram preparadas como se segue. Distribuiu-se uma centena de µl de estreptavidina a 5 µg/ml (N.º de catálogo 43-4302, Zymed Laboratories, Inc., S. San Francisco, CA) em PBS por cada poço de microplacas de 96 poços com tiras destacáveis (N.º de catálogo 950-2950-00P, LabSystems, Needham, MA), selaram-se as microplacas e incubaram-se à temperatura ambiente durante a noite. Após aspiração do conteúdo de cada poço, lavaram-se as placas e depois bloquearam-se com 300 µl de PBS contendo BSA a 1%, sacarose a 5%, Tween 20 a 0,05% e sulfato de gentamicina a 0,1%, durante a noite à temperatura ambiente. No dia seguinte esvaziaram-se os poços e deixaram-se secar durante a noite antes da armazenagem, selados com exsicante, a 4°C, até à utilização.

Adicionou-se então péptido de coelho a cada poço (100 µl de solução a 1 µg/ml em PBS (GIBCO BRL) suplementada com 10% (p/v) de albumina sérica bovina (BSA)) e incubou-se durante 1 hora com agitação a 150 rpm à temperatura ambiente (22°C). Lavaram-se as placas três vezes com tampão de lavagem (PBS suplementado com Tween-20 a 0,05%) para remover péptido não ligado. Diluíram-se as amostras de plasma de coelho (inicialmente 1:40, e depois em série por metade) em PBS suplementado com BSA a 5% e gelatina a 1% e incubaram-se 100 µl de cada diluição durante 90 minutos à temperatura ambiente com agitação a 150 rpm. Lavaram-se então as placas três vezes com tampão de lavagem. Diluiu-se IgG anti-coelho de cabra marcada com peroxidase de rábano silvestre (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) de 1:5000 em tampão de lavagem e adicionaram-se 100 ul a cada poço, os quais se incubaram depois durante 90 minutos à temperatura ambiente com agitação a 150 rpm. Lavaram-se as placas três vezes com tampão de lavagem e depois incubaram-se com substrato de peroxidase TMB (substrato de peroxidase TMB, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Maryland), e incubaram-se as placas 30 minutes à temperatura ambiente. A alteração da densidade óptica foi monitorada espectrofotometricamente a 450 nm utilizando um leitor de ELISA (*e.g.*, E-max, Molecular Device Corp., Menlo Park, California). Neste ensaio, a D.O. foi directamente proporcional à quantidade de anticorpos anti-CETP de coelho presentes nas amostras de plasma.

Os resultados indicam que três semanas após o reforço final (e antes da administração da dieta suplementada com colesterol aos Grupos I e IV) seis dos doze animais vacinados (três de cada um dos Grupos I e II) produziram anticorpos que reagiam com o péptido derivado da sequência de CETP de coelho endógena (Vejam-se as Figuras 10 A e 10B).

Os resultados mostraram que o péptido de vacina foi capaz de eliciar anticorpos autorreactivos contra a CETP endógena de coelho. Isto indica que a combinação do epítopo de célula T do toxóide do tétano e o epítopo de célula B da região carboxilo-terminal de CETP é capaz de quebrar a tolerância a uma auto-proteína específica, *i.e.*, neste caso, CETP endógena de coelho.

EXEMPLO 9. Níveis de Colesterol e HDL em Amostras de Plasma de Coelhos Vacinados no Modelo Aterosclerótico

As amostras de plasma colhidas de coelhos dos Grupos do Exemplo 6 em vários tempos (dias) no protocolo de vacinação foram também ensaiadas quanto à concentração de colesterol total (Figura 11) e HDL-C (Figura 12). Os níveis de colesterol total e HDL-C no plasma foram determinados utilizando ensaios *standard* comerciais (Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, Virginia).

As amostras de plasma dos Grupos I (vacinados) e IV (não vacinados) apresentaram um aumento (hipercolesterolemia) no colesterol total devido à administração da dieta suplementada com colesterol (Figura 11). Os Grupos II (vacinados) e III (não vacinados) não exibiram hipercolesterolemia induzida pela dieta (Figura 11).

Similarmente, os Grupos I e IV alimentados com dieta suplementada com colesterol apresentaram um aumento da HDL-C (Figura 12). Uma análise preliminar dos resultados para o Grupo II, indicaram que os três animais com os maiores títulos de anticorpo anti-CETP também apresentaram um aumento dos seus níveis de HDL-C em comparação com os níveis pré-vacinação. A análise preliminar também indicou que em três dos cinco animais no Grupo III, não foi observada alteração significativa nos níveis de HDL-C em comparação com os níveis pré-vacinação.

EXEMPLO 10. Medição de Lesões Ateroscleróticas Aórticas em Coelhos num Modelo de Aterosclerose Alimentado com Colesterol

Removeram-se as aortas de todos os coelhos sobreviventes (quatro nos Grupos I e IV, cinco no Grupo II, seis no Grupo III) após 17 semanas (Dia 196 a partir da vacinação principal) em dieta suplementada com colesterol nos Grupos I e IV e em dieta de controlo (sem suplemento de colesterol) nos Grupos II e III. Mostrou-se na autópsia que a morte dos coelhos não sobreviventes foi devida a bolas de pelo e não, portanto, ao desenho experimental. Cada aorta foi aberta para obter uma vista para examinar lesões ateroscleróticas. A

totalidade do comprimento da aorta, *i.e.*, desde o arco aórtico no coração até à bifurcação no abdómen inferior, foi corada com Oil Red O para detectar lesões. As lesões foram medidas e os resultados foram quantificados utilizando um programa de computador (The Morphometer, Woods Hole Educational Associated, Woods Hole, MA).

Os resultados na Figura 13 desta análise demonstraram uma redução estatisticamente significativa da dimensão de lesões em animais do Grupo I (vacinados, dieta suplementada com colesterol) em comparação com a dimensão de lesões em animais do Grupo IV (não vacinados, dieta suplementada com colesterol). Os resultados mostraram que a vacina de péptido foi capaz de reduzir a área de lesões ateroscleróticas em animais alimentados com dietas suplementadas com colesterol (hipercolesterolémicos) em mais de 50%. Os animais não vacinados (Grupo IV) tinham lesões que cobriam uma média de 45% da área total da aorta, enquanto os animais vacinados (Grupo I) tinham lesões que cobriam uma média de 19% da área total da aorta.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: Rittershaus, Charles, W.
Thomas, Lawrence J.

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: MODULAÇÃO DA ACTIVIDADE DE PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA DE ÉSTER COLESTERÍLICO (CETP)

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 9

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:
(A) ENDEREÇO: Banner & Allegretti, Ltd.
(B) RUA: 75 State Street
(C) CIDADE: Boston
(D) ESTADO: Massachusetts
(E) PAÍS: EUA
(F) CÓDIGO POSTAL: 02109

(v) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR:
(A) TIPO DE MEIO: disquete
(B) COMPUTADOR: IBM PC compatível
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) *SOFTWARE*: WordPerfect 6.1

(vi) DADOS DO PRESENTE PEDIDO:
(A) NÚMERO DO PEDIDO: (ainda não atribuído)
(B) DATA DE APRESENTAÇÃO: 1 de Maio, 1996
(C) CLASSIFICAÇÃO:

(vii) DADOS DO PEDIDO ANTERIOR:
(A) PEDIDO: 08/432,483
(B) DATA DE APRESENTAÇÃO: 1 de Maio, 1995

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE REPRESENTANTE/AGENTE:
(A) NOME: Leon R. Yankwich
(B) NÚMERO DE REGISTO: 30,237
(C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/PROCESSO: 95,179-B(TCS-204-PCT)

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 26 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTI-SENTIDO:

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME: 26 aminoácidos carboxilo-terminais de CETP humana
(B) LOCALIZAÇÃO:

(x) INFORMAÇÃO SOBRE PUBLICAÇÃO:
(A) AUTORES: Drayna, Dennis, *et al.*
(B) TÍTULO: Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer cDNA
(C) REVISTA: Nature
(D) VOLUME: 327
(E) EDIÇÃO:
(F) PÁGINAS: 632-634
(G) DATA: 18-JUN-1987
(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO:1: DE 1 A 26

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 1:

Arg	Asp	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Gln	Met	Asp	Phe
1				5					10	

Gly	Phe	Pro	Glu	His	Leu	Leu	Val	Asp	Phe	Leu
			15					20		

Gln	Ser	Leu	Ser
		25	

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 31 aminoácidos
(B)TIPO: aminoácido
(D)TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTI-SENTIDO:

(ix)CARACTERÍSTICA:
(A) NOME:
(B) LOCALIZAÇÃO:

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 2:

Cys	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Phe	Ile
1				5					10	

Gly	Ile	Thr	Glu	Phe	Gly	Phe	Pro	Glu	His	Leu
			15					20		

Leu	Val	Asp	Phe	Leu	Gln	Ser	Leu	Ser
		25					30	

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 3 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 21 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTI-SENTIDO:

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME: Epítopo de célula T auxiliar universal do toxóide do tétano de 21 aminoácidos.
(B) LOCALIZAÇÃO:

(x) INFORMAÇÃO SOBRE PUBLICAÇÃO:
(A) AUTORES: Panina-Bordignon, P., *et al.*
(B) TÍTULO: Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells
(C) REVISTA: European Journal of Immunology
(D) VOLUME: 19
(E) EDIÇÃO:
(F) PÁGINAS: 2237-2242
(G) DATA: 1989
(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO:3: DE 1 A 21

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 3:

Phe	**Asn**	**Asn**	**Phe**	**Thr**	**Val**	**Ser**	**Phe**	**Trp**	**Leu**	**Arg**
1				**5**					**10**	

Val	**Pro**	**Lys**	**Val**	**Ser**	**Ala**	**Ser**	**His**	**Leu**	**Glu**
			15					**20**	

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 476 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTI-SENTIDO:

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME: Sequência de aminoácidos de CETP humana madura
(B) LOCALIZAÇÃO:

(x) INFORMAÇÃO SOBRE PUBLICAÇÃO:
(A) AUTORES: Drayna, Dennis, *et al.*
(B) TÍTULO: Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer cDNA
(C) REVISTA: Nature
(D) VOLUME: 327

(E) EDIÇÃO:
(F) PÁGINAS: 632-634
(G) DATA: 18-JUN-1987
(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO:1: DE 1 A 476

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 4:

```
Cys Ser Lys Gly Thr Ser His Glu Ala Gly Ile Val Cys
1               5                  10

Arg Ile Thr Lys Pro Ala Leu Leu Val Leu Asn His Glu
    15                  20                  25

Thr Ala Lys Val Ile Gln Thr Ala Phe Gln Arg Ala Ser
            30                  35

Tyr Pro Asp Ile Thr Gly Glu Lys Ala Met Met Leu Leu
40                  45              50

Gly Gln Val Lys Tyr Gly Leu His Asn Ile Gln Ile Ser
        55                  60                  65

His Leu Ser Ile Ala Ser Ser Gln Val Glu Leu Val Glu
                70                  75

Ala Lys Ser Ile Asp Val Ser Ile Gln Asn Val Ser Val
    80                  85                  90

Val Phe Lys Gly Thr Leu Lys Tyr Gly Tyr Thr Thr Ala
            95                  100

Trp Trp Leu Gly Ile Asp Gln Ser Ile Asp Phe Glu Ile
105                 110                 115

Asp Ser Ala Ile Asp Leu Gln Ile Asn Thr Gln Leu Thr
        120                 125                 130
```

Cys Asp Ser Gly Arg Val Arg Thr Asp Ala Pro Asp Cys
135 140

Tyr Leu Ser Phe His Lys Leu Leu Leu His Leu Gln Gly
145 150 155

Glu Arg Glu Pro Gly Trp Ile Lys Gln Leu Phe Thr Asn
160 165

Phe Ile Ser Phe Thr Leu Lys Leu Val Leu Lys Gly Gln
170 175 180

Ile Cys Lys Glu Ile Asn Val Ile Ser Asn Ile Met Ala
185 190 195

Asp Phe Val Gln Thr Arg Ala Ala Ser Ile Leu Ser Asp
200 205

Gly Asp Ile Gly Val Asp Ile Ser Leu Thr Gly Asp Pro
210 215 220

Val Ile Thr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser His His Lys Gly
225 230

His Phe Ile Tyr Lys Asn Val Ser Glu Asp Leu Pro Leu
235 240 245

Pro Thr Phe Ser Pro Thr Leu Leu Gly Asp Ser Arg Met
250 255 260

Leu Tyr Phe Trp Phe Ser Glu Arg Val Phe His Ser Leu
265 270

Ala Lys Val Ala Phe Gln Asp Gly Arg Leu Met Leu Ser
275 280 285

Leu Met Gly Asp Glu Phe Lys Ala Val Leu Glu Thr Trp
290 295

Gly Phe Asn Thr Asn Gln Glu Ile Phe Gln Glu Val Val
300 305 310

Gly Gly Phe Pro Ser Gln Ala Gln Val Thr Val His Cys
315 320 325

Leu Lys Met Pro Lys Ile Ser Cys Gln Asn Lys Gly Val
330 335

Val Val Asn Ser Ser Val Met Val Lys Phe Leu Phe Pro
340 345 350

Arg Pro Asp Gln Gln His Ser Val Ala Tyr Thr Phe Glu
355 360

Glu Asp Ile Val Thr Thr Val Gln Ala Ser Tyr Ser Lys
365 370 375

Lys Lys Leu Phe Leu Ser Leu Leu Asp Phe Gln Ile Thr
380 385 390

Pro Lys Thr Val Ser Asn Leu Thr Glu Ser Ser Ser Glu
395 400

Ser Ile Gln Ser Phe Leu Gln Ser Met Ile Thr Ala Val
405 410 415

Gly Ile Pro Glu Val Met Ser Arg Leu Glu Val Val Phe
420 425

Thr Ala Leu Met Asn Ser Lys Gly Val Ser Leu Phe Asp
430 435 440

Ile Ile Asn Pro Glu Ile Ile Thr Arg Asp Gly Phe Leu
445 450 455

Leu Leu Gln Met Asp Phe Gly Phe Pro Glu His Leu Leu
460 465

Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
470 475

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 1428 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTI-SENTIDO:

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME: Sequência de codificação para CETP humana madura
(B) LOCALIZAÇÃO:

(x) INFORMAÇÃO SOBRE PUBLICAÇÃO:
(A) AUTORES: Drayna, Dennis, *et al.*
(B) TÍTULO: Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer cDNA
(C) REVISTA: Nature
(D) VOLUME: 327
(E) EDIÇÃO:
(F) PÁGINAS: 632-634
(G) DATA: 18-JUN-1987
(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO:5: DE 1 A 1428

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

TGCTCCAAAG GCACCTCGCA CGAGGCAGGC ATCGTGTGCC 40

GCATCACCAA GCCTGCCCTC CTGGTGTTGA ACCACGAGAC 80

TGCCAAGGTG ATCCAGACCG CCTTCCAGCG AGCCAGCTAC 120

CCAGATATCA CGGGCGAGAA GGCCATGATG CTCCTTGGCC 160

AAGTCAAGTA TGGGTTGCAC AACATCCAGA TCAGCCACTT 200

GTCCATCGCC AGCAGCCAGG TGGAGCTGGT GGAAGCCAAG 240

TCCATTGATG TCTCCATTCA GAACGTGTCT GTGGTCTTCA 280

AGGGGACCCT GAAGTATGGC TACACCACTG CCTGGTGGCT 320

GGGTATTGAT CAGTCCATTG ACTTCGAGAT CGACTCTGCC 360

ATTGACCTCC AGATCAACAC ACAGCTGACC TGTGACTCTG 400

GTAGAGTGCG GACCGATGCC CCTGACTGCT ACCTGTCTTT 440

CCATAAGCTG CTCCTGCATC TCCAAGGGGA GCGAGAGCCT 480

GGGTGGATCA AGCAGCTGTT CACAAATTTC ATCTCCTTCA 520

CCCTGAAGCT GGTCCTGAAG GGACAGATCT GCAAAGAGAT 560

CAACGTCATC TCTAACATCA TGGCCGATTT TGTCCAGACA 600

AGGGCTGCCA GCATCCTTTC AGATGGAGAC ATTGGGGTGG 640

ACATTTCCCT GACAGGTGAT CCCGTCATCA CAGCCTCCTA 680

CCTGGAGTCC CATCACAAGG GTCATTTCAT CTACAAGAAT 720

GTCTCAGAGG ACCTCCCCCT CCCCACCTTC TCGCCCACAC 760

TGCTGGGGGA CTCCCGCATG CTGTACTTCT GGTTCTCTGA 800

GCGAGTCTTC CACTCGCTGG CCAAGGTAGC TTTCCAGGAT 840

GGCCGCCTCA TGCTCAGCCT GATGGGAGAC GAGTTCAAGG 880

CAGTGCTGGA GACCTGGGGC TTCAACACCA ACCAGGAAAT 920

CTTCCAAGAG GTTGTCGGCG GCTTCCCCAG CCAGGCCCAA 960

GTCACCGTCC ACTGCCTCAA GATGCCCAAG ATCTCCTGCC 1000

AAAACAAGGG AGTCGTGGTC AATTCTTCAG TGATGGTGAA 1040

ATTCCTCTTT CCACGCCCAG ACCAGCAACA TTCTGTAGCT 1080

TACACATTTG AAGAGGATAT CGTGACTACC GTCCAGGCCT 1120

CCTATTCTAA GAAAAAGCTC TTCTTAAGCC TCTTGGATTT 1160

CCAGATTACA CCAAAGACTG TTTCCAACTT GACTGAGAGC 1200

AGCTCCGAGT CCATCCAGAG CTTCCTGCAG TCAATGATCA 1240

CCGCTGTGGG CATCCCTGAG GTCATGTCTC GGCTCGAGGT 1280

AGTGTTTACA GCCCTCATGA ACAGCAAAGG CGTGAGCCTC 1320

TTCGACATCA TCAACCCTGA GATTATCACT CGAGATGGCT 1360

TCCTGCTGCT GCAGATGGAC TTTGGCTTCC CTGAGCACCT 1400

GCTGGTGGAT TTCCTCCAGA GCTTGAGC 1428

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 496 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTI-SENTIDO:

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME: Sequência de aminoácidos para proteína CETP de coelho madura.
(B) LOCALIZAÇÃO:

(x) INFORMAÇÃO SOBRE PUBLICAÇÃO:
(A) AUTORES: Nagashima, Mariko, *et al.*
(B) TÍTULO: Cloning and mRNA tissue distribution of rabbit cholesteryl ester transfer protein
(C) REVISTA: J. Lipid Res.
(D) VOLUME: 29
(E) EDIÇÃO:
(F) PÁGINAS: 1643-1649
(G) DATA: 1988
(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO:6: DE 1 A 496

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:

Cys Pro Lys Gly Ala Ser Tyr Glu Ala Gly Ile Val Cys
1 5 10

Arg Ile Thr Lys Pro Ala Leu Leu Val Leu Asn Gln Glu
15 20 25

Thr Ala Lys Val Val Gln Thr Ala Phe Gln Arg Ala Gly
30 35

Tyr Pro Asp Val Ser Gly Glu Arg Ala Val Met Leu Leu
40 45 50

Gly Arg Val Lys Tyr Gly Leu His Asn Leu Gln Ile Ser
55 60 65

His Leu Ser Ile Ala Ser Ser Gln Val Glu Leu Val Asp
70 75

Ala Lys Thr Ile Asp Val Ala Ile Gln Asn Val Ser Val
80 85 90

Val Phe Lys Gly Thr Leu Asn Tyr Ser Tyr Thr Ser Ala
95 100

Trp Gly Leu Gly Ile Asn Gln Ser Val Asp Phe Glu Ile
105 110 115

Asp Ser Ala Ile Asp Leu Gln Ile Asn Thr Glu Leu Thr
120 125 130

Cys Asp Ala Gly Ser Val Arg Thr Asn Ala Pro Asp Cys
135 140

Tyr Leu Ala Phe His Lys Leu Leu Leu His Leu Gln Gly
145 150 155

Glu Arg Glu Pro Gly Trp Leu Lys Gln Leu Phe Thr Asn
160 165

Phe Ile Ser Phe Thr Leu Lys Leu Ile Leu Lys Arg Gln
170 175 180

Val Cys Asn Glu Ile Asn Thr Ile Ser Asn Ile Met Ala
185 190 195

Asp Phe Val Gln Thr Arg Ala Ala Ser Ile Leu Ser Asp
200 205

Gly Asp Ile Gly Val Asp Ile Ser Val Thr Gly Ala Pro
210 215 220

Val Ile Thr Ala Thr Tyr Leu Glu Ser His His Lys Gly
225 230

His Phe Thr His Lys Asn Val Ser Glu Ala Phe Pro Leu
235 240 245

Arg Ala Phe Pro Pro Gly Leu Leu Gly Asp Ser Arg Met
250 255 260

Leu Tyr Phe Trp Phe Ser Asp Gln Val Leu Asn Ser Leu
265 270

Ala Arg Ala Ala Phe Gln Glu Gly Arg Leu Val Leu Ser
275 280 285

Leu Thr Gly Asp Glu Phe Lys Lys Val Leu Glu Thr Gln
290 295

Gly Phe Asp Thr Asn Gln Glu Ile Phe Gln Glu Leu Ser
300 305 310

Arg Gly Leu Pro Thr Gly Gln Ala Gln Val Ala Val His
315 320 325

Cys Leu Lys Val Pro Lys Ile Ser Cys Gln Asn Arg Gly
330 335

Val Val Val Ser Ser Ser Val Ala Val Thr Phe Arg Phe
340 345 350

Pro Arg Pro Asp Gly Arg Glu Ala Val Ala Tyr Arg Phe
355 360

Glu Glu Asp Ile Ile Thr Thr Val Gln Ala Ser Tyr Ser
365 370 375

Gln Lys Lys Leu Phe Leu His Leu Leu Asp Phe Gln Cys
380 385 390

Val Pro Ala Ser Gly Arg Ala Gly Ser Ser Ala Asn Leu
395 400

Ser Val Ala Leu Arg Thr Glu Ala Lys Ala Val Ser Asn
405 410 415

Leu Thr Glu Ser Arg Ser Glu Ser Leu Gln Ser Ser Leu
420 425

Arg Ser Leu Ile Ala Thr Val Gly Ile Pro Glu Val Met
430 435 440

Ser Arg Leu Glu Val Ala Phe Thr Ala Leu Met Asn Ser
445 450 455

Lys Gly Leu Asp Leu Phe Glu Ile Ile Asn Pro Glu Ile
460 465

Ile Thr Leu Asp Gly Cys Leu Leu Leu Gln Met Asp Phe
470 475 480

Gly Phe Pro Lys His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser
485 490

Leu Ser
495

2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 1488 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTI-SENTIDO:

(ix) CARACTERÍSTICA: Sequência de codificação para CETP de coelho madura
(A) NOME:
(B) LOCALIZAÇÃO:

(x) INFORMAÇÃO SOBRE PUBLICAÇÃO:
(A) AUTORES: Nagashima, Mariko, *et al.*
(B) TÍTULO: Cloning e mRNA tissue distribution of rabbit cholesteryl ester transfer protein
(C) REVISTA: J. Lipid Res.
(D) VOLUME: 29
(E) EDIÇÃO:
(F) PÁGINAS: 1643-1649
(G) DATA: 1988
(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO:7: DE 1 A 1488

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 7:

TGTCCCAAAG GCGCCTCCTA CGAGGCTGGC ATCGTGTGTC 40

GCATCACCAA GCCCGCCCTC TTGGTGTTGA ACCAAGAGAC 80

GGCCAAGGTG GTCCAGACGG CCTTCCAGCG CGCCGGCTAT 120

CCGGACGTCA GCGGCGAGAG GGCCGTGATG CTCCTCGGCC 160

GGGTCAAGTA CGGGCTGCAC AACCTCCAGA TCAGCCACCT 200

GTCCATCGCC AGCAGCCAGG TGGAGCTGGT GGACGCCAAG 240

ACCATCGACG TCGCCATCCA GAACGTGTCC GTGGTCTTCA 280

AGGGGACCCT GAACTACAGC TACACGAGTG CCTGGGGGTT 320

GGGCATCAAT CAGTCTGTCG ACTTCGAGAT CGACTCTGCC 360

ATTGACCTCC AGATCAACAC AGAGCTGACC TGCGACGCTG 400

GCAGTGTGCG CACCAATGCC CCCGACTGCT ACCTGGCTTT 440

CCATAAACTG CTCCTGCACC TCCAGGGGGA GCGCGAGCCG 480

GGGTGGCTCA AGCAGCTCTT CACAAACTTC ATCTCCTTCA 520

CCCTGAAGCT GATTCTGAAG CGACAGGTCT GCAATGAGAT 560

CAACACCATC TCCAACATCA TGGCTGACTT TGTCCAGACG 600

AGGGCCGCCA GCATCCTCTC AGATGGAGAC ATCGGGGTGG 640

ACATTTCCGT GACGGGGGCC CCTGTCATCA CAGCCACCTA 680

CCTGGAGTCC CATCACAAGG GTCACTTCAC GCACAAGAAC 720

GTCTCCGAGG CCTTCCCCCT CCGCGCCTTC CCGCCCGGTC 760

TTCTGGGGGA CTCCCGCATG CTCTACTTCT GGTTCTCCGA 800

TCAAGTGCTC AACTCCCTGG CCAGGGCCGC CTTCCAGGAG 840

GGCCGTCTCG TGCTCAGCCT GACAGGGGAT GAGTTCAAGA 880

AAGTGCTGGA GACCCAGGGT TTCGACACCA ACCAGGAAAT 920

CTTCCAGGAG CTTTCCAGAG GCCTTCCCAC CGGCCAGGCC 960

CAGGTAGCCG TCCACTGCCT TAAGGTGCCC AAGATCTCCT 1000

GCCAGAACCG GGGTGTCGTG GTGTCTTCTT CCGTCGCCGT 1040

GACGTTCCGC TTCCCCCGCC CAGATGGCCG AGAAGCTGTG 1080

GCCTACAGGT TTGAGGAGGA TATCATCACC ACCGTCCAGG 1120

CCTCCTACTC CCAGAAAAAG CTCTTCCTAC ACCTCTTGGA 1160

TTTCCAGTGC GTGCCGGCCA GCGGAAGGGC AGGCAGCTCA 1200

GCAAATCTCT CCGTGGCCCT CAGGACTGAG GCTAAGGCTG 1240

TTTCCAACCT GACTGAGAGC CGCTCCGAGT CCCTGCAGAG 1280

CTCTCTCCGC TCCCTGATCG CCACGGTGGG CATCCCGGAG 1320

GTCATGTCTC GGCTCGAGGT GGCGTTCACA GCCCTCATGA 1360

ACAGCAAAGG CCTGGACCTC TTCGAAATCA TCAACCCCGA 1400

GATTATCACT CTCGATGGCT GCCTGCTGCT GCAGATGGAC 1440

TTCGGTTTTC CCAAGCACCT GCTGGTGGAT TTCCTGCAGA 1480

GCCTGAGC 1488

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A)COMPRIMENTO: 50 aminoácidos
(B)TIPO: aminoácido
(D)TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTI-SENTIDO:

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME:
(B) LOCALIZAÇÃO:

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:8:

Cys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile
1 5 10

Thr Glu Leu Phe Pro Arg Pro Asp Gln Gln His Ser Val
15 20 25

Ala Tyr Thr Phe Glu Glu Asp Ile Phe Gly Phe Pro Glu
30 35

His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
40 45 50

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 50 aminoácidos
(B)TIPO: aminoácido
(D)TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTI-SENTIDO:

(ix)CARACTERÍSTICA:
(A) NOME:
(B) LOCALIZAÇÃO:
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:9:

Met	**Gln**	**Tyr**	**Ile**	**Lys**	**Ala**	**Asn**	**Ser**	**Lys**	**Phe**	**Ile**	**Gly**	**Ile**
1				**5**					**10**			

Thr	**Glu**	**Arg**	**Phe**	**Pro**	**Arg**	**Pro**	**Asp**	**Gly**	**Arg**	**Glu**	**Ala**	**Val**
	15					**20**					**25**	

Ala	**Tyr**	**Arg**	**Phe**	**Glu**	**Glu**	**Asp**	**Ile**	**Phe**	**Gly**	**Phe**	**Pro**	**Lys**
		30						**35**				

His	**Leu**	**Leu**	**Val**	**Asp**	**Phe**	**Leu**	**Gln**	**Ser**	**Leu**	**Ser**
40					**45**					**50**

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Péptido antigénico isolado compreendendo uma porção de epítopo de célula T auxiliar ligada a uma porção de epítopo de célula B, em que a referida porção de epítopo de célula T auxiliar compreende um epítopo de célula T auxiliar de gama larga e a referida porção de epítopo de célula B compreende um epítopo de célula B de proteína de transferência de éster colesterílico (CETP) e em que o referido péptido antigénico elicia num indivíduo mamífero a produção de auto-anticorpos que se ligam à CETP endógena do indivíduo a quem foi administrado o referido péptido, e em que os referidos auto-anticorpos modulam a actividade da CETP endógena do indivíduo a quem foi administrado o referido péptido.

2. Péptido de acordo com a reivindicação 1, em que a CETP é CETP humana.

3. Péptido de acordo com a reivindicação 2, em que a referida porção de epítopo de célula B compreende uma porção de CETP humana que consiste em pelo menos 6 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO:4 e que são reconhecidos por células B ou anticorpos.

4. Péptido de acordo com a reivindicação 2, em que o referido epítopo de célula B de CETP é seleccionado do grupo que consiste na sequência de aminoácidos definida pelos aminoácidos 349 a 367 de SEQ ID NO:4, os aminoácidos 461 a 476 de SEQ ID NO:4; as sequências de aminoácidos identificadas por algoritmos de identificação de epítopos antigénicos, uma região envolvida na ligação de lípidos neutros, ou uma região envolvida na actividade de transferência de lípidos neutros.

5. Péptido de acordo com a reivindicação 3, em que a referida porção de epítopo de célula B é um péptido que consiste em, entre seis e 26 aminoácidos consecutivos dos 26 aminoácidos carboxilo-terminais de CETP humana (SEQ ID NO:1).

6. Péptido de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que a referida porção de epítopo de célula B é um derivado da região de 26 aminoácidos carboxilo-

terminal de CETP possuindo deleções, adições ou substituições de aminoácidos que não alteram nem destroem significativamente a ligação de lípidos neutros ou a actividade de transferência de lípidos neutros da referida CETP.

7. Péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a referida porção de epítopo de célula T auxiliar compreende um epítopo de célula T auxiliar derivado de um péptido antigénico seleccionado entre o grupo que consiste em toxóide do tétano, toxóide da difteria, vacina da tosse convulsa, Bacilo de Calmette-Guerin (BCG), vacina da poliomielite, vacina do sarampo, vacina da papeira, vacina da rubéola, derivado purificado da proteína da tuberculina, hemocianina de lapa *Fissurella*, hsp70, e suas combinações.

8. Péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a referida porção de epítopo de célula T auxiliar compreende as sequências de aminoácidos dos aminoácidos 830 a 843 da proteína da toxina do tétano (aminoácidos 2 a 15 de SEQ ID NO:2), a sequência de aminoácidos dos aminoácidos 947 a 967 da proteína da toxina do tétano (SEQ ID NO:3), e suas combinações.

9. Péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, possuindo um resíduo de cisteína amino-terminal.

10. Péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a referida porção de epítopo de célula B está ligada à referida porção de epítopo de célula T auxiliar.

11. Péptido de acordo com a reivindicação 10, em que a referida porção de epítopo de célula B está ligada covalentemente à referida porção de epítopo de célula T auxiliar.

12. Péptido de acordo com a reivindicação 11, em que a referida porção de epítopo de célula B está ligada covalentemente à referida porção de epítopo de célula T auxiliar por via de uma ligação peptídica ou de uma ligação dissulfureto.

13. Péptido de acordo com a reivindicação 10, em que a referida porção de epítopo de célula B está ligada à referida porção de epítopo de célula T auxiliar por via de uma molécula de ligação cruzada.

14. Péptido de acordo com a reivindicação 10, em que a referida porção de epítopo de célula B está ligada à referida porção de epítopo de célula T auxiliar por via de uma ponte de aminoácidos.

15. Péptido de acordo com a reivindicação 1, compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

16. Péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a referida porção de epítopo de célula B e a referida porção de epítopo de célula T auxiliar estão ligadas a uma molécula transportadora comum.

17. Péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, ligado covalentemente a múltiplas cópias da proteína do complemento C3d.

18. Péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, derivatizado com estruturas de hidratos de carbono que ficam ligadas covalentemente *in vivo* com a proteína do complemento C3d.

19. Péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, que compreende mais do que uma porção de epítopo de célula T auxiliar e/ou mais do que uma porção de epítopo de célula B.

20. Vacina compreendendo uma transportador ou adjuvante farmaceuticamente aceitáveis e um ou mais péptidos seleccionados entre os péptidos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19.

21. Péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, para utilização como medicamento.

22. Péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, ou vacina de acordo com a

reivindicação 20, para utilização na eliciação de anticorpos anti-CETP num ser humano ou animal.

23. Péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, ou vacina de acordo com a reivindicação 20, para utilização na elevação da razão entre HDL em circulação e LDL, VLDL ou colesterol total em circulação, num ser humano ou noutro animal.

24. Péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, ou vacina de acordo com a reivindicação 20, para utilização na diminuição do nível de actividade de CETP endógena num ser humano ou noutro animal.

25. Péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, ou vacina de acordo com a reivindicação 20, para utilização na alteração do catabolismo de HDL-colesterol para diminuir o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas num ser humano ou noutro animal.

26. Péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, ou vacina de acordo com a reivindicação 20, para utilização no tratamento ou prevenção de aterosclerose num ser humano ou noutro animal.

27. Método de preparação de uma vacina anti-CETP para modular a actividade de CETP endógena ou para tratar ou prevenir aterosclerose, compreendendo:

a selecção de uma porção de epítopo de célula B de CETP, em que o referido epítopo de célula B não inclui um epítopo de célula T do complexo de histocompatibilidade principal de classe I;

a selecção de uma porção de epítopo de célula T auxiliar derivada de um péptido antigénico que não é derivado de CETP;

e a ligação da referida porção de epítopo de célula B de CETP e da referida porção de epítopo de célula T auxiliar para formar uma porção antigénica, em que a referida porção antigénica elicia num indivíduo mamífero a produção de auto-anticorpos que se ligam à CETP endógena do indivíduo a quem foi administrada a referida vacina, e em que os referidos

auto-anticorpos modulam a actividade da CETP endógena do indivíduo a quem foi administrado o referido péptido.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, em que a referida de epítopo de célula B de CETP é como definida em qualquer uma das reivindicações 3 a 6 e a referida porção de epítopo de célula T auxiliar é como definida na reivindicação 7 ou na reivindicação 8.

29. Método de acordo com a reivindicação 27 ou a reivindicação 28, em que a referida porção de epítopo de célula B está ligada como definido em qualquer uma das reivindicações 11 a 16 à referida porção de epítopo de célula T auxiliar.

30. Método de acordo com a reivindicação 27 ou a reivindicação 28, em que a referida porção de epítopo de célula B está ligada à referida porção de epítopo de célula T auxiliar para formar um péptido de vacina e compreendendo ainda o passo de ligação do referido péptido de vacina a uma molécula transportadora comum.

31. Utilização de um péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, ou vacina de acordo com a reivindicação 20, para o fabrico de um medicamento para utilização na eliciação de anticorpos anti-CETP endógena num ser humano ou animal.

32. Utilização de um péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, ou vacina de acordo com a reivindicação 20, para o fabrico de um medicamento para utilização no tratamento ou prevenção de aterosclerose.

33. Péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19 ou vacina de acordo com a reivindicação 20 para utilização como medicamento.

34. Péptido ou vacina de acordo com a reivindicação 33 para utilização no tratamento ou prevenção de aterosclerose.

35. Utilização de um péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, ou vacina de acordo com a

reivindicação 20, para o fabrico de um medicamento para elevação da razão entre HDL em circulação e LDL, VLDL ou colesterol total em circulação num ser humano ou animal.

36. Utilização de um péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, ou vacina de acordo com a reivindicação 20, para o fabrico de um medicamento para diminuição do nível de actividade de CETP endógena num ser humano ou noutro animal.

37. Utilização de um péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, ou vacina de acordo com a reivindicação 20, para o fabrico de um medicamento para aumentar o nível de HDL em circulação num ser humano ou animal.

Lisboa,

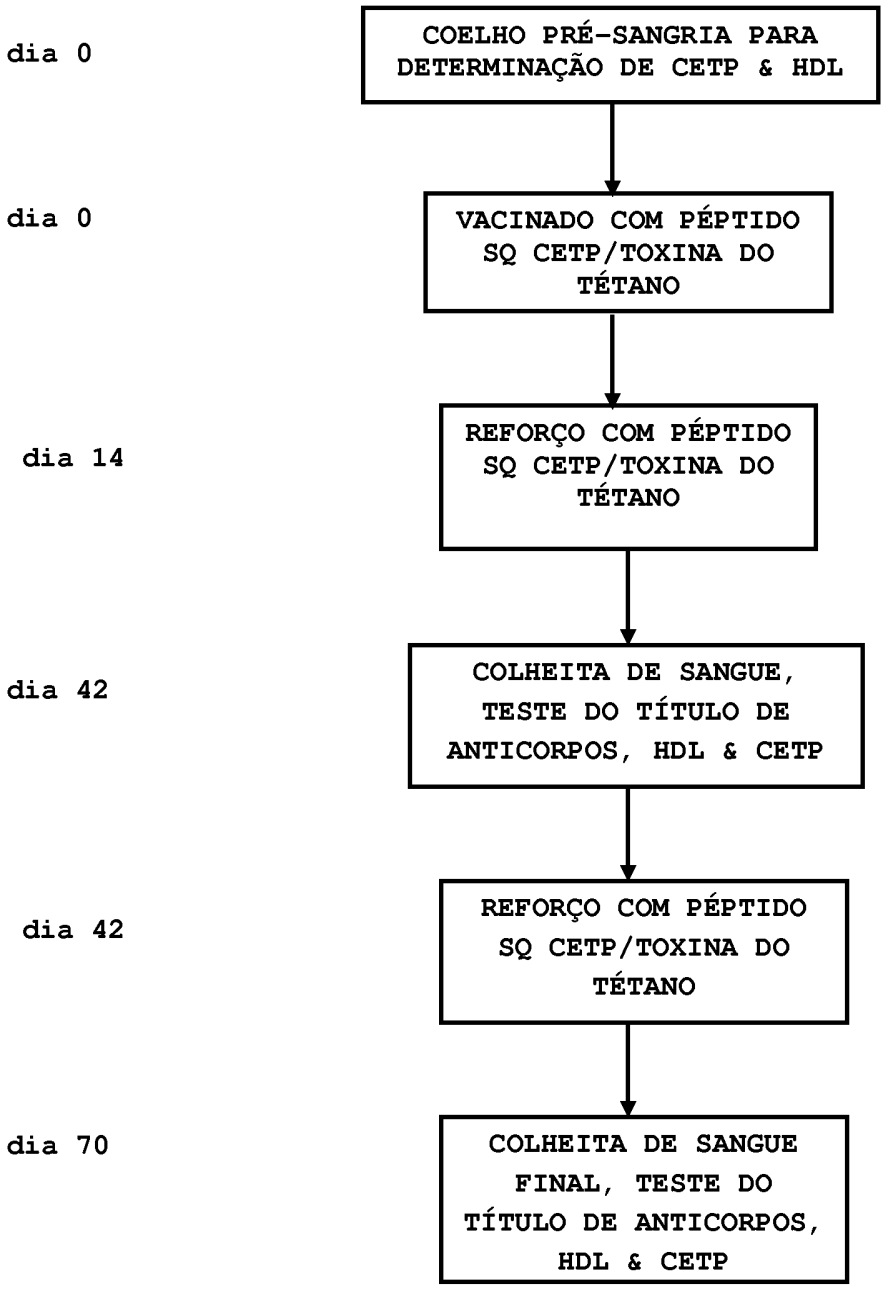
dia 0
COELHO PRÉ-SANGRIA PARA DETERMINAÇÃO DE CETP & HDL
dia 0
VACINADO COM PÉPTIDO SQ CETP/TOXINA DO TÉTANO
dia 14
REFORÇO COM PÉPTIDO SQ CETP/TOXINA DO TÉTANO
dia 42
COLHEITA DE SANGUE, TESTE DO TÍTULO DE ANTICORPOS, HDL & CETP
dia 42
REFORÇO COM PÉPTIDO SQ CETP/TOXINA DO TÉTANO
dia 70
COLHEITA DE SANGUE FINAL, TESTE DO TÍTULO DE ANTICORPOS, HDL & CETP

FIG. 1

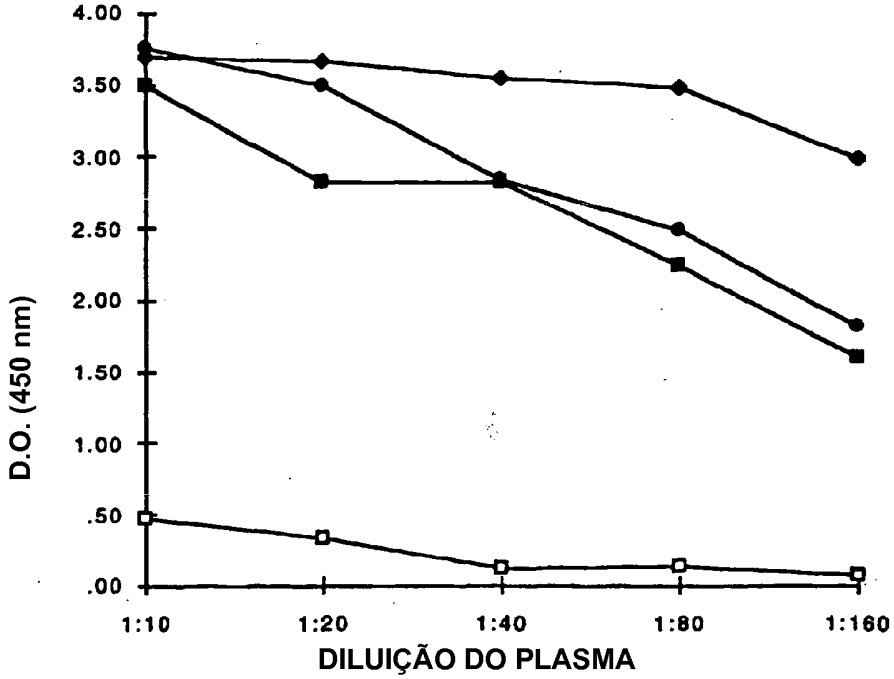
4.00
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
.50
.00
D.O. (450 nm)
1:10
1:20
1:40
1:80
1:160
DILUIÇÃO DO PLASMA

Fig. 2

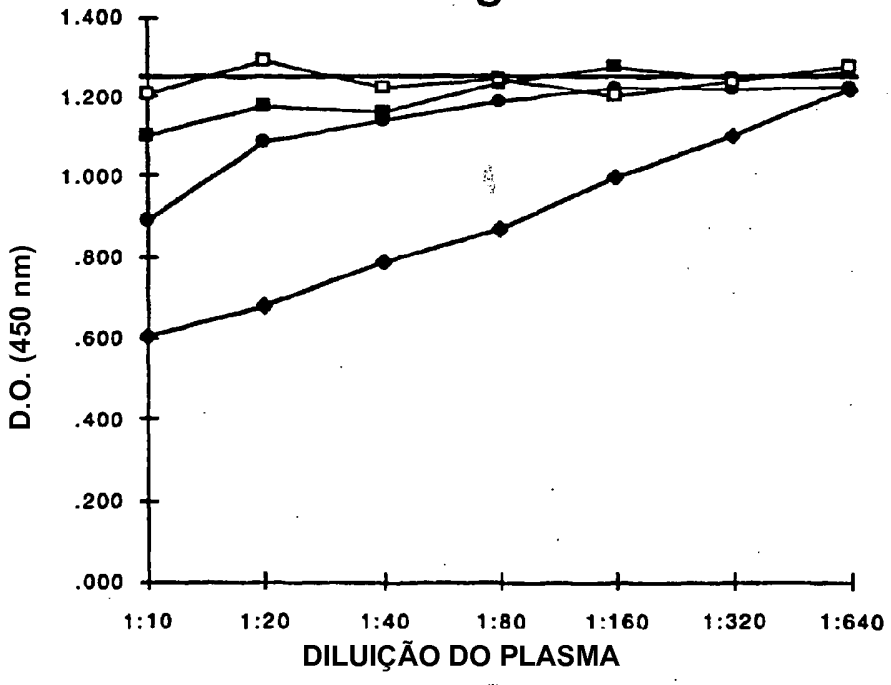
1.400
1.200
1.000
.800
.600
.400
.200
.000
D.O. (450 nm)
1:10
1:20
1:40
1:80
1:160
1:320
1:640
DILUIÇÃO DO PLASMA

Fig. 3

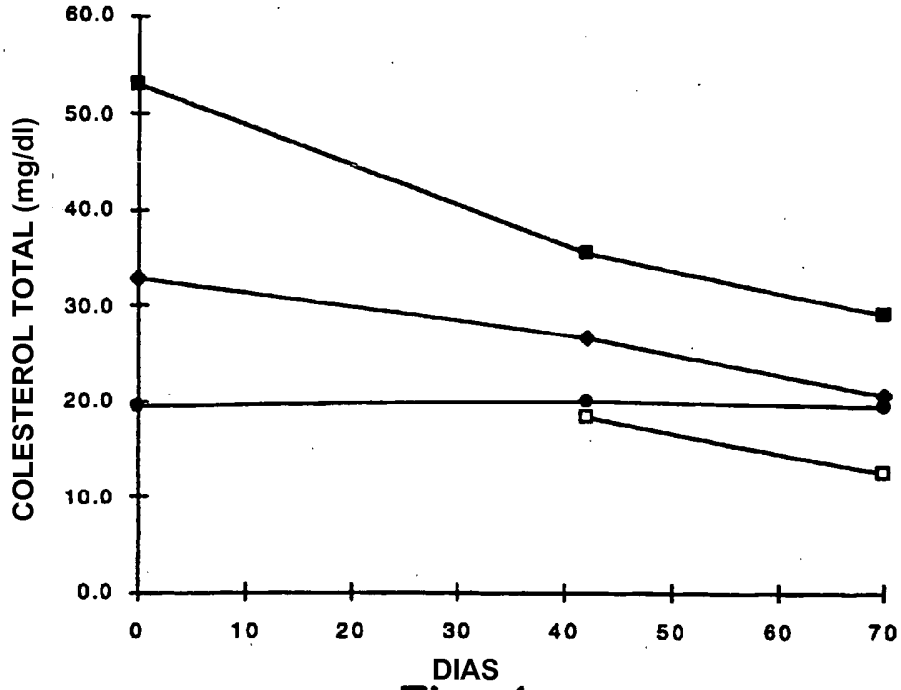
COLESTEROL TOTAL (mg/dl)
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
0
10
20
30
40
50
60
70
DIAS

Fig. 4

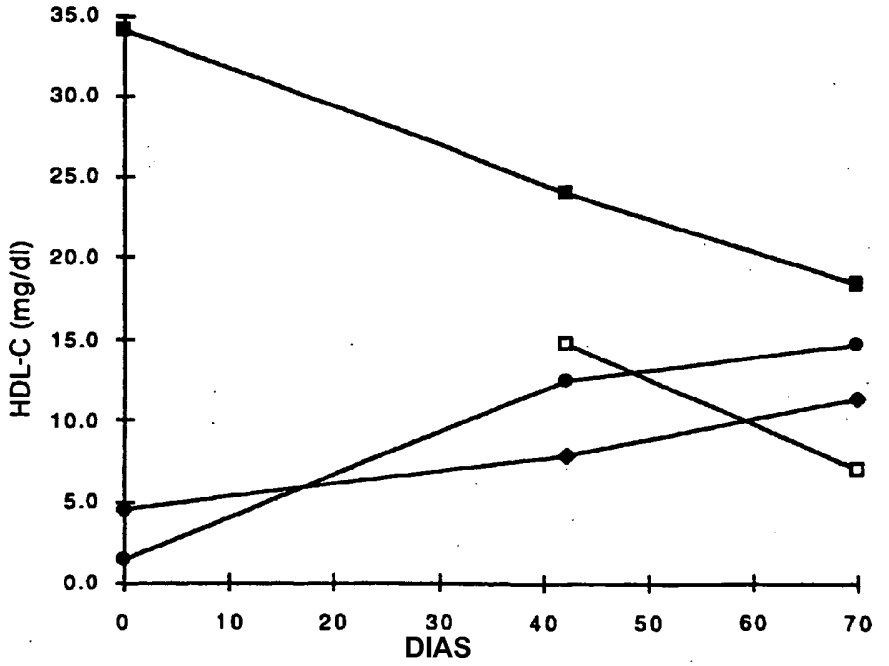
HDL-C (mg/dl)
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
0
10
20
30
40
50
60
70
DIAS

Fig. 5

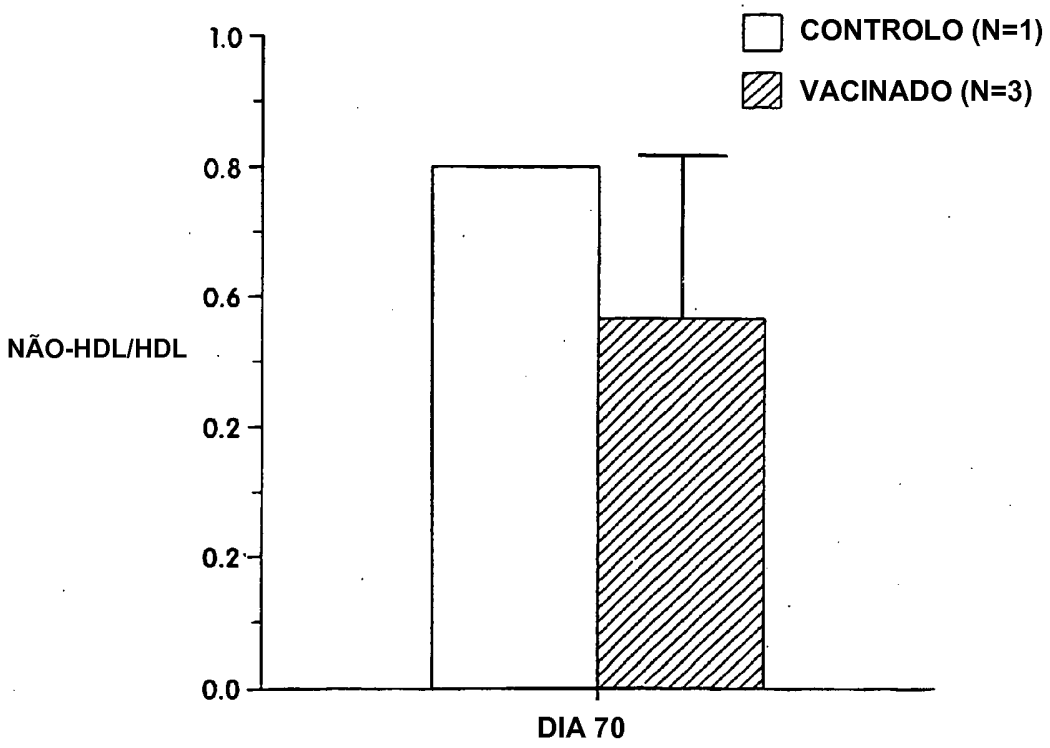

Fig. 6

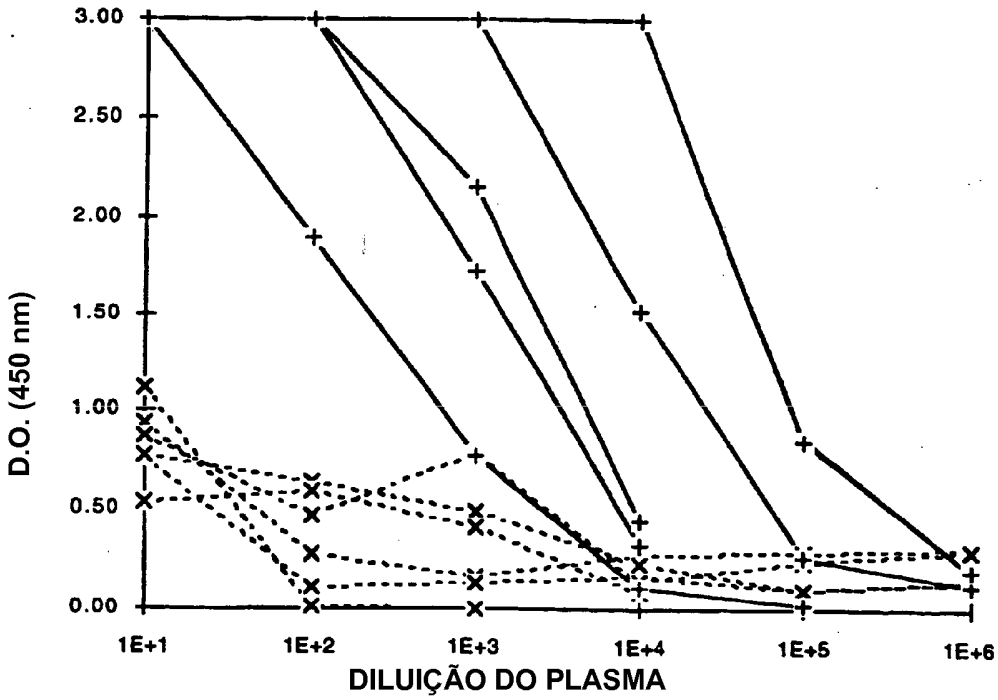
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
D.O. (450 nm)
1E+1
1E+2
1E+3
1E+4
1E+5
1E+6
DILUIÇÃO DO PLASMA

Fig. 7

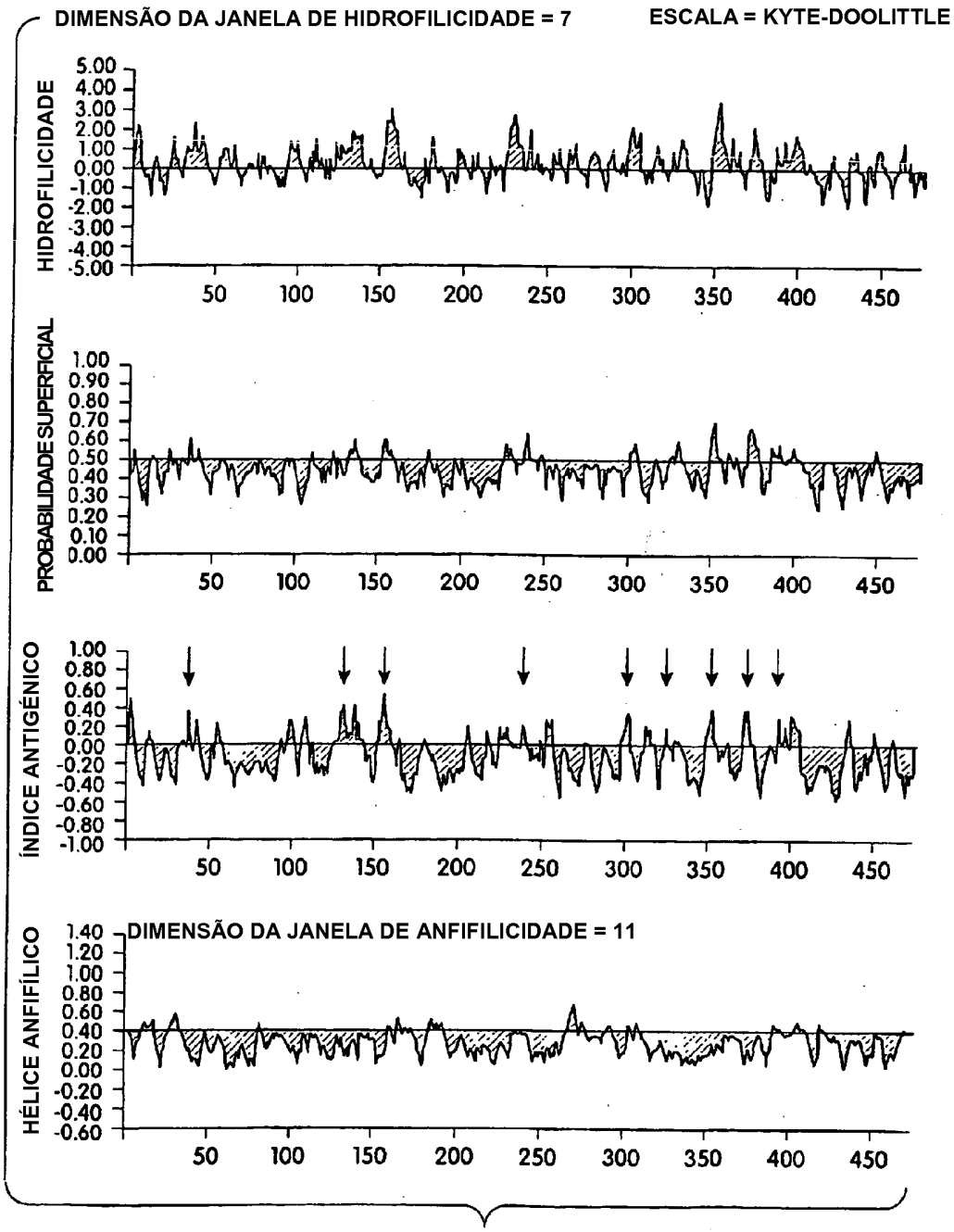
DIMENSÃO DA JANELA DE HIDROFILICIDADE = 7
ESCALA = KYTE-DOOLITTLE
HIDROFILICIDADE
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
-1.00
-2.00
-3.00
-4.00
-5.00
50 100 150 200 250 300 350 400 450
PROBABILIDADE SUPERFICIAL
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
50 100 150 200 250 300 350 400 450
ÍNDICE ANTIGÉNICO
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
-0.20
-0.40
-0.60
-0.80
-1.00
50 100 150 200 250 300 350 400 450
HÉLICE ANFIFÍLICO
DIMENSÃO DA JANELA DE ANFIFILICIDADE = 11
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
-0.20
-0.40
-0.60
50 100 150 200 250 300 350 400 450

Fig. 8A

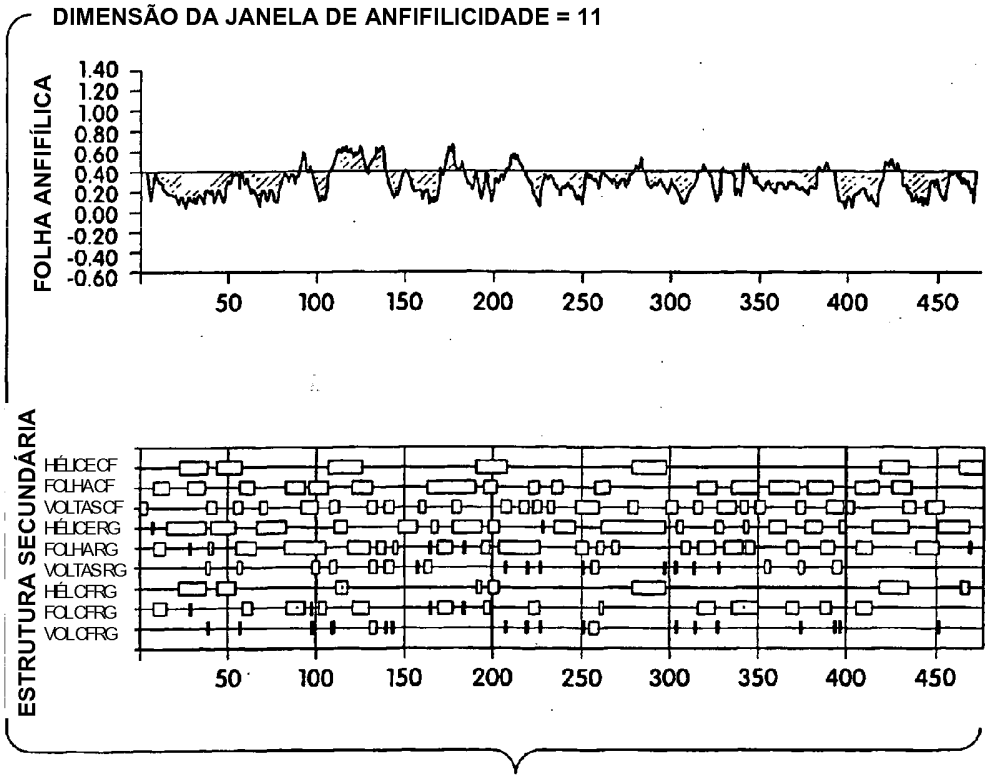
DIMENSÃO DA JANELA DE ANFIFILICIDADE = 11
FOLHA ANFIFÍLICA
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
-0.20
-0.40
-0.60
50
100
150
200
250
300
350
400
450
ESTRUTURA SECUNDÁRIA
HÉLICECF
FOLHACF
VOLTASCF
HÉLICERG
FOLHARG
VOLTASRG
HÉLCFRG
FOLCFRG
VOLCFRG
50
100
150
200
250
300
350
400
450

Fig. 8B

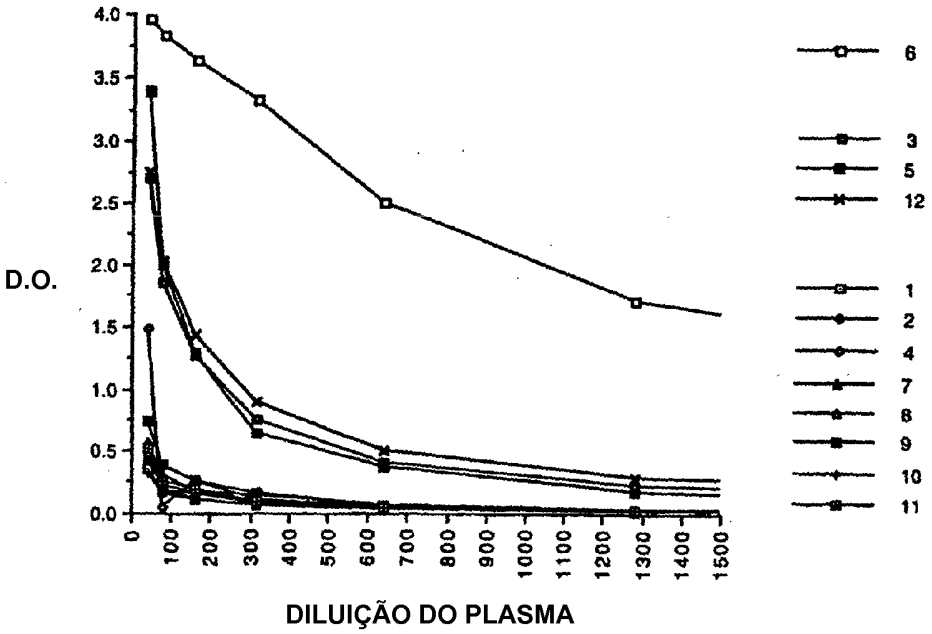
D.O.
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1100
1200
1300
1400
1500
DILUIÇÃO DO PLASMA
6
3
5
12
1
2
4
7
8
9
10
11

Fig. 9

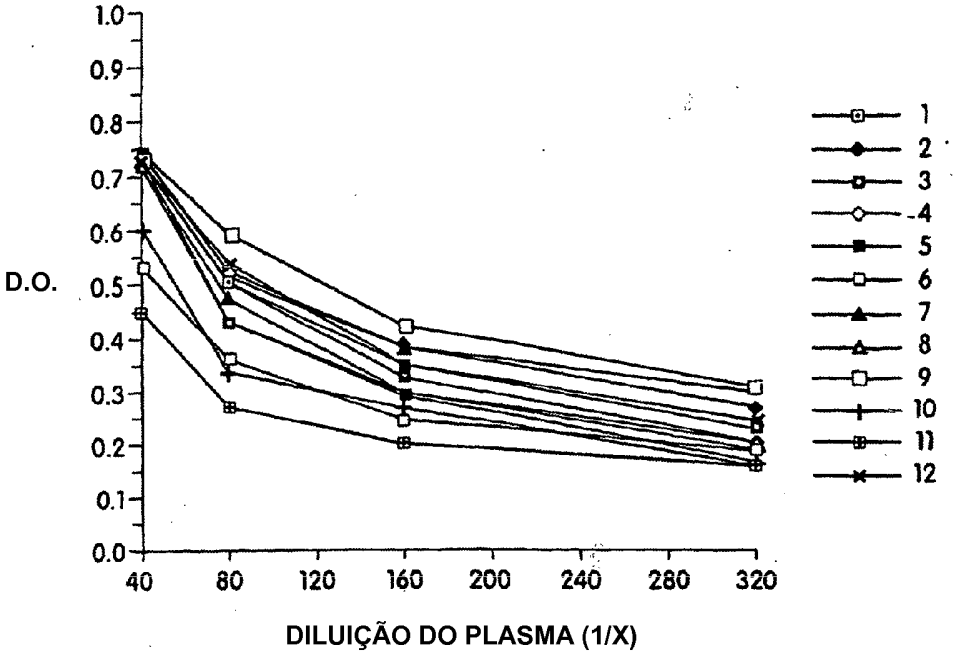

Fig. 10A

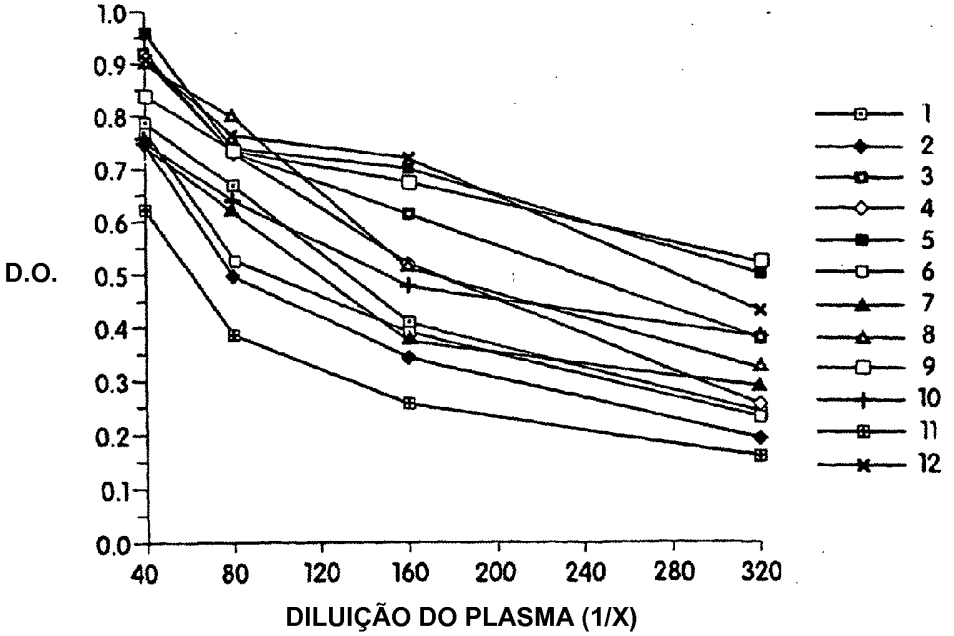

Fig. 10B

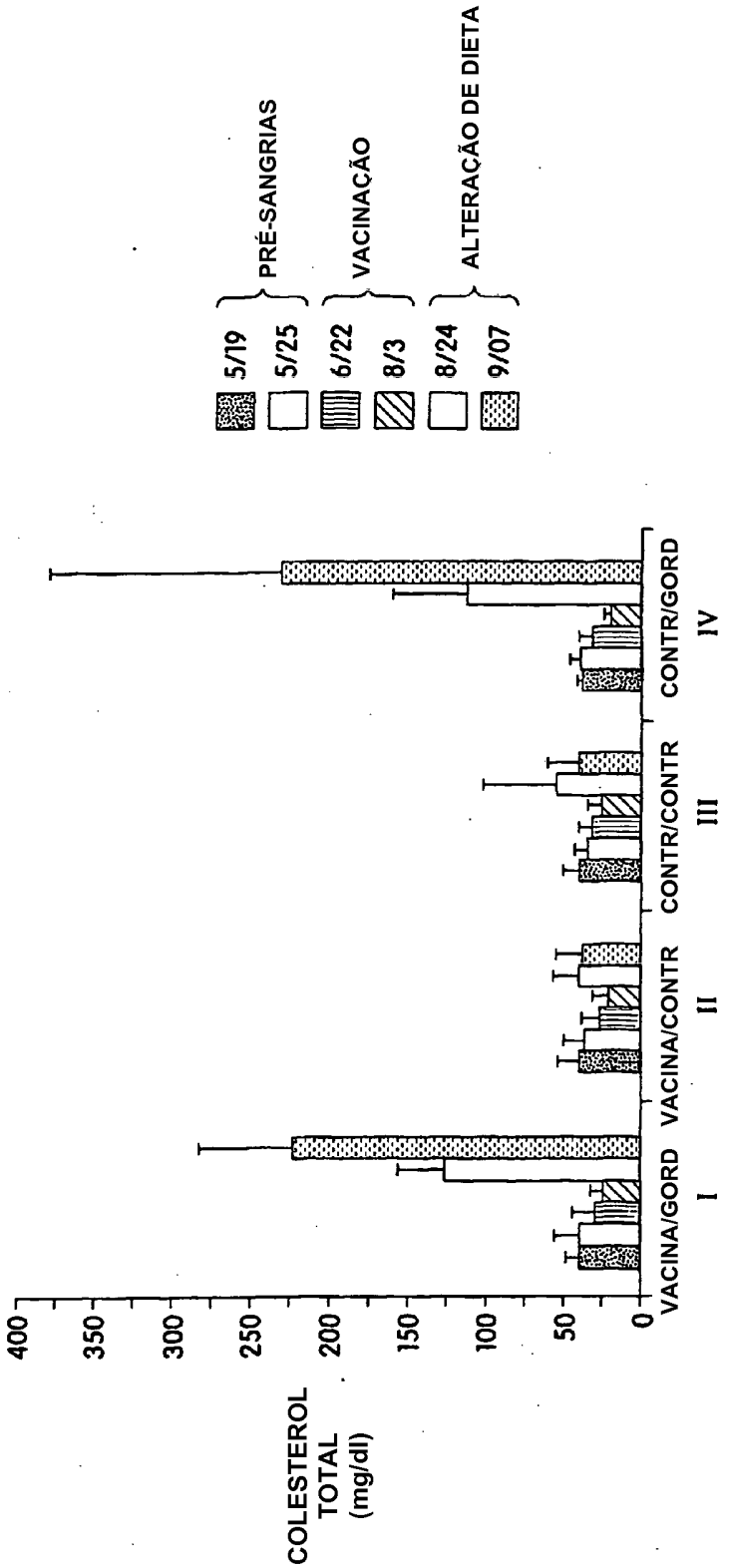
PRÉ-SANGRIAS
VACINAÇÃO
ALTERAÇÃO DE DIETA
5/19
5/25
6/22
8/3
8/24
9/07
COLESTEROL TOTAL (mg/dl)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
VACINA/GORD
VACINA/CONTR
CONTR/CONTR
CONTR/GORD
I
II
III
IV
GRUPO

Fig. 11

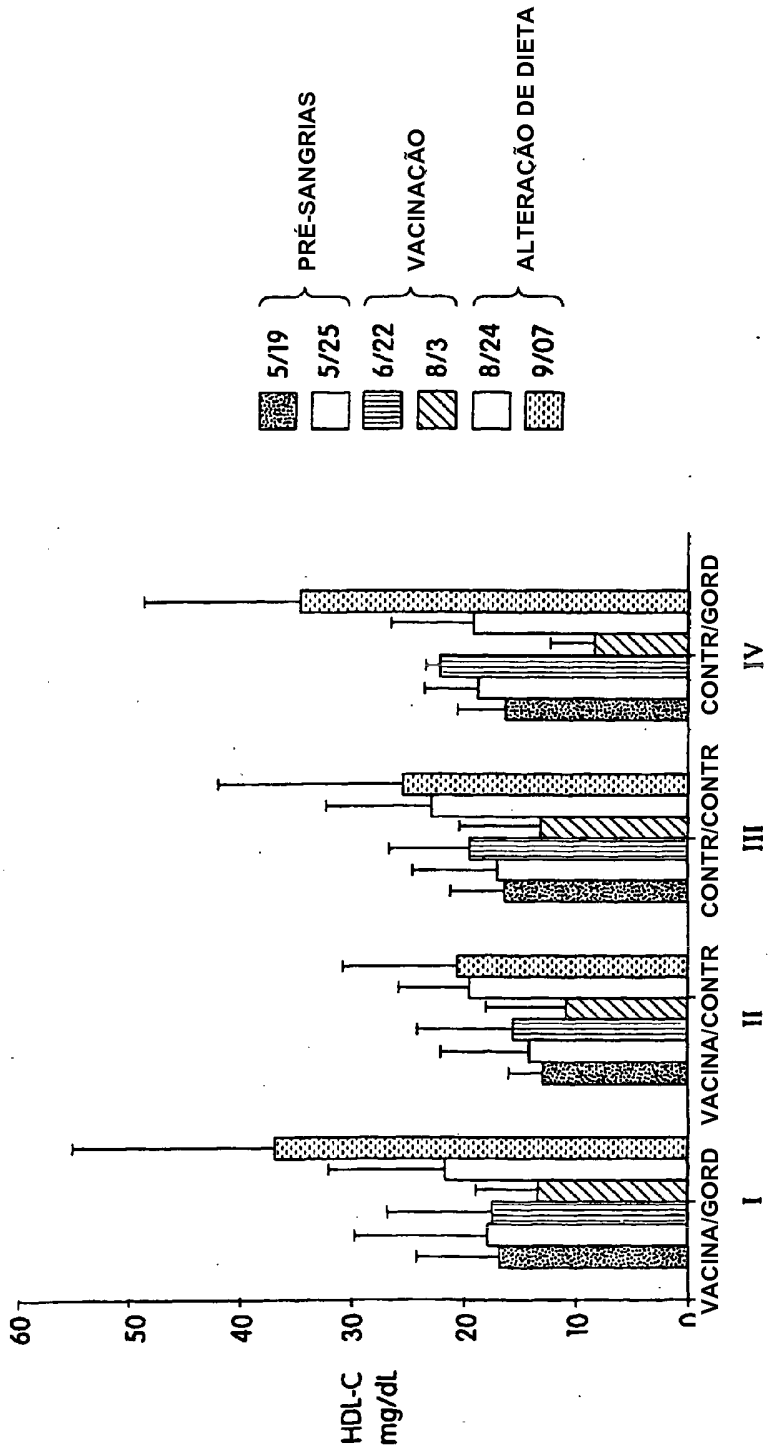
PRÉ-SANGRIAS
VACINAÇÃO
ALTERAÇÃO DE DIETA
5/19
5/25
6/22
8/3
8/24
9/07
HDL-C mg/dL
0
10
20
30
40
50
60
I VACINA/GORD
II VACINA/CONTR
III CONTR/CONTR
IV CONTR/GORD
GRUPO

Fig. 12

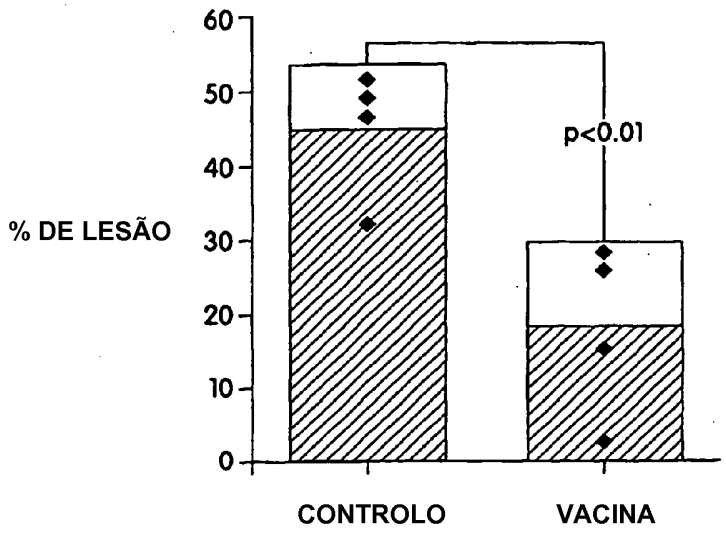

Fig. 13