

(11) Número de Publicação: PT 662000 E

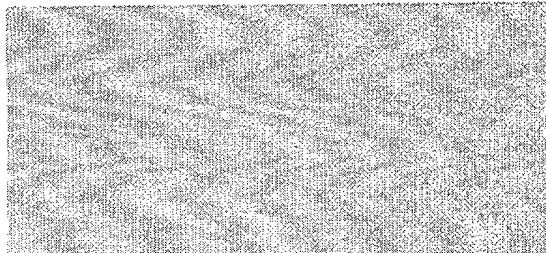
(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)
A61K039/385 A A61K047/48 B
C07K017/08 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1993.09.13	(73) Titular(es): INSTITUT PASTEUR 25-28 RUE DU DR. ROUX 75724 PARIS CEDEX 15	FR
(30) Prioridade: 1992.09.11 FR 9210879		
(43) Data de publicação do pedido: 1995.07.12	(72) Inventor(es): CLAUDE LECLERC CHRISTINE GENGOUX	FR FR
(45) Data e BPI da concessão: 2000.07.12	(74) Mandatário(s): MANUEL GOMES MONIZ PEREIRA RUA DO ARCO DA CONCEIÇÃO 3, 1º AND. 1100 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: MICROPARTÍCULAS TRANSPORTANDO ANTIGENES E A SUA UTILIZAÇÃO PARA A INDUÇÃO DE RESPOSTAS HUMORAIS OU CELULARES

(57) Resumo:



DESCRIÇÃO

MICROPARTÍCULAS TRANSPORTANDO ANTIGENES E A SUA UTILIZAÇÃO PARA A INDUÇÃO DE RESPOSTAS HUMORAIS OU CELULARES

A presente invenção tem como objecto micropartículas que transportam antigenes na sua superfície e a sua utilização para a indução de respostas humorais ou celulares.

Mais especificamente, a invenção está igualmente relacionada com micropartículas que comportam, na superfície, uma densidade importante de antigenes.

As células B que exprimem receptores imunoglobulinas específicos para um antígeno particular são altamente eficazes para a apresentação deste antígeno. (Rock et al. C., J. Exp. Med. (1984) 160:1102; Hutchings et al., Eur. J. Immunol. (1987) 17:393). Por exemplo, células B específicas podem apresentar o toxóide tetânico às células T na presença de concentrações de antígeno 10^4 vezes inferiores àquelas exigidas para a apresentação pelas células B não específicas ou pelos monócitos do sangue periférico (Lanzavecchia, Nature (1985) 314:537).

Além disso, estudos in vivo com ratos deficientes em células B indicam que estas células são necessárias para a activação das células T dos gânglios linfáticos (Janeway et al., J. Immunol. (1987) 138:1051; Ron et al. J., J. Immunol. (1987) 138:2848; Kurt-Jones et al. A.K., J. Immunol. (1987) 140:3773).

Os ratos deficientes em células B apresentam também respostas reduzidas no que diz respeito às células T CD4 $^+$ e CD8 $^+$ específicas de tumores, após imunização com o vírus da leucemia murina de Freund (Schultz et al., Science (1990) 291).

A capacidade das células B para modificar e apresentar o antígeno com vista ao reconhecimento pelas células T Helper CD4 $^+$ restritas ao complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC) forma a base de um modelo de activação das células B pelas células T (Noëlle et al. ,The Faseb Journal (1991) 5:2770).

O reconhecimento pelas células T Helper CD4⁺ do complexo péptido-MHC de classe II na superfície das células B permite a formação de conjugados fisicamente estáveis entre as células T e as células B (Kupfer et al. S., J. Proc. National Acad. Sci. USA (1986) 83:6080).

Este reconhecimento directo tem como resultado a proliferação e a diferenciação de células B em resposta a linfocinas, como a Interleucina-2, a Interleucina-4 ou a Interleucina-5.

A indução da resposta anticorpo contra um antigene necessita então da apresentação do antigene pelas células B.

A maior parte dos estudos sobre a apresentação do antigene foram efectuados utilizando proteínas solúveis como o toxóide do tétano, a lisozima ou a hemocianina (LH). Contudo, a maior parte dos antigenes aos quais o sistema imunitário está exposto estão inclusos em estruturas particuladas complexas, como bactérias ou parasitas.

Está estabelecido que as células que são capazes de fagocitose, como os macrófagos, podem apresentar antigenes bacterianos às células T.

Em compensação, não se sabe se as células que não fazem fagocitose, como as células B, podem apresentar antigenes complexos e de tamanhos significativos.

Foi recentemente mostrado que, *in vivo*, os antigenes bacterianos deviam ser administrados sob uma forma solúvel para induzir uma resposta anticorpo dependente das células T (Leclerc et al., J. Immunol. (1990) 144:3174; Leclerc et al., J. Immunol. (1991) 147:3545).

Contudo, seria conveniente estabelecer ainda que, *in vivo*, os antigenes proteicos bacterianos são exclusivamente apresentados às células T por células fagocitárias e que as células B não podem modificar antigenes que se encontram sob a forma de partículas.

Com este fim, comparou-se, de acordo com a presente invenção, a capacidade de macrófagos e de células B para apresentar o mesmo antigene sob uma forma solúvel e particulada.

Utilizaram-se, particularmente,抗原es proteicos, como a lisozima e a TNP-KLH, acoplados a micropartículas de poliacroleína ou de poliestireno possuindo um tamanho comparável ao de uma bactéria.

De acordo com a invenção, mostrou-se, de forma surpreendente, que as células B que apresentam a TNP-KLH ou a lisozima de maneira muito eficaz são incapazes de apresentar estes抗原es acoplados às esferas. Em compensação, os macrófagos apresentam as duas formas dos抗原es às células T.

O estudo da apresentação dos抗原es e da indução da resposta T celular e/ou humorai tem uma importância científica e médica particular.

Na verdade, a orientação no sentido de uma resposta puramente celular ou de uma resposta puramente humorai pode permitir vacinar contra certos patógenos, modificar determinadas disfunções biológicas e curar certas patologias.

Por exemplo, uma tal orientação permitiria eliminar infecções persistentes ou efectuar uma regulação das respostas alérgicas.

Além disso, existem duas subpopulações de células T, CD4⁺, as Th1 e as Th2, que possuem capacidades distintas para produzir diferentes linfocinas (Mosmann, Cherwinski, Bond, Giedlin et Coffman, J. Immunol. (1986) 136, 2348-2357). A indução de Th1 ou de Th2 desempenha um papel importante na resistência às infecções bacterianas, parasitárias ou virais. Assim, no caso da leismaniose cutânea murina, as Th1 protegem da infecção, enquanto as Th2 agravam a doença. In vitro, os linfócitos B estimulam, de forma óptima, a proliferação dos clones Th2, enquanto se observa uma forte proliferação dos clones Th1 com as células aderentes (Gajewski, Pinnas, Wong e Fitch, J. Immunol. (1991) 146, 1750-1758).

A orientação do抗原e no sentido da apresentação pelas células B ou pelos macrófagos pode permitir induzir respostas Th1 ou Th2.

Até ao momento, desenvolveram-se diferentes técnicas para induzir uma melhor resposta imunitária.

O método mais antigo consiste em activar o sistema imunitário com a ajuda de adjuvantes. Assim, o adjuvante de Freund permite aumentar a intensidade das respostas humoral e celular. Contudo, tais adjuvantes apresentam grandes inconvenientes devido à sua falta de especificidade, à sua toxicidade e às reacções imunológicas parasitas que podem induzir devido à sua falta de pureza.

Os iscomes (abreviatura da expressão “immuno-stimulating complexes”) são compostos por um complexo antigénico e por um adjuvante, o Qui1A que é extraído de uma árvore. Estas partículas possuem um diâmetro de cerca de 35 nm e são compostas por subunidades com cerca de 12 nm. Elas permitem induzir uma resposta imunológica, mas, mais frequentemente, os antigenes estão encapsulados e são, em seguida, libertados no meio exterior. Além disso, a técnica não permite um controlo preciso do tipo de células que apresentam estas partículas e, por isso, elas induzem uma dupla resposta humoral e celular.

Finalmente, do ponto de vista prático, observar-se-ão dificuldades de preparação, uma falta de estabilidade e uma toxicidade importante destas partículas.

Os liposomas cuja utilização também foi testada para a indução de uma resposta imunitária apresentam os mesmos inconvenientes que os iscomes.

Também se desenvolveram micropartículas biodegradáveis como, por exemplo, polímeros de ácido láctico e glutâmico (Aguado e Lambert, Immuno. Biol. (1992) 184, 113-125). Estas micropartículas libertam, durante a sua degradação, o antígeno sob a forma solúvel. Esta libertação permite uma apresentação do antígeno por diversas células e a indução de uma resposta humoral, sem possibilidade de orientação no sentido de uma resposta especificamente celular.

Também foram sintetizadas partículas constituídas exclusivamente por proteínas recombinantes. Assim, o pedido de patente francês FR 2.635.532 descreve partículas compostas por uma proteína híbrida entre o antígeno HBs e uma sequência imunogénica que supostamente induz anticorpos de neutralização dirigidos contra vírus HIV.

Estas partículas apresentam inconvenientes notáveis. Assim, é muito difícil inserir sequências longas nestas partículas. Além disso, elas induzem tanto uma resposta humoral, como celular e não é portanto possível obter especificamente uma das duas.

Já foram utilizadas partículas de poliacroleína ou de poliestireno às quais estão acoplados anticorpos para efectuar técnicas de separação (Rembaum et al., Immunol. (1982) 52:341-351).

Nenhuma utilização para a preparação de vacinas e para a imunização in vivo foi, contudo, mencionada. As esferas utilizadas possuem diâmetros de 20 a 35 nm (poliacroleína) ou de 40 a 120 μm (poliestireno).

Foram também utilizadas partículas de poliacroleína com um diâmetro de 2 μm para estudar, *in vitro*, a estimulação de respostas T (Ziegler et al., Eur. J. Immunol. (1987), 17:1287-1296). A actividade destas esferas não foi testada *in vivo*.

No conjunto destes trabalhos, o critério do tamanho das partículas nunca foi considerado crítico. Contudo, partículas com tamanhos pequenos (nanopartículas), como as partículas HBs, poderiam ser apresentadas pelos linfócitos B. Pelo contrário, partículas com tamanhos demasiado significativos (superiores a 5-10 microns) não podem ser apresentadas por células fagocitárias.

As diferentes soluções propostas pelo estado da técnica para, por um lado, permitir uma indução de uma resposta imunológica importante e, por outro lado, dirigir esta resposta especificamente para uma das duas vias possíveis - humoral ou celular - não são portanto satisfatórias.

A invenção propõe afinar produtos que permitam obter uma boa resposta imunológica, possuindo uma orientação celular ou humoral.

De acordo com a invenção, descobriu-se, de forma surpreendente, que uma tal resposta podia ser induzida com a ajuda de micropartículas de pequenos tamanhos e apresentando densidades antigénicas variadas.

A presente invenção tem, particularmente, como objecto micropartículas em material sintético polimérico transportando na superfície uma ou mais proteínas ou péptidos ligados de forma covalente ao material constituinte das micropartículas, sustentando cada uma da(s) referida(s) proteína(s) ou péptido(s) um ou mais epitopos e estando presentes com uma densidade compreendida entre 10^4 e 5×10^5 moléculas/ μm^2 para cada uma das proteínas.

A invenção está também relacionada com as características abaixo mencionadas, consideradas isoladamente ou de acordo com todas as suas combinações tecnicamente possíveis.

O acoplamento das proteínas ou péptidos antigénicos às micropartículas deve ser covalente para evitar a libertação do antígeno sob a forma solúvel.

As micropartículas possuem um diâmetro médio compreendido entre cerca de $0,25 \mu\text{m}$ e $1,5 \mu\text{m}$ e, preferencialmente, de cerca de $1 \mu\text{m}$, a fim de poderem ser apresentadas aos linfócitos T, CD4^+ por células fagocitárias, mas não pelos linfócitos B.

As referidas micropartículas são, mais particularmente, caracterizadas pela ligação covalente ser efectuada por reacção das funções NH_2 e/ou CO das proteínas ou péptidos e do material constituinte da micropartícula.

Vantajosamente, uma tal ligação far-se-á por intermédio de um agente de ligação como, por exemplo, o glutaraldeído ou a carbodiimida.

Todavia, pode utilizar-se qualquer outro agente bifuncional que permita uma tal ligação. Tais agentes são conhecidos; ver, por exemplo, Synthetic polypeptides as antigens, M.H. Von Regenmortel, J.P. Briand, S. Muller and S. Plane, 1988 (Elsevier). Esta ligação pode, igualmente, ser efectuada sem agente de ligação.

O material constituinte da micropartícula pode ser, vantajosamente, um polímero biocompatível, como um polímero acrílico, por exemplo, a poliacroleína, o poliestireno ou os poli(alfa-ácidos hidróxicos), copolímeros de ácidos lácticos e glicólicos ou polímeros de ácidos lácticos.

Entende-se por polímero qualquer homopolímero, hetero- ou copolímero.

Ele deve permitir um acoplamento covalente das proteínas ou dos péptidos ao material e não deve provocar uma reacção de rejeição ou de toxicidade por parte do organismo no qual poderá ser injectado. Vantajosamente, para a aplicação em terapêutica humana, trata-se de um polímero biodegradável, por exemplo, um polímero que possa ser degradado pelas células possuindo enzimas lisozómicas, como os macrófagos.

Tais materiais biodegradáveis podem ser polímeros de ácido láctico e glutâmico, amido ou polímeros utilizados para aplicações biomédicas, em particular, aqueles utilizados na suturação.

Uma tal micropartícula pode transportar na sua superfície, além das proteínas ou péptidos antigénicos, moléculas susceptíveis de activar o sistema imunitário, como interleucinas, em particular, o interferão-gama ou a interleucina 4.

Estas micropartículas podem transportar uma ou mais proteínas ou péptidos os quais podem compreender, cada um deles próprios, um ou mais epitopos. Tais proteínas ou péptidos podem ser glicoproteínas, péptidos sintéticos contendo um ou mais epitopos ou qualquer outra molécula não proteica, ou contendo uma parte proteica, que possa induzir uma resposta imunitária.

As micropartículas objecto da presente invenção podem, além disso, ser encapsuladas, a fim de proteger os抗ígenos fixos nas suas superfícies de uma degradação e de os conduzir até ao seu local de acção.

Elas podem, assim, compreender um núcleo constituído por uma matriz polissacárida, à qual estão ligados os抗ígenos, por uma primeira camada lipídica ligada de forma covalente ao núcleo e por uma segunda camada de moléculas anfifílicas.

A invenção tem como outro objecto os medicamentos ou vacinas compreendendo as micropartículas acima descritas, assim como as composições farmacêuticas caracterizadas por as compreenderem, em associação com diluentes ou adjuvantes farmaceuticamente compatíveis.

A presente invenção está, de forma geral, relacionada com a utilização de micropartículas em material sintético polimérico transportando na superfície uma ou mais proteínas ou péptidos ligados de forma covalente, comportando cada uma da(s) referida(s) proteína(s) ou péptido(s) um ou mais epitopos T ou B, para o fabrico de um medicamento ou de uma vacina para a indução de uma resposta imunitária, de acordo com a qual as densidades da(s) proteína(s) ou péptido(s) na superfície das micropartículas são ajustadas a fim de orientar a referida resposta imunitária no sentido de uma resposta maioritariamente humoral ou maioritariamente celular.

Sob um outro aspecto, a invenção tem também como objecto um procedimento para o fabrico de um medicamento ou de uma vacina cuja resposta imunitária é quer maioritariamente humoral, quer maioritariamente celular, do tipo Th1 ou Th2, sendo o referido procedimento caracterizado por se fixar de forma covalente nas micropartículas ou esferas em material sintético polimérico, pelo menos, uma proteína ou um péptido comportando um ou mais epitopos, fazendo variar a densidade da proteína ou do péptido fixo na superfície de acordo com o tipo de resposta desejada.

A fim de induzir uma resposta celular e humoral, utilizar-se-ão, preferencialmente, micropartículas apresentando uma densidade de cada uma das proteínas ou péptidos que comportam um epitopo de, no mínimo, 10^5 e, preferencialmente, cerca de 5×10^5 moléculas/ μm^2 . Estas densidades correspondem, aproximadamente, a quantidades de proteínas na superfície da micropartícula de, respectivamente, 10^5 e 4×10^5 moléculas, para uma esfera com um diâmetro de 1 μm .

Tendo em vista a indução de uma resposta maioritariamente celular, CD4 $^+$, classe II restrita, utilizar-se-ão, preferencialmente, micropartículas apresentando uma densidade de cada uma das proteínas ou péptidos que comportam um ou mais epitopos compreendida entre cerca de 10^4 e 5×10^4 moléculas de proteínas/ μm^2 .

As outras características destas micropartículas são aquelas mencionadas mais acima relativamente às micropartículas de alta densidade.

As proteínas e antígenos ligados de forma covalente às micropartículas dependem da aplicação prevista das referidas micropartículas.

- Elas dependem igualmente do tipo de resposta imunitária que se pretende induzir, mas também da doença ou da afecção que se procura tratar ou da qual se procura prevenir o sujeito.

A título de exemplo, poderão utilizar-se os epitopos da região Pre S2 do antígeno HBS do vírus da hepatite viral, cujas sequências são as seguintes:

- epitopo T: Pre S:T (120-132)

MQWNSTTFHQTLQ

- epitopo B: Pre S:B (132-145)

QDPRVRGLYFPAGG

Podem também citar-se, a título de exemplos, os epitopos da proteína VP1 do vírus da poliomielite, cujas sequências são as seguintes:

- epitopo T: C3:T (103-115)

KLFAVWKITYKDT

- epitopo B: C3:B (93-103)

DNPASTTNKDK

Um outro exemplo de sequência é o epitopo do anel V3 da proteína GP120 do vírus HIV1, cuja sequência é a seguinte:

- epitopo T + B: anel V3

INCTRPNNTNTRKSIRIQRGPGRFTIGKIGNMRQAHCI

Utilizar-se-ão, preferencialmente, os epitopos B para induzir uma resposta humoral com a ajuda de micropartículas de forte densidade e os epitopos T para induzir uma resposta

maioritariamente celular com a ajuda de micropartículas com uma fraca densidade de proteínas ou péptidos de superfície.

Tais micropartículas serão injectadas nos pacientes que se quer tratar, de forma terapêutica ou profiláctica, através dos meios conhecidos pelo perito, por exemplo, por injecção subcutânea, intraperitoneal, intravenosa ou por qualquer outro meio que permita induzir uma resposta imunitária.

Reportar-se-á a este respeito a Current protocols in immunology (Edited by J.F. Coligen, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober, Wiley-Intersciences Editors), no qual estão registadas as técnicas de imunização.

Uma das vantagens particulares da presente invenção reside no facto de ela permitir induzir respostas imunitárias humorais ou celulares sem adicionar adjuvantes às esferas ou micropartículas. Contudo, também se pode encarar a adição de adjuvantes não tóxicos e que não provocam uma reacção imunitária parasita no quadro de uma utilização de acordo com a presente invenção.

A presente invenção é ilustrada, sem por isso ficar limitada, pelos exemplos que se seguem, nos quais:

Os diagramas da Figura 1 são resultados de análises por fluorometria (FACS) de micropartículas transportando antigenes KLH ou TNP-KLH. As ordenadas indicam o anticorpo utilizado (PBS-sinal, anti-KLH, anti-TNP). As abcissas indicam os tipos de micropartículas testadas: E (KLH), E (TNP-KLH), E (OVA) e E (OVA-TNP), que correspondem a micropartículas às quais estão ligadas, respectivamente, a KLH, a TNP-KLH, a ovalbumina e a ovalbumina-TNP.

As Figuras 2A a 2D representam a capacidade de células do baço, de macrófagos e de células B específicas para o TNP e activadas pela LPS para apresentar, respectivamente, a KLH, a TNP-KLH, micropartículas transportando a KLH e micropartículas transportando a TNP-KLH.

A Figura 3 é uma curva que indica as respostas proliferativas de células ganglionares de ratos imunizados com a lisozima solúvel, estimuladas, *in vitro*, pela lisozima solúvel

(Figura 3A) ou por micropartículas com diâmetros de 0,25, 0,75 e 1,5 μm (Figura 3B) que transportam a lisozima. A proliferação celular é medida através da incorporação de timidina (cpm) em ordenadas, enquanto a diluição das micropartículas está indicada em abcissas.

A Figura 4 representa a produção de IL2/IL4 por um hibridoma específico para a lisozima, após estimulação pela lisozima solúvel (Figura 4A) ou por micropartículas transportando a lisozima (Figura 4b). As concentrações das micropartículas estão indicadas em abcissas, enquanto a proliferação está indicada em ordenadas.

As Figuras 5A e 5B representam a activação do hibridoma T específico para a lisozima, medida através da produção de IL2/IL4, após estimulação pela lisozima solúvel (Figura 5A) ou acoplada a micropartículas (Figura 5B), na presença de esplenócitos ou de células B(A20) como células que apresentam o antígeno.

As Figuras 6A e 6B representam a proliferação, *in vitro*, após estimulação pela lisozima solúvel, de células de gânglios inguinais de ratos imunizados, respectivamente, com lisozima solúvel em adjuvante completo de Freund (Figura 6A) e com lisozima acoplada a micropartículas (Figura 6B).

As Figuras 7A e 7B representam a proliferação, *in vitro*, após estimulação pela lisozima, de células de gânglios inguinais de ratos imunizados com diferentes concentrações de lisozima solúvel (7A) ou acoplada a micropartículas (7B).

A Figura 8 representa a proliferação de células ganglionares de ratos imunizados com a lisozima em adjuvante completo de Freund ou em PBS ou na presença de micropartículas acopladas à hemocianina de lapa ou KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin).

A Figura 9 representa a resposta proliferativa de células ganglionares de ratos imunizados com a hemoglobina solúvel em adjuvante (Hb + CFA) ou acoplada a esferas (E-Hb).

A Figura 10 representa a resposta proliferativa de células de ratos estimulados com a ovalbumina solúvel (OVA + CFA) ou com a ovalbumina acoplada a esferas (E-OVA).

A resposta proliferativa, respectivamente, à hemoglobina e à ovalbumina foi medida, em ordenadas, através da radioactividade incorporada (cpm) em função da quantidade de hemoglobina ou de ovalbumina (em abcissas) utilizada para re-estimular as células.

A Figura 11 ilustra a proliferação de células de ratos imunizados com o péptido C3 sob a forma solúvel (C3:T + CFA) ou sob a forma microparticulada (E-C3: T). As células foram re-estimuladas na presença de quantidades de C3 solúvel (em abcissas) e a proliferação foi medida (em ordenadas).

A Figura 12 representa a proliferação de células de ratos imunizados com o péptido pré-S:TB solúvel (Pré-S:TB + alúmen) ou sob a forma microparticulada (E-pré-S:TB), ou com o péptido pré-S:B sob a forma particulada (E-Pré S:B), e re-estimuladas pelo péptido Pré-S.

As Figuras 13A e 13B representam, respectivamente, as taxas de anticorpos anti-lisozima (Figura 13A) e de anticorpos anti-KLH (Figura 13B) de ratos imunizados com lisozima e adjuvante alúmen, micropartículas transportando a lisozima ou micropartículas transportando a LH.

As Figuras 14 e 15 ilustram a resposta anticorpo de ratos imunizados com a hemoglobina (Figura 14) ou a ovalbumina (Figura 15), sob a forma solúvel ou particulada. O Log do título em anticorpos está representado em ordenadas, enquanto o tempo está representado em abcissas.

A Figura 16 é relativa à resposta anticorpo de ratos imunizados com o péptido pré-S:TB solúvel ou com os péptidos pré-S:TB ou pré-S:B sob a forma particulada. As ordenadas e as abcissas desta curva têm o mesmo significado que para as Figuras 14 e 15.

A Figura 17A representa a proliferação de células de ratos imunizados através de injeção de lisozima na presença de adjuvante de Freund, após estimulação, *in vitro*, por micropartículas transportando a lisozima em diferentes densidades.

A Figura 17B representa a proliferação, *in vitro*, de células de ratos imunizados, *in vivo*, com lisozima ou esferas transportando a lisozima, após estimulação por diferentes concentrações de lisozima.

A Figura 18 é um diagrama que ilustra a produção de anticorpos anti-lisozima por células de ratos imunizados através de injeção de lisozima e adjuvante de Freund ou de micropartículas transportando a lisozima.

EXEMPLO 1:

Preparação de esferas acopladas à KLH ou à ovalbumina

1. Materiais e métodos e apresentação pelas células B ou pelos macrófagos

Os ratos são fêmeas BALB/c e DBA/2 com idades entre as 6 e as 8 semanas.

Os抗igenes são a KLH e a ovalbumina (OVA) comercializadas por Sigma Chemical (St-Louis, USA). A hemocianina trinitrofenilada (TNP4-KLH) foi preparada como descrito anteriormente (Shutze et al., J. Immunol. (1989) 142:2635).

1.1 Acoplamento covalente dos抗igenes às micropartículas de poliacroleína

Micropartículas de poliacroleína com um diâmetro compreendido entre 0,25 e 1,5 μm , comercializadas por Polysciences Inc. (Washington, PA), são acopladas à ovalbumina ou à KLH como descrito anteriormente (Rembaum et al., Immunol. (1982) 52:341; Ziegler et al., Eur. J. Immunol. (1987) 17:1287).

1 ml destas micropartículas é lavado duas vezes com PBS e ressuspensos em 1 ml de KLH ou de ovalbumina (5 mg/ml em PBS). Após três horas de incubação à temperatura ambiente, as micropartículas são lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em 2 ml de PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA) e antibióticos. As micropartículas obtidas desta forma são armazenadas a 4°C até à sua utilização.

As micropartículas transportando os抗igenes TNP-OVA ou TNP-KLH são preparadas através de incubação de micropartículas transportando a OVA ou a KLH com TNBS (trinitrobenzenosulfonato).

2 ml das micropartículas que foram acopladas à KLH ou à ovalbumina são lavados duas vezes com PBS e ressuspensos em 2 ml de tampão cacodilato contendo 10 mg/ml de TNBS. As micropartículas são incubadas durante 30 minutos na obscuridade, à temperatura ambiente, e lavadas três vezes com PBS. As micropartículas são ressuspensas em 2 ml de PBS contendo 1% de BSA e antibióticos e armazenadas a 4°C.

1.2 Análise por citofluorometria de fluxo

50 μ l de micropartículas são lavados duas vezes com PBS contendo 1% de BSA e incubados durante 40 minutos, a 4°C, com soro de rato anti-KLH ou anti-TNP. Após duas lavagens, as micropartículas são incubadas durante 40 minutos, a 4°C, com anticorpos de cabra acoplados ao FITC (fluoroisotiocianato) dirigidos contra imunoglobulinas de rato (Biosys, Compiègne, France).

Após quatro lavagens, as micropartículas são ressuspensas em 1 ml de PBS contendo 1% de BSA.

A intensidade de fluorescência é medida utilizando o citómetro de fluxo FACSCAN (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

1.3 Meio de cultura.

Os linfócitos são cultivados em RPMI 1640 (Seromed, Munich, FRG) complementado com L-glutamina 2 mM, 10% de FCS (soro fetal de vitelo) inactivado pelo calor, 2-ME 50 μ M e antibióticos.

1.4 Estabelecimento da linha celular Th específica para a KLH.

Esta linha celular é estabelecida e mantida de acordo com o protocolo descrito por Taylor et al. (ed. IRL Press, New York) e Galelli et al. (J. Immunol. (1990) 145:2397).

Células de gânglios inguinais (4×10^6 /ml) de ratos DBA/2, que sofreram, 8 dias antes da recolha das células, uma injecção na base da cauda de 100 μ g de KLH em emulsão em adjuvante completo de Freund, foram crescidas durante 4 dias em meio de cultura na presença de KLH (100 μ g/ml).

As culturas são incubadas numa atmosfera com 7,5% de CO₂, a 37ºC.

Estabeleceu-se uma linha celular a partir desta cultura inicial através de passagens em série de células T purificadas em Ficoll (2 x 10⁵/ml), na presença de células do baço de ratos DBA/2 irradiadas (3 000 rad) durante 6 a 8 dias (período de repouso) ou de células do baço irradiadas mais KLH (100 µg/ml) durante 4 dias (período de estimulação).

As células T utilizadas nas experiências são recolhidas 8 a 10 dias após a sua última colocação na presença da KLH.

1.5 Estimativa da proliferação das células Th.

Incubaram-se culturas em triplicado contendo 5 x 10⁴ células Th purificadas em Ficoll e 5 x 10⁴ células B de memória específicas para o TNP purificadas e irradiadas (900 rad) ou 5 x 10⁵ células totais do baço irradiadas (3 000 rad) ou 10⁵ células aderentes do baço irradiadas (3 000 rad) ou 10⁵ células B de linfoma A20 positivas para o MHC de classe II irradiadas (3 300 rad) (Kim et al., J. Immunol. (1979) 122:549) ou 10⁵ células B intactas específicas para o TNP e activadas pela LPS, como fonte de células que apresentam os抗ígenos, e diferentes concentrações de antígeno em placas de microcultura de fundo plano (Corning, Cambridge, MA) sob um volume total de 0,2 ml/poço de meio completo. A proliferação celular T foi estimada por incorporação de timidina tritiada durante as oito últimas horas de uma cultura de 3 dias.

Os resultados são expressos como a média geométrica de três culturas, uma vez eliminado o ruído de fundo. O desvio padrão é inferior a 15% da média.

1.6 Células B específicas para o TNP.

As células B específicas para o TNP de ratos normais são purificadas por ligação e eluição numa gelatina-TNP8, de acordo com a técnica descrita por Haas e Layton J.E., J. Exp. Med. (1975) 141:1004.

Este protocolo foi modificado a fim de se obter populações enriquecidas em células B de memória específicas para o TNP, a partir do baço de ratos anteriormente imunizados, como previamente descrito (Galelli et al., J. Immunol. (1990) 145:2397). As células B de

memória específicas para o TNP foram seleccionadas em gelatina transportando um hapteno (gelatina-TNP2), testando-se a afinidade dos receptores para o TNP em comparação com as células B intactas, e a capacidade para segregar quantidades elevadas de imunoglobulinas G anti-TNP na presença de concentrações pequenas de抗igenes.

10^8 células do baço, não contendo nem eritrócitos, nem células mortas, foram suspensas em 3 ml de HEPES (50 mM), tamponadas com DMEM (Seromed, Munique, Alemanha) e incubadas em caixas de Petri de plástico recobertas com gelatina-TNP2. As caixas são agitadas de forma suave durante 15 minutos, a 4°C, e depois lavadas 10 vezes com DMEM gelado. As células aderentes são eluídas juntando 5 ml de DMEM re-aquecido a 37°C, e a gelatina-TNP ligada é eliminada por digestão com a colagenase (Collagenase CLSIII de Worthington Biochemicals Freehold, New Jersey, 100 U/ml) durante 15 minutos, a 37°C.

Este protocolo conduz à obtenção final, expressa como uma percentagem relativamente ao número de células do baço originais, de 0,3 a 0,6% de células que ligam o TNP, a partir do baço de ratos imunizados.

As células são crescidas durante toda a noite antes da adição de outras células e reagentes, a fim de permitir a re-expressão de imunoglobulinas de superfície modificadas pelo tratamento com a colagenase. A presença nestas células de receptores livres para o TNP é avaliada através da sua capacidade para ligar eritrócitos transportando TNP na sua superfície.

55 a 76% das células obtidas a partir de ratos imunizados formam rosetas com os SRBC modificados pelo TNP. Estas células não proliferam em resposta à concanavalina A, mas estão 20 vezes enriquecidas em células que segregam as imunoglobulinas G anti-TNP, após estimulação pela TNP-LH, em comparação com as células de baço não fraccionadas.

1.7 Células B intactas específicas para o TNP e activadas pela LPS.

Células B intactas de rato específicas para o TNP e não imunizadas foram purificadas por ligação, seguida de eluição em gelatina-TNP8, como descrito anteriormente. Estas células

foram crescidas com uma densidade de 2×10^6 por ml num meio contendo 50 µg/ml de LPS (Salmonella enteriditis, Difco Laboratories, Detroit, MI) durante 3 dias. Os linfoblastos não aderentes foram purificados utilizando Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Piscataway, NJ) e, depois, lavados e utilizados como células acessórias.

1.8 Macrófagos

Os macrófagos foram obtidos a partir de células do baço não imunizadas por adesão durante 4 horas, a 37°C, seguida de uma lavagem das células a fim de eliminar as células não aderentes, tal como descrito anteriormente (Kakiochi et al., J. Immunol. (1983) 131:109).

2. Resultados

2.1 Verificação do acoplamento do antígeno às micropartículas

A KLH foi acoplada, de forma covalente, às micropartículas de poliacroleína com um diâmetro de 0,25 a 1,5 µm. O acoplamento da KLH às micropartículas foi controlado por análise de citofluorometria de fluxo utilizando um soro de rato anti-KLH.

Os resultados obtidos com as micropartículas de 1,5 µm estão indicados na Figura 1.

As micropartículas de 1,5 µm foram acopladas à ovalbumina (E OVA) ou à KLH (E-KLH). As micropartículas TNP-OVA ou TNP-KLH [designadas, respectivamente, E(TNP-OVA) e E(TNP-KLH)] foram preparadas por incubação de micropartículas transportando a OVA ou a KLH com TNBS. A análise por citofluorometria foi efectuada nas micropartículas incubadas na presença de PBS ou na presença de soro de rato anti-KLH ou anti-TNP. Após lavagem, as micropartículas foram incubadas com anticorpos de cabra ligados ao FITC e dirigidos às imunoglobulinas de rato, sendo analisadas por citometria de fluxo.

Obtiveram-se resultados semelhantes com as micropartículas de 0,25 e 0,75 µm.

As micropartículas de sinal acopladas à ovalbumina não foram reconhecidas pelo soro anti-KLH.

2.2 Comparação da capacidade de diferentes populações de esplenócitos para apresentar antigenes solúveis ou particulados.

Comparou-se a capacidade de esplenócitos não fraccionados, de macrófagos e de células B intactas e específicas para o TNP quanto à sua apresentação de KLH e de TNP-KLH, solúveis ou particuladas, às células T específicas para a KLH.

Nestas experiências, preparam-se populações de esplenócitos a partir de ratos não imunizados. Após purificação, as células B específicas para o TNP foram activadas durante três dias pela LPS; sabe-se, com efeito, que os linfoblastos induzidos pela LPS são células muito eficazes quanto à apresentação de um antígeno (Kakiochi et al., J. Immunol. (1983) 131:109).

Os resultados estão ilustrados na Figura 2, para a qual 5×10^5 esplenócitos irradiados, 10^5 células aderentes ou 10^5 células B intactas específicas para o TNP e activadas pela LPS foram cultivadas com 5×10^4 células Th específicas para a KLH, na presença de quantidades variadas de KLH solúvel (A), TNP-KLH solúvel (B) ou fixas em micropartículas E (KLH) (C) ou E (TNP-KLH) (D). A proliferação celular Th foi estimada no dia 3.

Como mostra a Figura 2 (2A e 2B), os macrófagos e as células B activadas pela LPS estimulam, de forma eficaz, as células T, quando são incubados com a KLH ou a TNP-LH solúveis.

Contrariamente a estes resultados, só os macrófagos, e não as células B específicas para o TNP e activadas pela LPS, são capazes de estimular as células T específicas para o KLH (Figuras 2C e D), quando se utilizam micropartículas que transportam a KLH ou a TNP-KLH.

Estes resultados mostram que os macrófagos são responsáveis pela actividade de apresentação do antígeno das células esplénicas, quando se utilizam antigenos particulados.

Desta forma, ilustrou-se a incapacidade das células B específicas para o TNP para apresentar o antígeno particulado.

EXEMPLO 2

Indução, in vivo e in vitro, de uma resposta proliferativa T, CD4+ específica para a lisozima por micropartículas acopladas à lisozima.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Antigenes

A lisozima (LISO) e a hemocianina de Limulus (LH) são provenientes dos Laboratórios Sigma.

1.2 Acoplamento do antigeno às micropartículas

O antigeno solúvel é transformado em antigeno particulado por acoplamento a micropartículas (Polysciences) com 0,2 a 1 μm de diâmetro. Utilizam-se dois métodos de acoplamento:

1.2 a) Acoplamento covalente directamente sem agente activador

As esferas ou micropartículas de poliacroleína transportam grupos aldeído capazes de reagir espontaneamente com as funções amina das proteínas.

1 ml de esferas é lavado 4 vezes com PBS e colocado em 1 ml de antigeno com uma concentração de 5 mg/ml. Após 3 horas de incubação à temperatura ambiente, as esferas são lavadas 3 vezes com PBS e incubadas 30 minutos em 1 ml de PBS-albumina humana a 1%, a fim de saturar os agrupamentos reactivos livres das esferas. Em seguida, após lavagem, as partículas são colocadas em 2 ml de PBS-albumina humana a 1%-antibiótico a 1% e depois são conservadas a + 4°C.

b) Acoplamento covalente pelo glutaraldeído

O antigeno é acoplado às esferas de poliestireno através do glutaraldeído, capaz de formar uma base de Schiff com os grupos amina das proteínas.

0,5 ml de esferas são lavados 3 vezes com PBS e colocados em 0,5 ml de glutaraldeído a 8%. Após 6 horas de incubação à temperatura ambiente, as esferas são lavadas 2 vezes e colocadas em 1 ml de antigene com uma concentração de 400 µg/ml. Após incubação durante a noite, à temperatura ambiente, as esferas são lavadas e incubadas com 1 ml de etanolamina 0,2M, durante 30 minutos, a fim de bloquear as funções aldeído livres do glutaraldeído.

Após uma última lavagem, as partículas são colocadas em 1 ml de PBS-albumina humana a 1%-antibiótico a 1% e, em seguida, conservadas a +4°C.

Este método de acoplamento permite determinar, por espectrofotometria, a quantidade de proteínas acopladas às micropartículas. As absorbâncias da solução de proteína a 400µg/ml e do sobrenadante obtido após a incubação das esferas com esta solução de proteína são medidas a 280 nm. Conhecendo o número de esferas utilizadas para o acoplamento, considera-se que a diferença entre a quantidade de proteína antes do acoplamento e a quantidade residual após o acoplamento permite estimar a quantidade de lisozima acoplada por partícula.

1.3 Protocolo de imunização

Utilizaram-se fêmeas BALB/c, de haplotipo H-2^d, com idades entre as 6 e as 8 semanas (criação do Instituto Pasteur).

- imunização por via intraperitoneal: injectam-se 100 µg de lisozima com 1 mg de alúmen ou diferentes quantidades de antigene acoplado às esferas, sem adjuvante,
- imunização por via subcutânea: na base da cauda, injectam-se 100 µg de lisozima em emulsão em adjuvante completo de Freund ou diferentes quantidades de antigene acoplado às esferas.

O soro de cada rato é recolhido 7 ou 14 dias após cada injeção. O teor em anticorpos dos soros é medido pelo teste ELISA.

A resposta proliferativa celular é medida nos gânglios inguinais e/ou no baço, recolhidos 7 e/ou 14 dias após cada injeção.

1.4 Detecção de anticorpos por ELISA

O antigene (lisozima) é incubado com uma concentração de 5 µg/ml em tampão carbonato 50 mM-pH=9,6 em microplacas (Nunc) durante uma noite, a 4°C. Após lavagem com um tampão PBS-Tween 20 a 0,01%, as diferentes diluições dos soros a testar, preparadas em tampão BSA a 1%, são incubadas durante 1 hora, a 37°C. Após lavagem, colocam-se 100 µl por poço de um conjugado anti-Ig de rato (anti-Ig totais fornecidos por Diagnostics Pasteur e anti-Ig específicos por Sigma), marcado com peroxidase e preparado em cabra, que é incubado durante 1 hora, a 37°C. Após lavagem, adiciona-se a solução de substrato preparada extemporaneamente: ortofenilenodiamina a 0,5 mg/ml (Sigma) em tampão ácido cítrico 0,1M – fosfato dissódico 0,2 M – pH = 5 ao qual se adiciona H₂O₂ a 1/2500.

Uma coloração amarela revela a presença de anticorpos específicos; a reacção enzimática é parada 8 minutos mais tarde, com 50 µl de H₂SO₄ (11,5%).

A absorbância de cada poço é medida a 492 nm, através de um leitor de densidade óptica (Dynatech). O controlo negativo é efectuado com soro de ratos BALB/c não imunizados, diluído de 1:100. Os resultados são expressos quer em D.O. x 1000, a partir da absorbância medida corrigida da absorbância na ausência de soro, quer pelo título em anticorpos, calculado a partir de uma regressão linear baseada na absorbância obtida com o soro de ratos BALB/c não imunizados.

Quando o antigene está sob a forma particulada, o teste ELISA é efectuado em tubos. As diluições dos soros a testar são incubadas directamente com o antigene acoplado às esferas (8×10^8 partículas/ml). As lavagens fazem-se por centrifugação em tampão PBS-Tween 20 (0,01%). Quando a reacção enzimática tiver terminado, transferem-se 200 µl de cada tubo para microplaca e, em seguida, mede-se a absorbância.

1.5 Inibição da fixação dos anticorpos anti-lisozima por teste ELISA

O teste ELISA mede a fixação dos anticorpos específicos presentes no soro de ratos BALB/c imunizados com a lisozima. Esta fixação é diminuída se o soro for pré-incubado (antes do teste ELISA) com o antigene: lisozima solúvel ou acoplada às esferas, que se comporta então como um inibidor.

O soro anti-lisozima é pré-incubado com a lisozima solúvel ou acoplada às esferas, durante 1 hora, a 37°C, e depois durante a noite, a 4°C; a reacção efectua-se em tubos. A fixação dos anticorpos não ligados ao inibidor é avaliada por teste ELISA (triplicados) em microplacas, cujos poços foram recobertos com lisozima com uma concentração de 5 µg/ml. A absorbância de cada poço é medida a 492 nm e corrigida da absorbância na ausência de soro. O controlo negativo é efectuado com o soro de ratos BALB/c não imunizados, diluído de 1:100. A absorbância sem inibidor, por ocasião da pré-incubação do soro, corresponde à fixação máxima de anticorpos anti-lisozima.

Os resultados são expressos em percentagem de inibição da fixação dos anticorpos e calculada de acordo com a relação

$$\frac{\text{D.O. sem inibidor} - \text{D.O. com inibidor}}{\text{D.O. sem inibidor}}$$

$$\text{D.O. sem inibidor}$$

A determinação gráfica da concentração de lisozima solúvel, assim como do número de esferas acopladas à lisozima necessário para 50% de inibição permite estimar a quantidade de lisozima fixada por partícula.

1.6 Estimulação de um hibridoma T específico para a lisozima

Produziu-se um hibridoma T por imunização de ratos BALB/c com lisozima. Ele reconhece especificamente o péptido 108-116 da lisozima, em associação com as moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II I-E^d.

10^5 células de hibridoma T são estimuladas por concentrações crescentes de antígeno: lisozima ou esferas acopladas, na presença de diferentes células que apresentam o antígeno: 5×10^5 esplenócitos irradiados (3 000 rad) de ratos BALB/c ou 10^5 células de linfoma B A20, limitadas pelas moléculas do MHC de classe II. As células são crescidas (triplicados) em meio completo RPMI 1640 (SEROMED), complementado com 10% de soro fetal descomplementado de vitelo, 50 µM de β-mercaptoetanol, 2 mM de glutamina, 100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml estreptomicina, em microplaca de fundo plano (Corning 25860). O sinal positivo é efectuado por estimulação do hibridoma pelo mitógeno de linfócitos T: concanavalina A a 5 µg/ml.

O sobrenadante é recolhido após 24 horas de cultura a 37°C (7,5% CO₂) e, em seguida, é congelado a -20°C durante um mínimo de 16 horas. A estimulação do hibridoma é medida pelo teor em IL2 do sobrenadante, num teste de proliferação de células CTL-L. Os desvios padrão não são mencionados pois o erro é inferior a 10% da média dos triplicados.

1.7 Doseamento da IL2 e da IL4

A linha CTL-L é dependente da Interleucina 2 e da Interleucina 4; ela é mantida em cultura em meio completo enriquecido com 20% de sobrenadante de esplenócitos de rato, incubados 36h com 2,5 µg/ml de concanavalina A.

Após descongelação, os sobrenadantes das culturas (testados a 1/2) são incubados na presença de 2,25 x 10⁴ células CTL-L, previamente lavadas três vezes com o meio RPMI 1640, durante 3 dias, a 37°C (7,5% CO₂).

A proliferação celular é medida por adição de timidina tritiada com uma actividade específica de 1 Ci/mmole, à razão de 2 µCi/ml de cultura, durante as últimas 16 horas de cultura.

O ADN das células é recuperado após lise das células e filtração com a ajuda de um "Skatron". A incorporação de radioactividade é contada por cintilação, com a ajuda de um contador-beta.

Os resultados são expressos em cpm, a partir da média dos triplicados corrigida da radioactividade incorporada na ausência de antígeno.

1.8 Teste de proliferação

O baço e/ou os gânglios inguinais são pré-recolhidos, de forma estéril, 7 ou 14 dias após a imunização dos ratos (ver protocolo de imunização). 8 x 10⁵ células são incubadas na presença de diferentes concentrações de antígeno, solúvel ou acoplado às esferas. As células são crescidas (triplicados) em meio RPMI 1640 (SEROMED), complementado com 1,5% de soro fetal descomplementado de vitelo, 0,5% de soro normal de rato, 50 µM de

β 2-mercaptopetanol, 2 mM de glutamina, 100 UI/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina, em microplacas (Corning 25860) durante 4 dias, a 37°C (7,5% CO₂).

A proliferação das células é medida por incorporação de timidina tritiada, com uma actividade específica de 25 Ci/mmol, à razão de 2 μ Ci/ml de cultura, durante as 16 últimas horas. O ADN das células é recuperado após lise das células e filtração com a ajuda de um "Skatron". A incorporação de radioactividade é contada por cintilação, com a ajuda de um contador-beta.

Os resultados são expressos em cpm, a partir da média dos triplicados corrigida da radioactividade incorporada na ausência de antigene.

2 RESULTADOS

2.1 Estimulação pela lisozima acoplada às micropartículas de células ganglionares de ratos imunizados com a lisozima

Nos ensaios ilustrados nas Figuras 3A e 3B, ratos BALB/c foram imunizados através de injecção subcutânea, na base da cauda, com lisozima solúvel complementada com o adjuvante de Freund (CFA).

Após 14 dias, os gânglios inguinais foram recolhidos, e a resposta proliferativa destas células foi testada, *in vitro*, contra diferentes concentrações de lisozima ou contra diferentes concentrações de micropartículas acopladas à lisozima. Os resultados são expressos em cpm corrigidos do valor obtido sem antigene.

A lisozima solúvel induz uma proliferação importante das células de ratos imunizados com este antigene em adjuvante de Freund (3A). A estimulação *in vitro* destas mesmas células pelas micropartículas-lisozima revela que estas são capazes de induzir uma proliferação celular muito forte (Figura 3B). As micropartículas de maior diâmetro, 0,81 e 0,96 μ m (acoplamento espontâneo), são muito eficazes.

2.2 Estimulação do hibridoma T pela lisozima acoplada às esferas

As figuras 4A e 4B correspondem aos resultados de estimulação do hibridoma T, específico para a lisozima, pela lisozima solúvel (4A) ou acoplada às micropartículas (4B). O grau de estimulação do hibridoma foi medido através da taxa de IL-2/IL-4 produzidas.

Na presença de esplenócitos irradiados, o hibridoma T é fortemente estimulado pela lisozima solúvel (Figura 4A). Na presença destas células, as micropartículas-lisozima de tamanho grande (0,81 e 0,96 μm) provocam igualmente uma produção importante de IL-2/IL-4 (Figura 4B), contrariamente às micropartículas de 0,5 e 0,25 μm que não são capazes de estimular o hibridoma T específico.

2.3 Incapacidade das células A20 do linfoma B para apresentar a lisozima acoplada às esferas ao hibridoma T, específico para a lisozima.

Sabe-se que tumores celulares B que transportam receptores Ig, podem ser utilizados como células que apresentam抗原es para抗原es que não possuem reactividade para o receptor Ig, mas que são fixos pelos tumores de células B por meio de mecanismos não específicos (Walker et al. J. Immunol. (1982) 128:2164; Glimcher et al. J. Exp. Med. (1982) 155:445; Mac Kean et al. J. Exp. Med. (1981) 154:1419; Mac Kean et al. J. Exp. Med. (1981) 154:1419).

Testou-se então a capacidade de um destes tumores celulares B, a linha A20, para apresentar a lisozima sob a forma solúvel ou particulada.

A apresentação da lisozima solúvel ou particulada foi comparada utilizando duas fontes de CPA: quer uma fonte heterógena, os esplenócitos totais irradiados, quer células B provenientes do linfoma A20. Quando o抗原e está sob a forma solúvel (Figura 5A), ele pode estimular o hibridoma T tanto na presença de esplenócitos como de células B A20. Pelo contrário, a lisozima particulada é apresentada unicamente pelos esplenócitos e não pelas células B A20 (Figura 5B).

Estes resultados confirmam que os esplenócitos podem apresentar um抗原e às células T, quer seja ele solúvel ou esteja sob a forma particulada. Pelo contrário, os linfócitos são incapazes de apresentar um抗原e modificado para particulado, por acoplamento a esferas com um tamanho da ordem do micrómetro.

2.4 Indução de respostas T proliferativas por injeção de lisozima acoplada a micropartículas em ratos.

Analisou-se a imunogenicidade, in vivo, do antígeno acoplado a micropartículas imunizando ratos BALB/c com lisozima em adjuvante completo de Freund ou com este antígeno acoplado a esferas de poliacroleína. Após 14 dias, as células dos gânglios de drenagem destes animais foram estimuladas, in vitro, por diferentes concentrações de lisozima solúvel.

Na presença de lisozima solúvel, as células ganglionares proliferaram fortemente, quer provenham de ratos imunizados com a lisozima solúvel ou com as micropartículas-lisozima (Figura 6A). Isto demonstra que, nos dois casos, células T específicas para a lisozima foram sensibilizadas in vivo. Após injeção em ratos de micropartículas-LH que representam o controlo de especificidade, as células ganglionares destes animais são incapazes de proliferar em resposta a uma estimulação pela lisozima solúvel, in vitro (Figura 6B). A resposta celular in vitro é então específica do antígeno proteico acoplado às micropartículas, utilizado quando da imunização dos ratos.

A resposta proliferativa das células sensibilizadas por 10^9 micropartículas-lisozima (correspondendo a 1 µg de lisozima), na ausência de adjuvante, é tão elevada como a das células de animais imunizados com 100 µg de lisozima solúvel, em adjuvante de Freund (CFA) (Figura 6A). Para verificar e aprofundar este resultado, compararam-se as respostas proliferativas das células ganglionares de animais tendo recebido diferentes doses de lisozima em CFA ou diferentes concentrações de micropartículas acopladas, após estimulação, in vitro, pela lisozima solúvel.

No caso das Figuras 7A e 7B, imunizaram-se ratos por injeção subcutânea, na base da cauda, com lisozima solúvel e adjuvante completo de Freund (CFA) (Figura 7A) ou com esferas acopladas ao antígeno sem qualquer adjuvante (Figura 7B).

Após 14 dias, recolheram-se os gânglios inguinais e testou-se a resposta proliferativa destas células, in vitro, contra diferentes concentrações de lisozima. Os resultados são expressos em cpm corrigidos do valor obtido sem antígeno.

Na Figura 7B, é de notar que as denominações 10^9 , 10^8 , 10^7 e 10^6 E-LISO correspondem, respectivamente, a pesos de 1; 0,1; 0,01 e 0,001 µg em lisozima.

Estes resultados demonstram que as células ganglionares de animais imunizados com micropartículas transportando a lisozima proliferaram, in vitro, após colocação em contacto com a lisozima; isto indica, assim, uma sensibilização das células T específicas para este antígeno.

A comparação dos efeitos-doses (Figura 7) indica que 1 µg de lisozima acoplada às esferas origina uma resposta quase equivalente à de 1 µg de antígeno em CFA injectado.

A Figura 8 representa a resposta proliferativa de células de ratos imunizados com a lisozima em adjuvante completo de Freund (CFA) ou em PBS com micropartículas acopladas à LH. A adição de esferas LH à lisozima não permite induzir respostas proliferativas elevadas, o que indica que a lisozima deve estar acoplada de forma covalente às micropartículas para induzir respostas T proliferativas.

2.5 Indução de respostas T proliferativas por injeção de hemoglobina ou de ovalbumina acoplada a micropartículas em ratos

Imunizaram-se ratos com a hemoglobina ou a ovalbumina em adjuvante completo de Freund ou com estas proteínas acopladas, por meio de ligação covalente, ao mesmo tipo de partículas que nos exemplos anteriores (poliestireno, diâmetro de 1 µm).

As células dos gânglios destes animais foram re-estimuladas, in vitro, pelas proteínas solúveis, medindo-se a proliferação celular.

Os resultados obtidos para a hemoglobina (Hb) estão representados na Figura 9, enquanto a Figura 10 ilustra os resultados obtidos com a ovalbumina (OVA).

O conjunto destes resultados mostra que estas proteínas acopladas a micropartículas são capazes de sensibilizar, in vivo, linfócitos T, CD4⁺ específicos para estas proteínas, na ausência de adjuvante.

2.6 Indução de respostas T proliferativas por injeção de péptidos sintéticos

• 2.6.1 Epitopo T da região C3 da proteína VP1

O epitopo T da região C3 (C3: T, 103-115) da proteína do poliovírus foi sintetizado e acoplado, de forma covalente, a esferas de 1 μm . Estas esferas foram injectadas em ratos BALB/c.

Os resultados da Figura 11 estabelecem de forma clara que o epitopo T acoplado às esferas (E-C3:T) induz uma forte resposta T-proliferativa para quantidades da ordem de 10^9 esferas injectadas por rato.

2.6.2 Péptido pré-S:T do antígeno HBS

O péptido pré-S:T (120-132) do antígeno HBS foi sintetizado e acoplado, de forma covalente, pelo glutaraldeído, a esferas possuindo um diâmetro de 1 μm .

A Figura 12 mostra que a injeção de 10^9 esferas em ratos DBA/1 induz uma forte resposta T-proliferativa, superior à obtida com o péptido em CFA. A injeção de esferas contendo unicamente o epitopo B não induz resposta proliferativa, o que demonstra a especificidade da resposta.

EXEMPLO 3

Indução de resposta anticorpo por micropartículas transportando um antígeno

Os materiais e métodos são semelhantes aos do Exemplo 2.

1. Lisozima e hemocianina de Limulus

Para as Figuras 13A e 13B, imunizaram-se ratos BALB/c por injeção intraperitoneal de 100 μg de lisozima solúvel em adjuvante (alúmen) ou de esferas acopladas ao antígeno: lisozima ou hemocianina de Limulus (LH), sem qualquer adjuvante.

As injeções foram administradas nos dias D0, D21, D42; os soros foram recolhidos nos dias D20, D31, D40 e D52 e testados por ELISA quanto ao seu teor em anticorpos. Os

resultados são expressos em log10 do título em anticorpos anti-lisozima (Figura 13A) e anti-KLH (Figura 13B).

Administraram-se i.p. três injecções de antigene nos dias 0, 21 e 42. As micropartículas-lisozima proporcionam respostas anticorpo muito boas, enquanto as micropartículas LH não induzem qualquer resposta anticorpo. Estas micropartículas, por outro lado, estimulam de forma muito eficaz as respostas T.

Uma das diferenças entre a LH e a lisozima reside nos seus pesos moleculares (14 500 para a lisozima e 71 000 para a LH).

Com concentrações iguais de antigene acoplado, a densidade de moléculas LH nas esferas é então cerca de 5 vezes mais fraca. Isto poderia explicar a ausência de estimulação de respostas anticorpo se estas forem devidas à estimulação directa, T-independent, pelo antigene presente nas micropartículas com uma densidade forte.

2. Hemoglobina e ovalbumina

Imunizaram-se ratos com o antigene solúvel em adjuvante alúmen ou com o mesmo antigene sob a forma particulada na ausência de adjuvante. O aparecimento de anticorpos foi depois seguido durante várias semanas.

No caso da hemoglobina (Hb), os ratos foram imunizados com 100 µg de proteína ou 10^9 esferas acopladas à proteína com diferentes densidades (2×10^4 e 2×10^5 molécula/ μm^2). As esferas transportando a ovalbumina (OVA) foram testadas com duas densidades (7×10^3 e 7×10^4 molécula/ μm^2).

Administrhou-se uma primeira injecção e, em seguida, administraram-se duas outras injecções ao vigésimo primeiro dia e ao quadragésimo segundo dia. Os soros foram recolhidos ao vigésimo dia, ao trigésimo primeiro dia, ao quadragésimo primeiro dia e ao quinquagésimo segundo dia e depois foram testados por ELISA quanto aos seus teores em anticorpos IgG. Os resultados são expressos em Log do título em anticorpos.

Os resultados da Figura 14 mostram que a hemoglobina acoplada às esferas não induz resposta anticorpo. Para a ovalbumina (Figura 15), detectam-se anticorpos após várias

injecções se o antigene estiver acoplado numa densidade forte, mas estas respostas permanecem fracas. Estes resultados indicam que proteínas de peso molecular elevado, como a hemoglobina, são incapazes de induzir respostas anticorpo, mesmo se estiverem acopladas numa densidade elevada às esferas.

Estes resultados, semelhantes aos obtidos com a lisozima e a hemocianina limulus, confirmam que as esferas que transportam proteínas de elevado peso molecular induzem respostas T-proliferativas na ausência de qualquer produção de anticorpos.

Da mesma forma, as proteínas de peso molecular fraco ou médio (inferior a 50 000) podem induzir o aparecimento de anticorpos se estiverem acopladas em densidades fortes às esferas.

3. Péptidos sintéticos

Os péptidos pré-S:TB (120-145) e pré-S:B, correspondendo a porções do antigene HBS contendo, respectivamente, um epitopo T e um epitopo B ou unicamente o epitopo B, foram acoplados de forma covalente a esferas de 1 μm , através do glutaraldeído (E-pré-S:TB e E-pré-S:B).

Comparou-se a resposta anticorpo induzida por estas esferas com aquela induzida por 10 μg de péptido pré-S:TB solúvel em adjuvante alúmen.

Os resultados da Figura 16 mostram que as esferas acopladas ao péptido TB, compreendendo um epitopo T e um epitopo B, induzem respostas anticorpo fortes, o que confirma que antigenes de pesos moleculares fracos acoplados a esferas permitem a indução de resposta anticorpo na ausência de qualquer adjuvante. Notar-se-á que estas respostas são tão boas como aquelas obtidas com o péptido livre na presença de adjuvante alúmen.

EXEMPLO 4

Efeito da densidade de lisozima na superfície de micropartículas sobre a sua imunogenicidade

Os materiais e métodos utilizados são semelhantes aos do exemplo 2.

Nas experiências apresentadas nas Figuras 17 e 18, testou-se a imunogenicidade de esferas acopladas à lisozima que apresentavam um número de moléculas variável na sua superfície.

Para a Figura 17A, imunizaram-se ratos BALB/c por injeção subcutânea de 100 µg de lisozima em CFA. Após 14 dias, recolheram-se os gânglios inguinais e testaram-se as células, in vitro, contra as esferas transportando diferentes densidades de lisozima (de 1100 a 950 000 moléculas de lisozima cobrindo as esferas com 1 µm de diâmetro). Os resultados são expressos em cpm corrigidos do valor obtido sem antigêne.

Para a Figura 17B, imunizaram-se ratos BALB/c por injeção subcutânea na base da cauda de lisozima solúvel com adjuvante (CFA) ou de 10^9 esferas transportando diferentes densidades de lisozima sem qualquer adjuvante.

Após 14 dias, recolheram-se os gânglios inguinais e testou-se a resposta proliferativa destas células, in vitro, contra diferentes concentrações de lisozima ou esferas. Os resultados são expressos em cpm corrigidos do valor obtido sem antigêne.

Testou-se a proliferação das células ganglionares provenientes de animais imunizados com a lisozima solúvel em CFA, após estimulação, in vitro, pelas diferentes micropartículas-lisozima. A resposta proliferativa destas células é tanto mais forte quanto a densidade da lisozima na superfície das micropartículas é elevada. Não se obteve qualquer proliferação das células ganglionares após estimulação pelas micropartículas apresentando uma densidade de 1 100 moléculas de lisozima por micropartícula (Figura 17A).

Na experiência da Figura 17B, testou-se a imunogenicidade destas micropartículas in vivo. Imunizaram-se ratos BALB/c com as diferentes micropartículas sem adjuvante, e as células ganglionares destes animais foram estimuladas, in vitro, por diferentes concentrações de lisozima solúvel.

A proliferação das células ganglionares provenientes de animais imunizados com as micropartículas acopladas à lisozima numa densidade forte (950 000 e 210 000) é elevada

e comparável à resposta das células sensibilizadas por 100 µg de lisozima em CFA. Após imunização com as micropartículas transportando uma densidade média de lisozima (45 000), as células proliferaram, *in vitro*, em resposta à lisozima, a partir de 10^1 µg/ml. As micropartículas com densidade mais fraca não sensibilizaram as células T, *in vivo*, pois não se observou qualquer proliferação na presença de lisozima, mesmo com uma concentração elevada (Figura 17B).

É de notar que 10^9 micropartículas acopladas à lisozima numa densidade elevada correspondem a 23 µg (1-950 000 G) e 5 µg (1-210 000 G) de lisozima acoplada; no entanto, a proliferação das células é tão elevada como após injeção de 100 µg de lisozima em CFA.

Para a Figura 18, imunizaram-se ratos BALB/c por injeção subcutânea de lisozima em adjuvante (CFA) ou com 10^9 micropartículas transportando diferentes densidades de lisozima (950 000, 210 000, 45 000 e 1 100 moléculas, respectivamente, cobrindo uma micropartícula com 1 µm de diâmetro).

Após 14 dias, recolheram-se os soros e testaram-se por ELISÁ quanto ao seu teor em anticorpos anti-lisozima. Os resultados são expressos em log10 do título em anticorpos.

Estudou-se a resposta humoral de ratos imunizados com estas micropartículas apresentando diferentes densidades de lisozima. A injeção de 100 µg de lisozima em CFA induz uma taxa elevada de anticorpos anti-lisozima (Figura 18). Catorze dias após a imunização, esferas acopladas à maior densidade de lisozima (950 000) induziram uma produção significativa de anticorpos, enquanto as esferas de densidade inferior não estimularam a indução de uma resposta anticorpo anti-lisozima significativa. É de notar, em particular, que as esferas de densidade 210 000, que induziram uma excelente proliferação específica da lisozima, não estimularam a produção de anticorpos.

Estes resultados revelam que a proliferação de células T é induzida com densidades de lisozima variando entre 45 000 e 950 000 moléculas de lisozima por micropartícula, enquanto a produção de anticorpos necessita de uma densidade importante de proteína acoplada às micropartículas.

No contexto da presente descrição, a expressão "micropartículas" designa partículas que podem ter diversas configurações geométricas e espaciais. Na prática, trata-se, preferencialmente, de microesferas ou esferas, tais como as que são obtidas através das técnicas usuais de fabrico dos polímeros.

Lisboa, 26 SET. 2000

Por INSTITUT PASTEUR



ENGº MANUEL MONIZ PEREIRA

Agente Oficial da Propriedade Industrial

Arco da Conceição, 3, 1º - 1100 LISBOA

1/14

FIG. 1

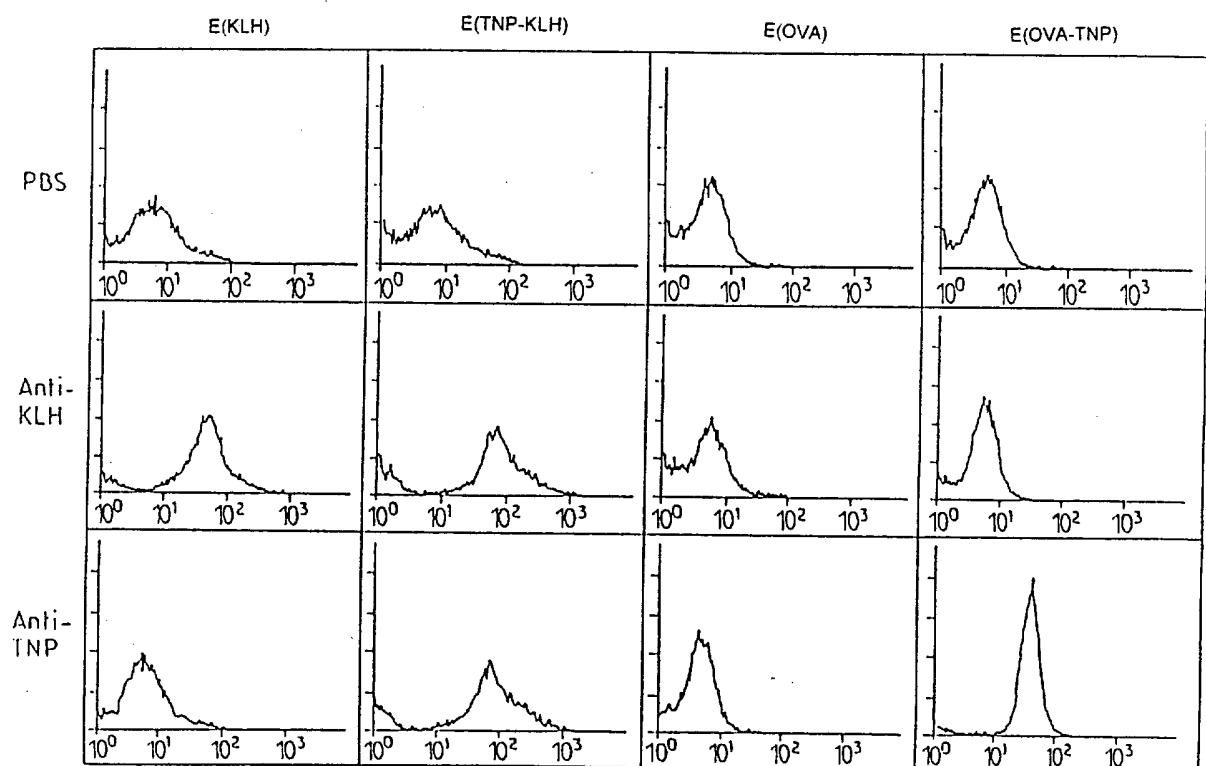


FIG. 2A

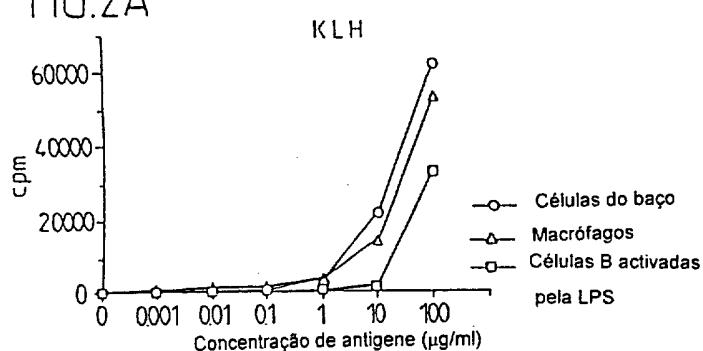


FIG. 2B

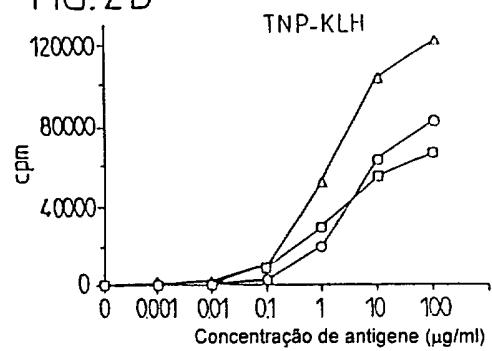


FIG. 2C

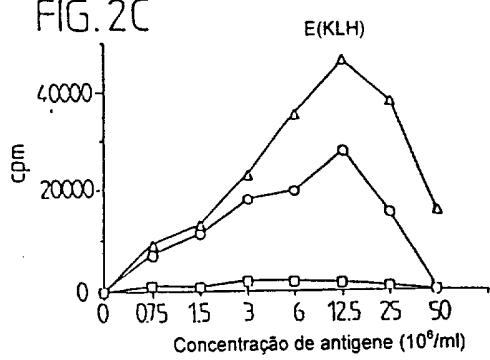


FIG. 2D

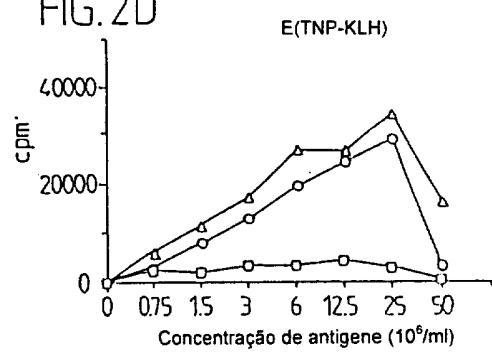


FIG. 3A

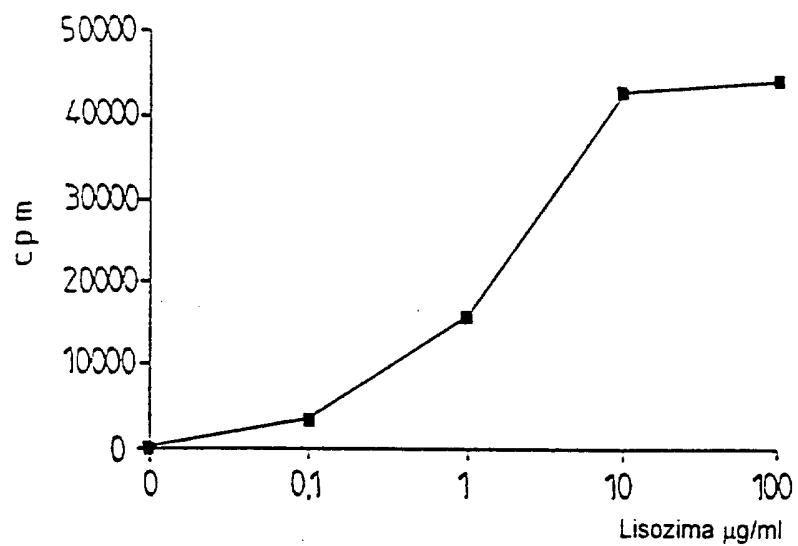
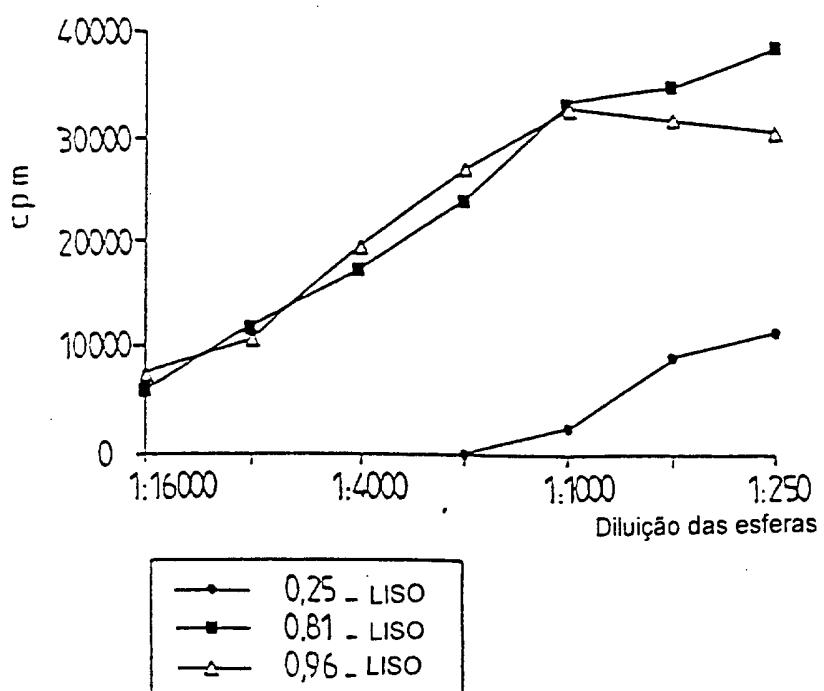


FIG. 3B



4/14

FIG. 4A

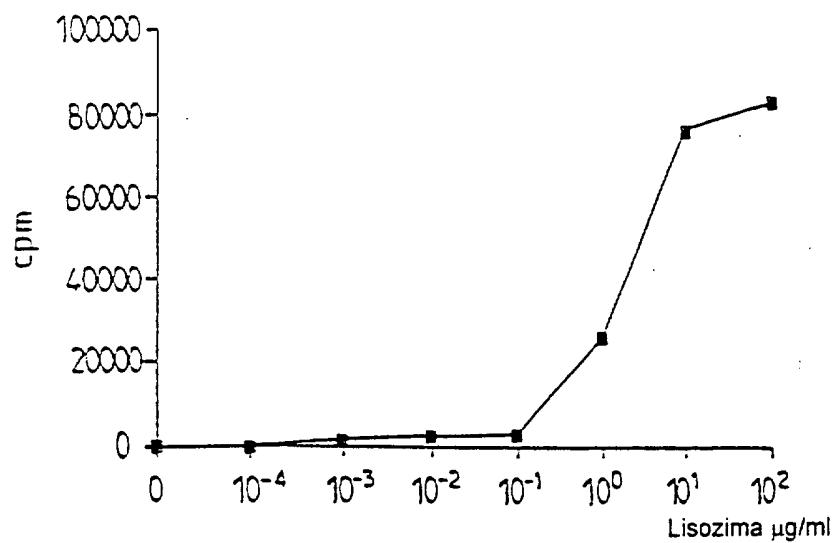
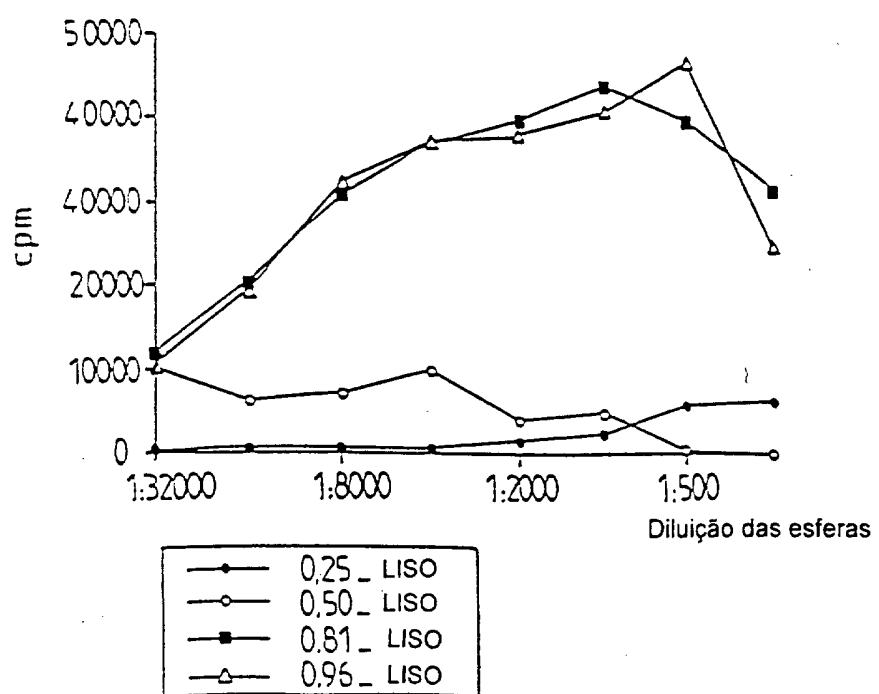


FIG. 4B



5/14

FIG. 5A

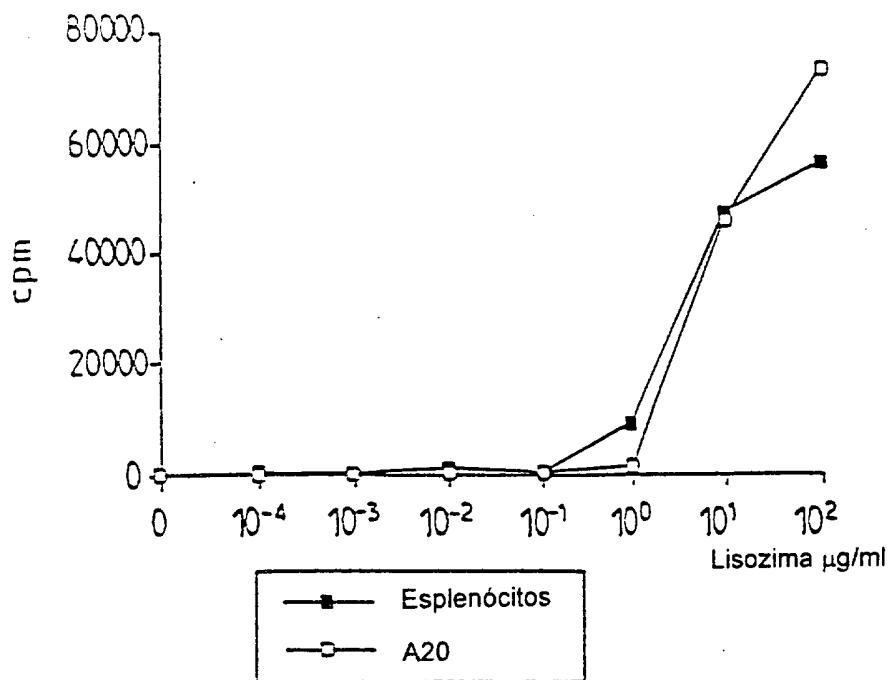
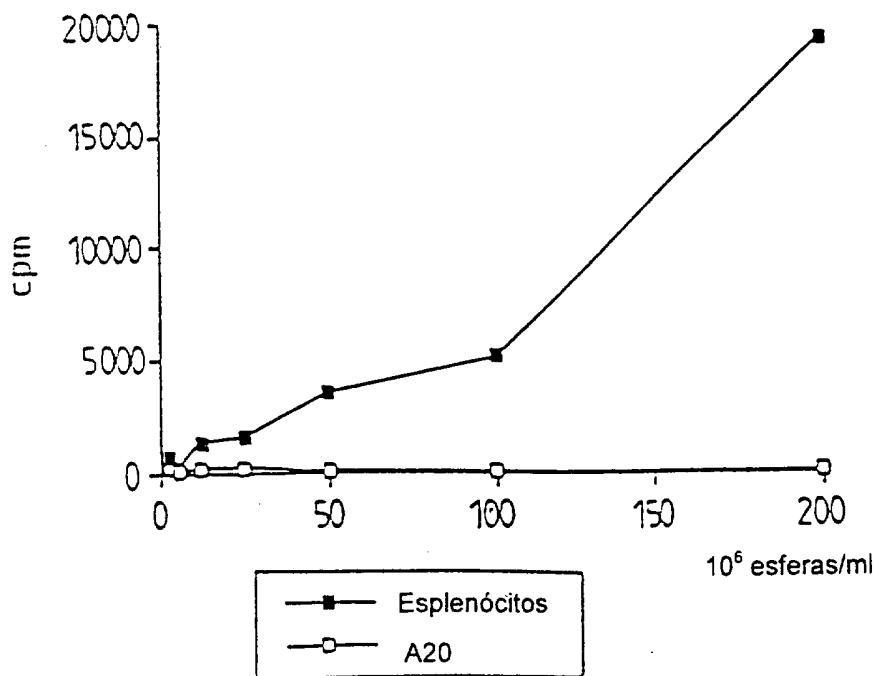


FIG. 5 B



6/14

FIG. 6A

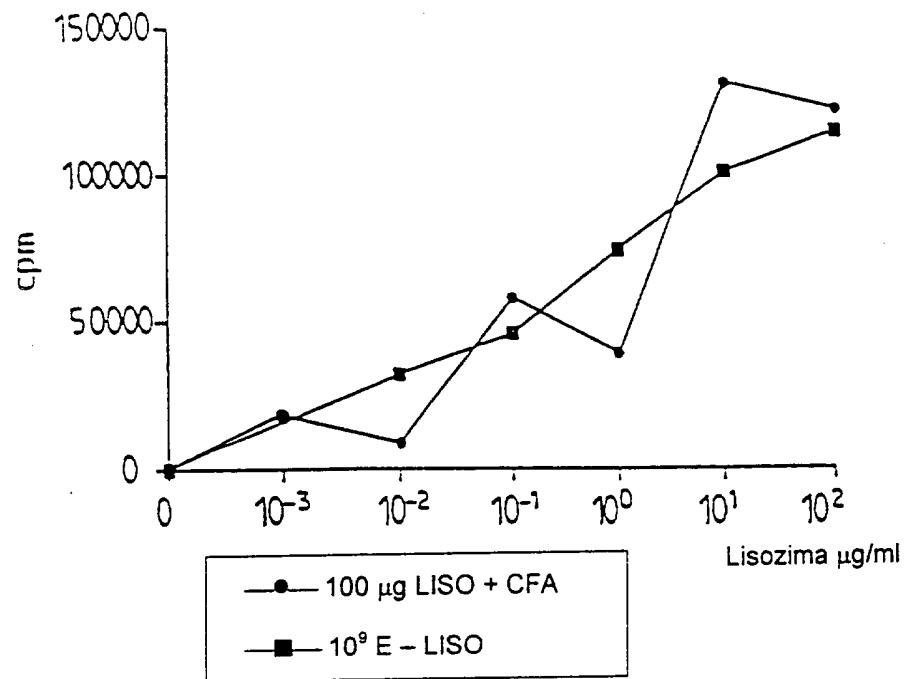
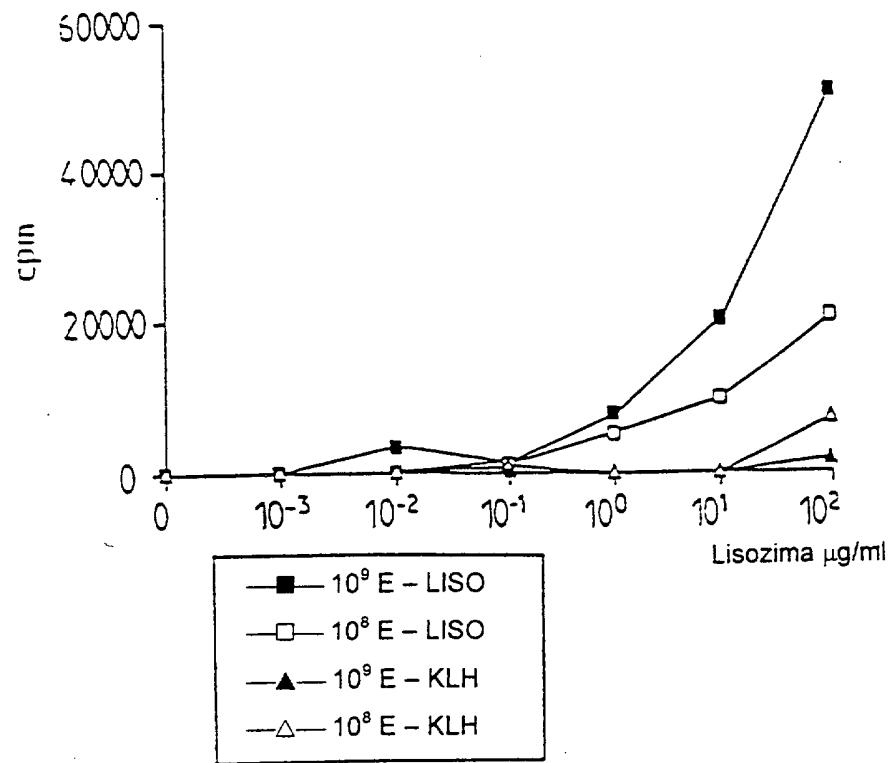


FIG. 6B



7/14

FIG. 7A

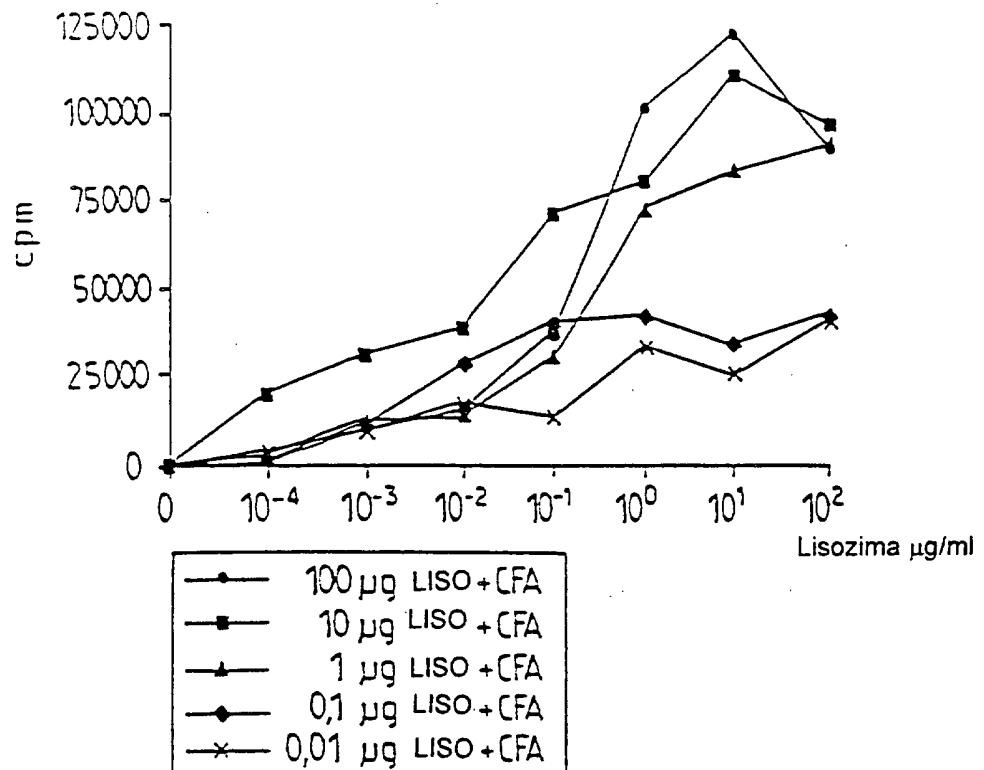
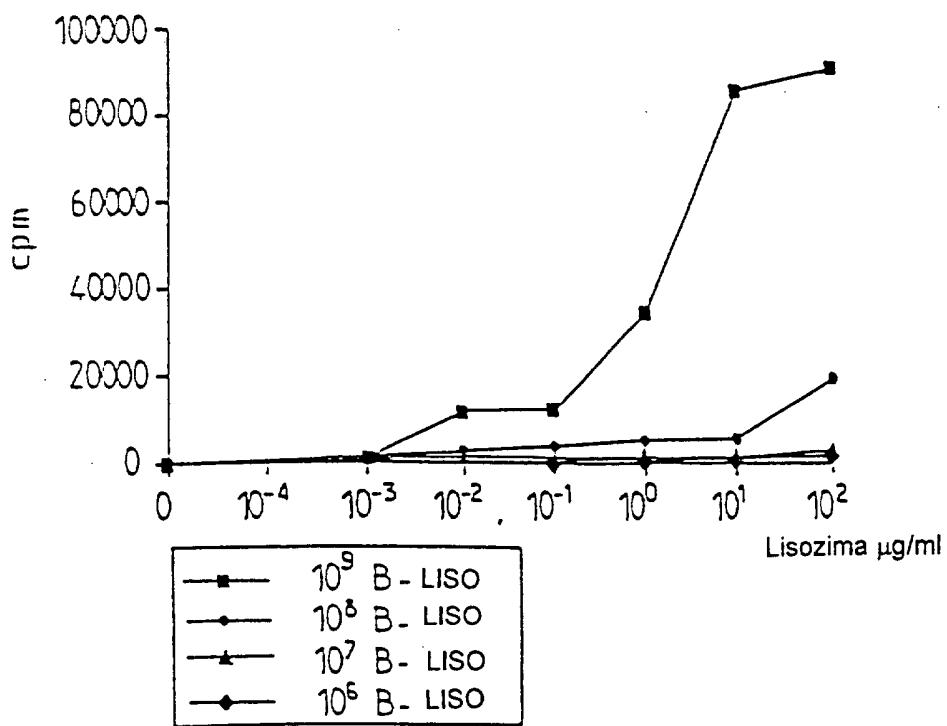


FIG. 7B



8/14

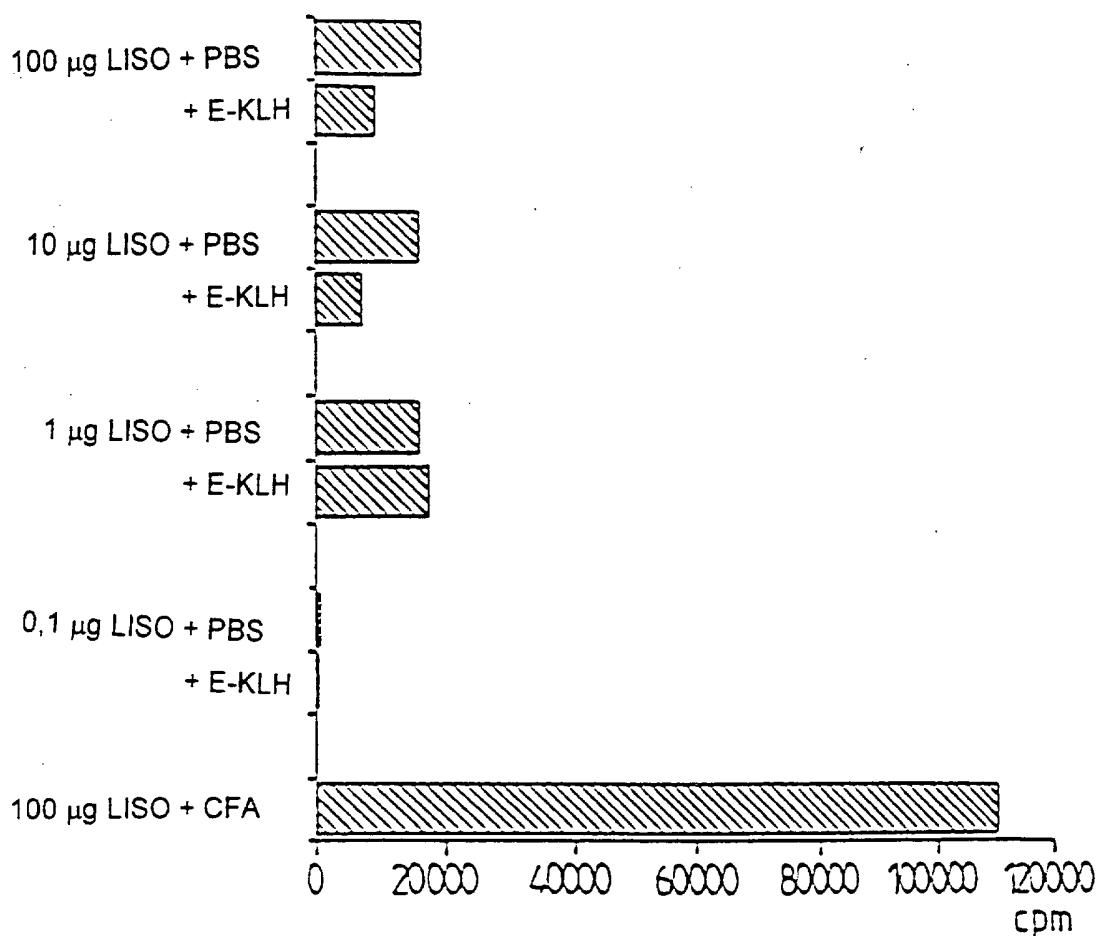


FIG. 8

9/14

FIG.9

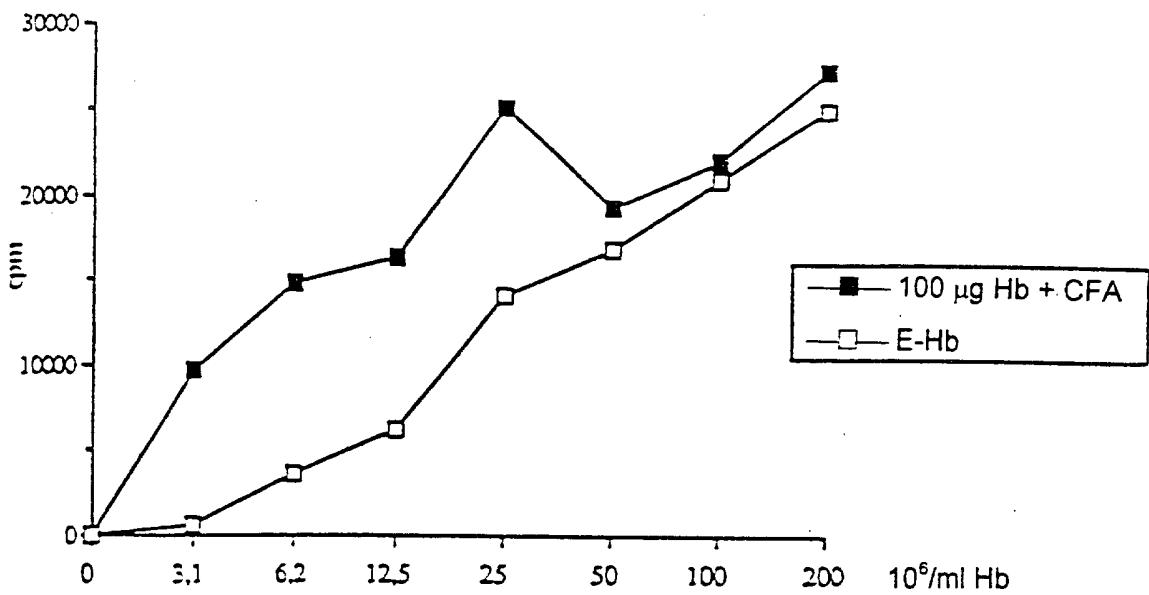


FIG.10

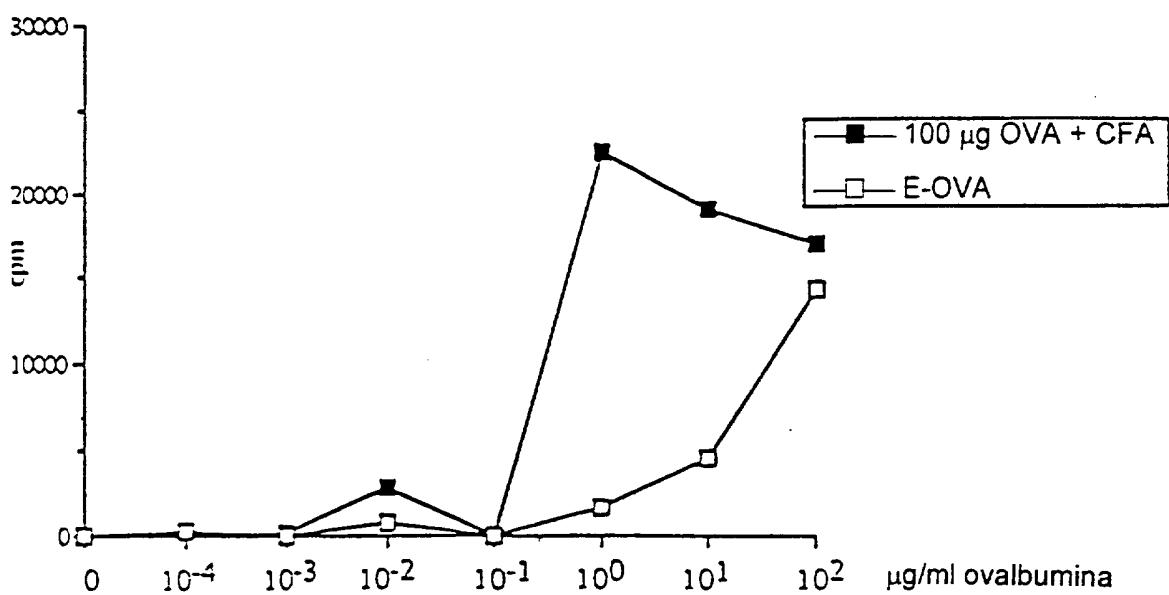


FIG.11

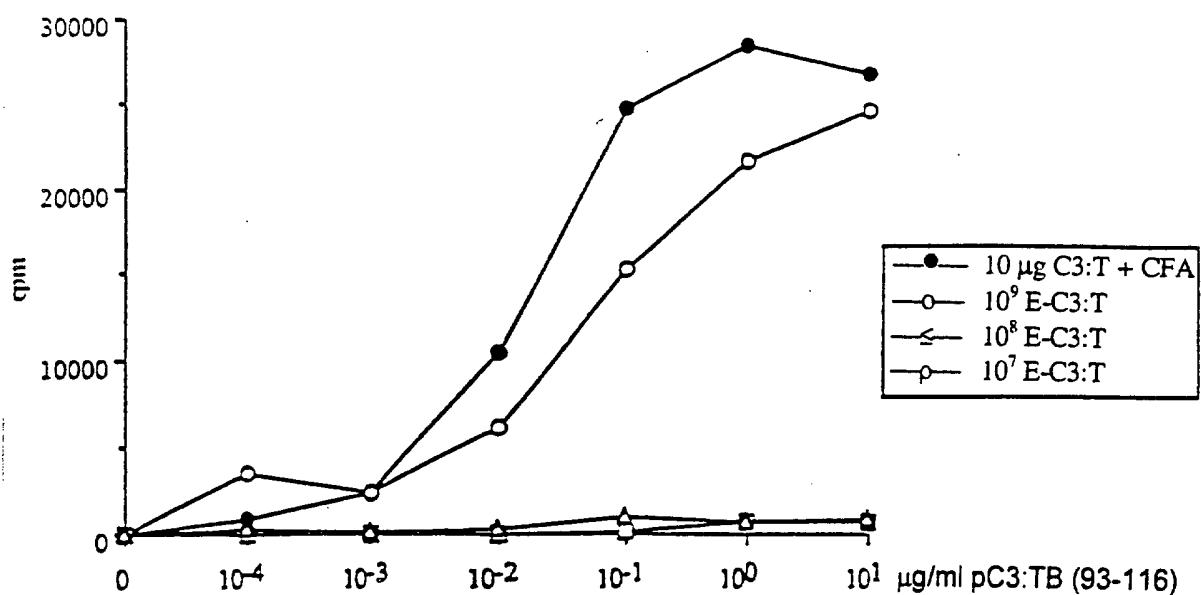
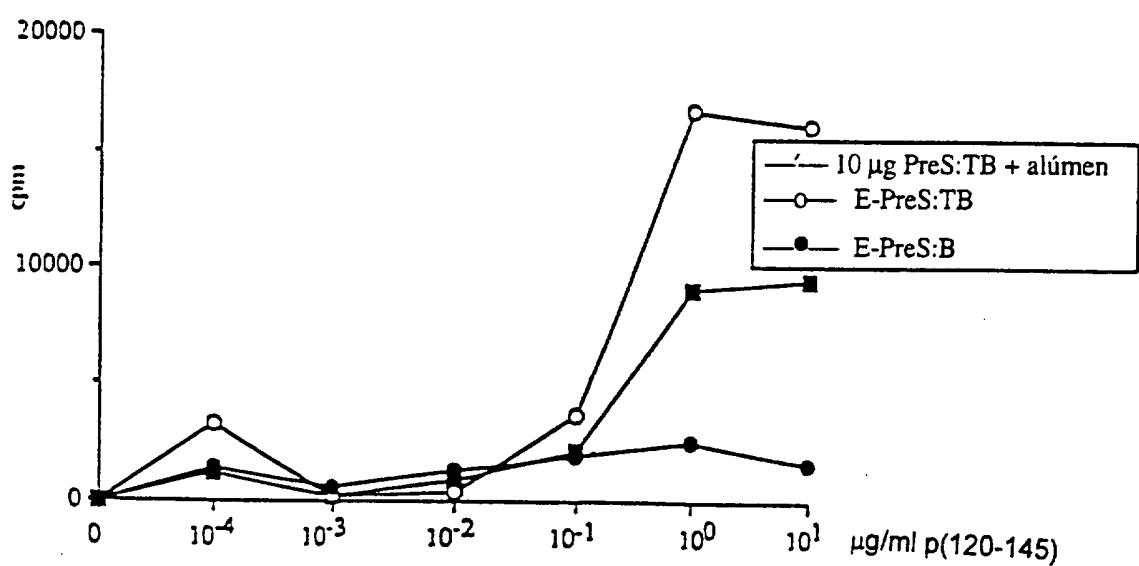


FIG.12



11/14

FIG.13 A

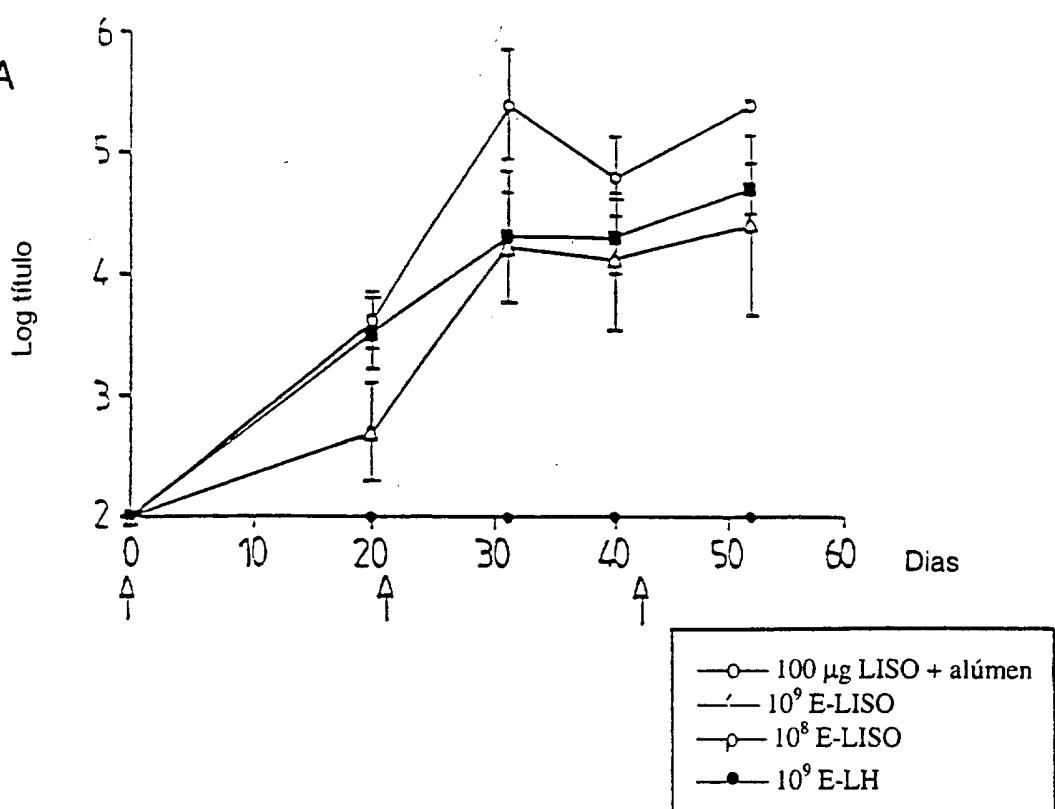
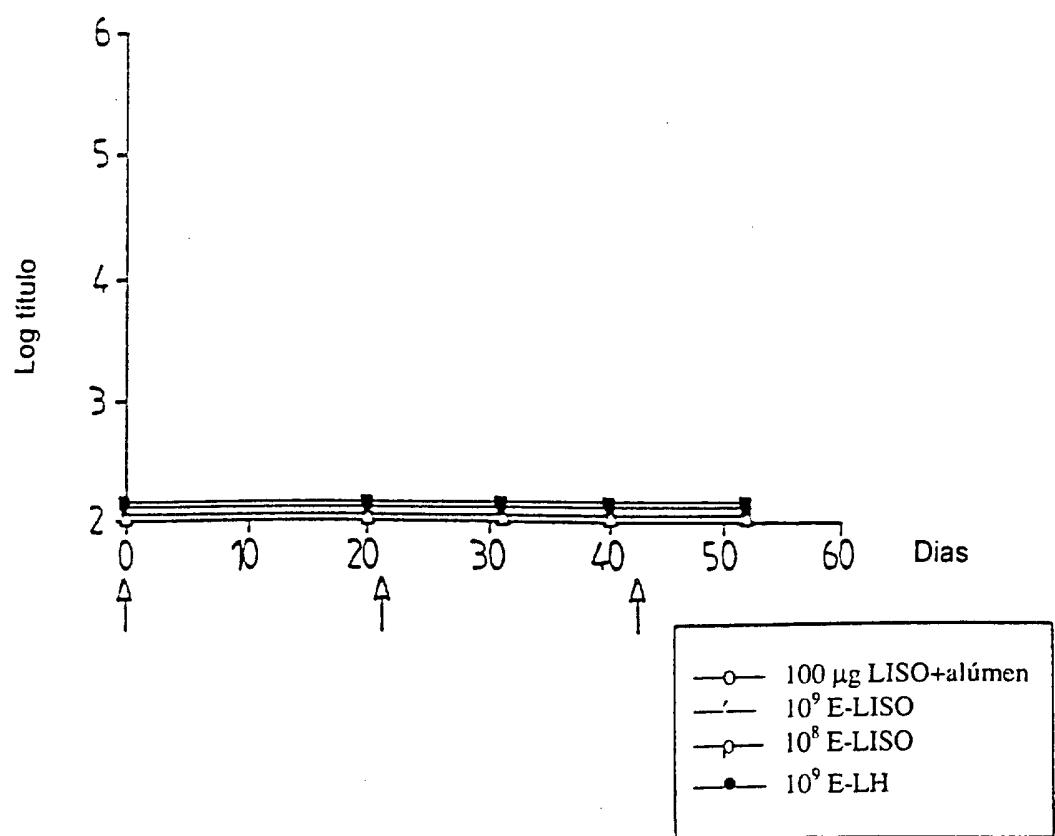


FIG.13B



12/14

FIG.14

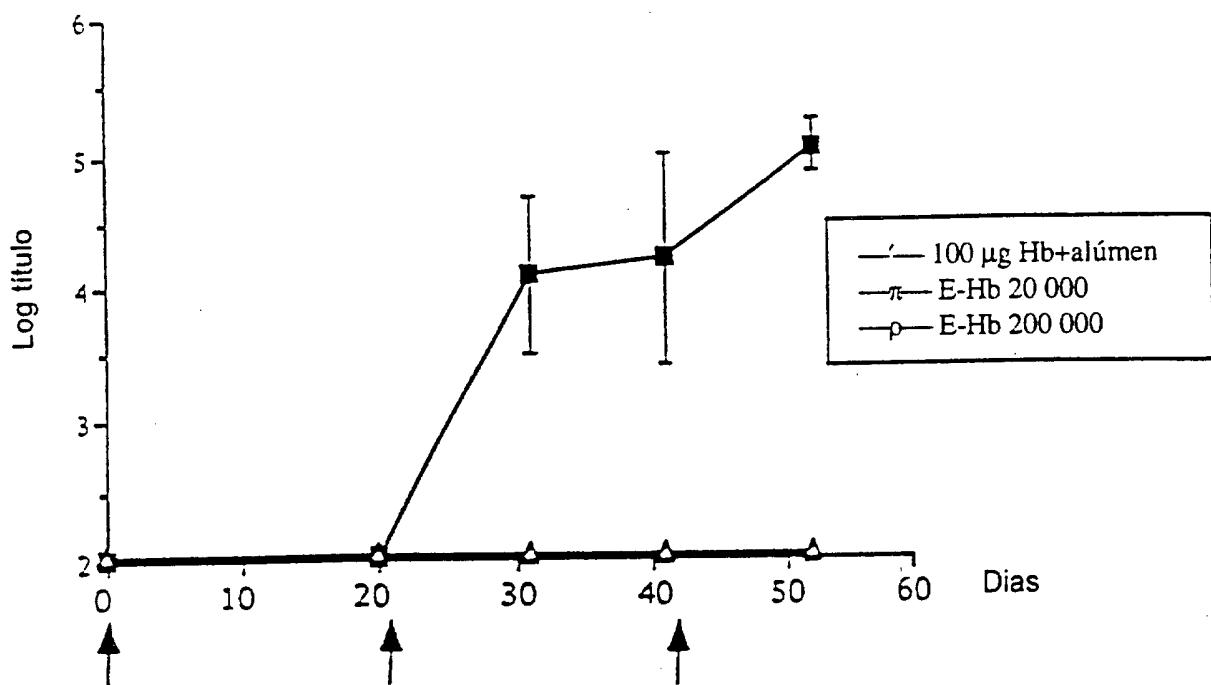
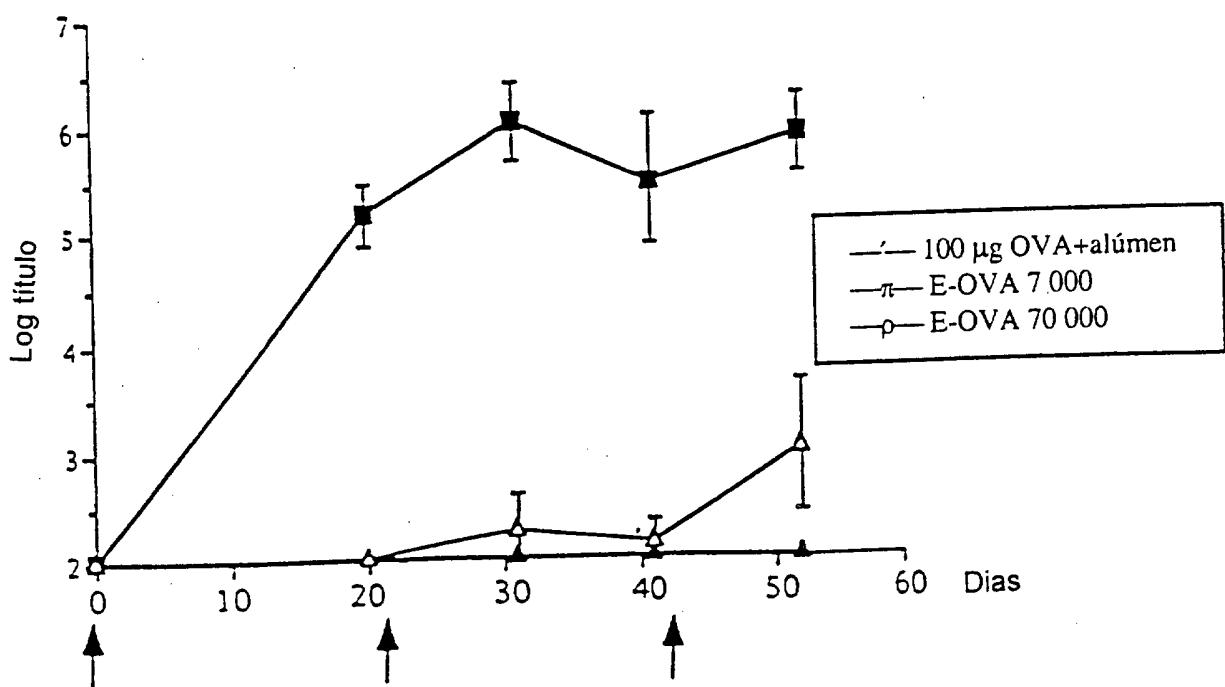


FIG.15



13/14

FIG.17 A

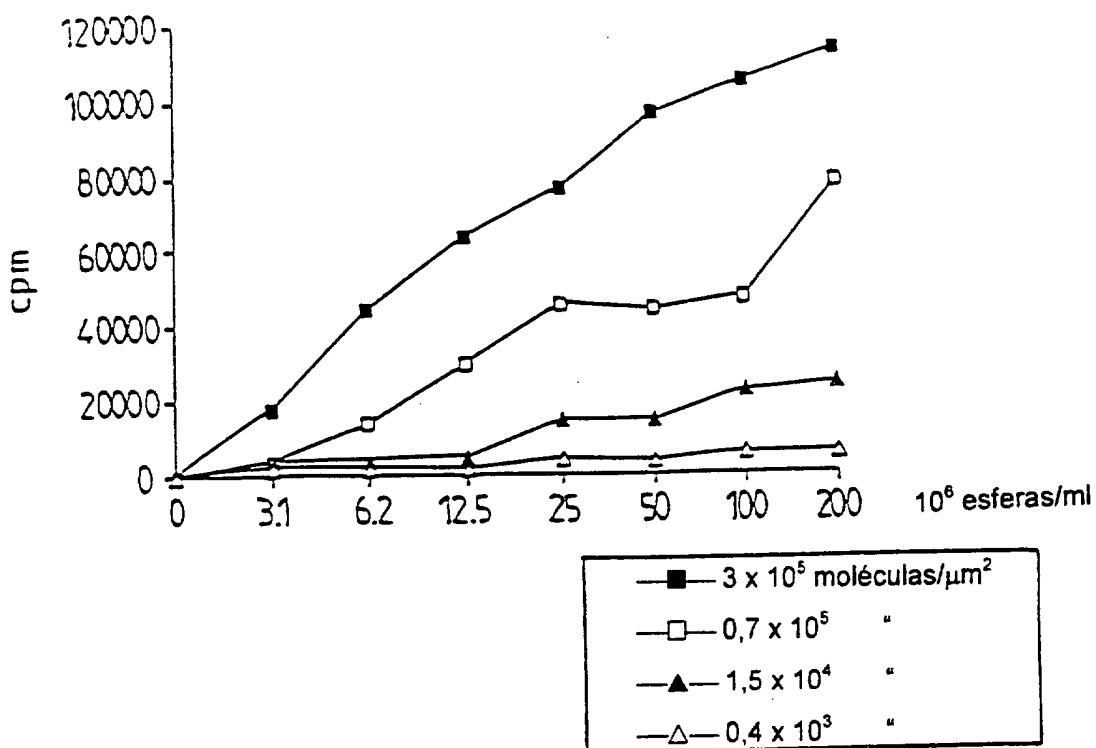
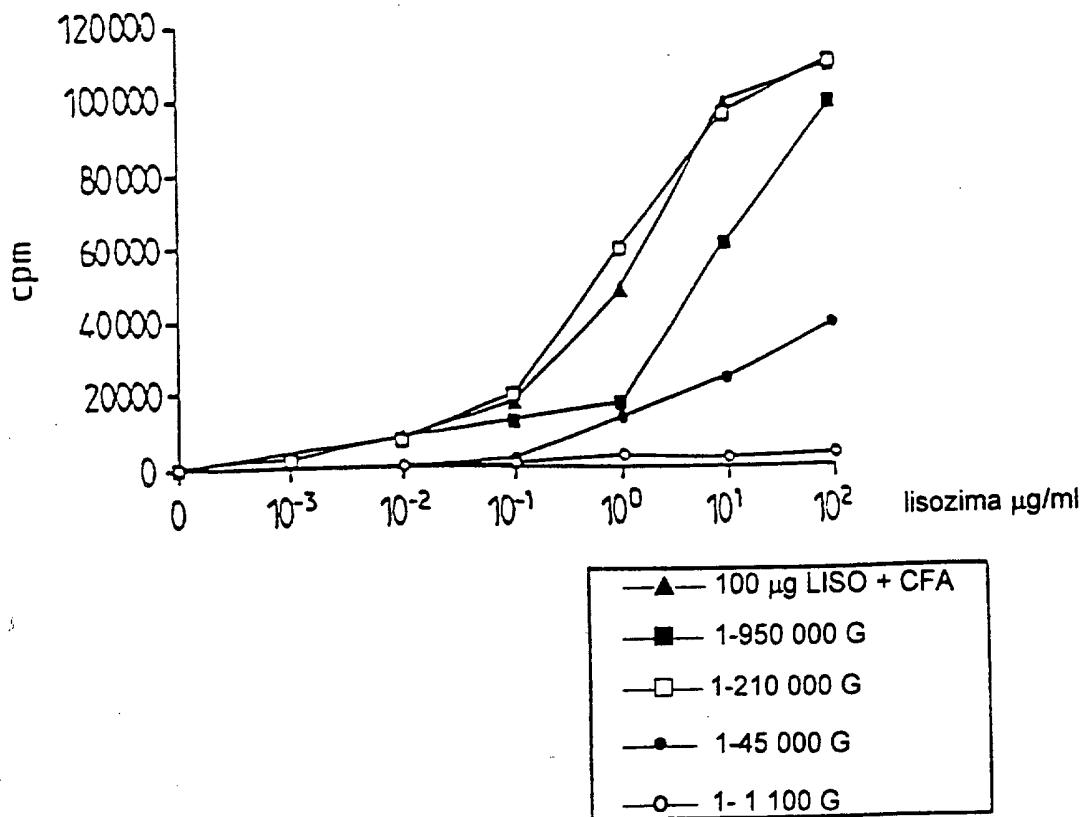


FIG.17 B



14/14

FIG.16

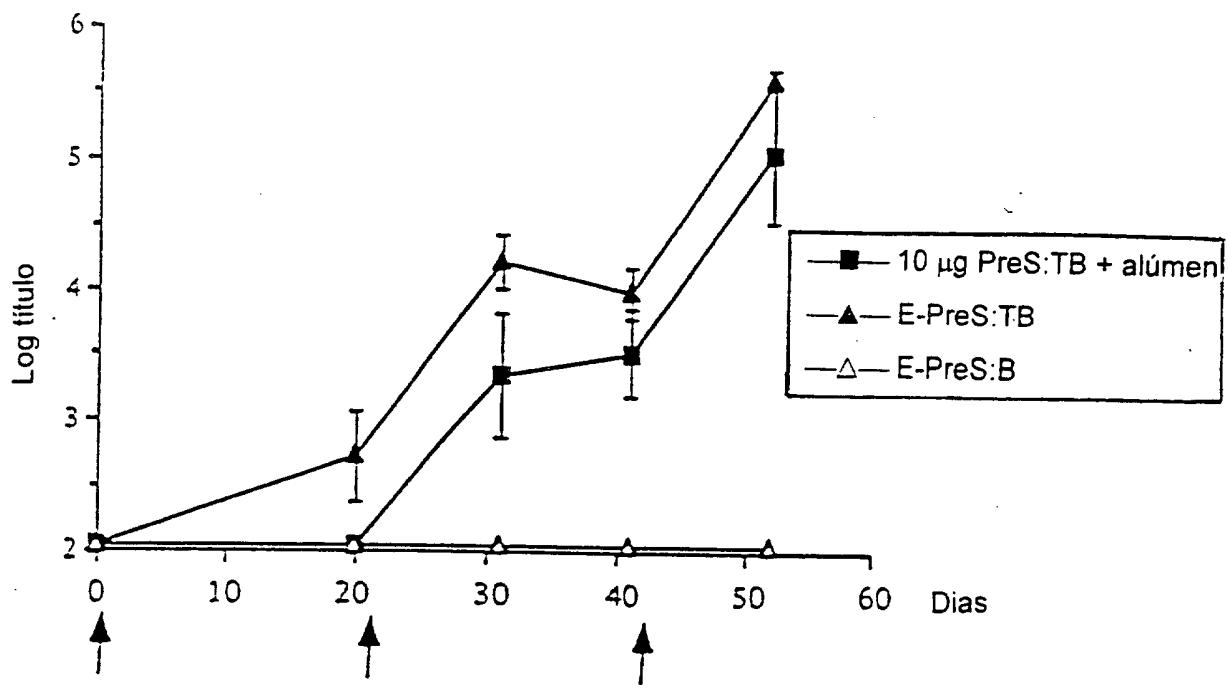
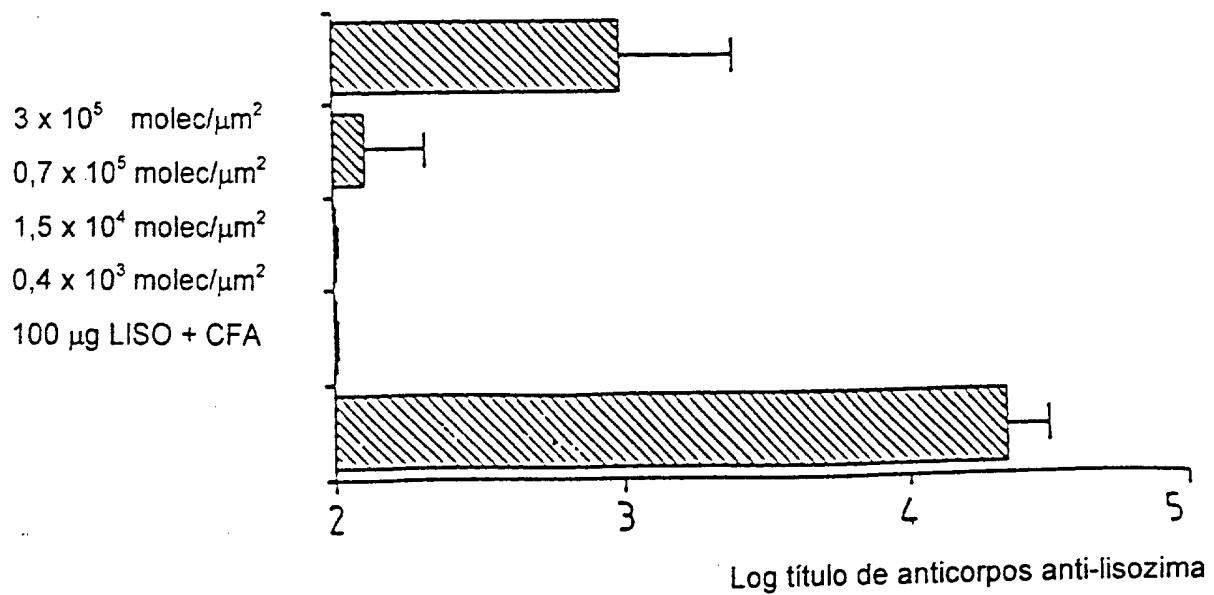


FIG.18



REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de micropartículas, possuindo um diâmetro médio compreendido entre cerca de 0,25 e cerca de 1,5 μm , em material sintético polimérico transportando na superfície uma ou mais proteínas ou péptidos ligados de forma covalente, comportando cada uma da(s) referida(s) proteína(s) ou péptido(s) um ou mais epitopos, para o fabrico de um medicamento ou de uma vacina para a indução de uma resposta imunitária, sendo as densidades da(s) proteína(s) ou péptido(s) na superfície das micropartículas ajustadas a fim de orientar a referida resposta imunitária no sentido da indução de uma resposta humoral e celular ou no sentido da indução de uma resposta maioritariamente celular.
2. Utilização, de acordo com a reivindicação 1, para a indução de uma resposta celular e/ou humoral, caracterizada pelas micropartículas apresentarem uma densidade de cada uma das proteínas ou péptidos que comportam um ou mais epitopos de, no mínimo, 10^5 moléculas/ μm^2 e, preferencialmente, 5×10^5 proteínas/ μm^2 .
3. Utilização, de acordo com a reivindicação 1, para a indução de uma resposta maioritariamente celular, caracterizada pelas micropartículas apresentarem uma densidade de cada uma das proteínas ou péptidos que comportam um ou mais epitopos compreendida entre cerca de 10^4 e 5×10^4 moléculas/ μm^2 .
4. Utilização de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelas micropartículas possuirem um diâmetro médio de 1 μm .
5. Utilização de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pela ligação ser efectuada por reacção das funções NH_2 e/ou CO das proteínas e do material constituinte da micropartícula.
6. Utilização de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pela ligação das proteínas ou dos péptidos e do material constituinte da micropartícula ser covalente e ser efectuada com ou sem agente de ligação.
7. Utilização de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo agente de ligação ser o glutaraldeído ou a carbodiimida.

8. Utilização de acordo com uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo referido material ser um polímero biocompatível.

9. Utilização de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo referido polímero ser a poliacroleína ou o poliestireno, polímeros de ácido láctico ou copolímeros dos ácidos láctico e glicólico.

10. Utilização, de acordo com uma das reivindicações 1 a 9, para o fabrico de um medicamento para terapêutica humana, caracterizada pelo referido polímero ser biodegradável.

11. Utilização, de acordo com uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelas micropartículas transportarem na superfície moléculas susceptíveis de activar o sistema imunitário.

12. Processo para o fabrico de um medicamento ou de uma vacina cuja resposta imunitária é quer maioritariamente humoral, quer maioritariamente celular, sendo o referido processo caracterizado por se fixar de forma covalente nas micropartículas em material sintético polimérico, possuindo um diâmetro médio compreendido entre cerca de 0,25 e cerca de 1,5 μm , pelo menos, uma proteína ou um péptido comportando um ou mais epitopos ou péptidos contendo unicamente epitopos T ou B, ou uma composição dos dois, fazendo variar a densidade da proteína ou do péptido fixo na superfície de acordo com o tipo de resposta desejada.

13. Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por se utilizarem micropartículas como indicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 12.

14. Micropartícula em material sintético polimérico, possuindo um diâmetro médio compreendido entre cerca de 0,25 e cerca de 1,5 μm , transportando na superfície uma ou mais proteínas ou péptidos ligados de forma covalente ao material constituinte da micropartícula, comportando cada uma da(s) referida(s) proteína(s) ou péptido(s) um ou mais epitopos e estando presentes com densidades compreendidas entre 10^4 e 5×10^5 proteínas/ μm^2 para cada uma das proteínas.

15. Micropartícula de acordo com a reivindicação 14, caracterizada por possuir um diâmetro médio de 1 µm.

16. Micropartícula de acordo com uma das reivindicações 14 e 15, caracterizada pela ligação ser efectuada por reacção das funções NH₂ e/ou CO das proteínas e do material constituinte da micropartícula.

17. Micropartícula de acordo com uma das reivindicações 14 e 15, caracterizada pela ligação das proteínas ou péptidos e do material constituinte da micropartícula ser efectuada por intermédio de um agente de ligação.

18. Micropartícula de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo agente de ligação ser o glutaraldeído ou a carbodiimida.

19. Micropartícula de acordo com uma das reivindicações 14 a 18, caracterizada por ser composta por um polímero biocompatível.

20. Micropartícula de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo referido polímero ser a poliacroleína ou o poliestireno, um polímero de ácido láctico ou um copolímero de ácido láctico e glicólico.

21. Micropartícula de acordo com a reivindicação 19, para a aplicação em terapêutica humana, caracterizada pelo referido polímero ser biodegradável.

22. Micropartícula de acordo com uma das reivindicações 14 a 21, caracterizada por transportar na superfície moléculas susceptíveis de activar o sistema imunitário.

23. Micropartícula de acordo com uma das reivindicações 14 a 22, caracterizada pela referida proteína ou péptido compreender o epitopo B da região pré-s₂ do antígeno HBs do vírus da hepatite viral.

24. Micropartícula de acordo com uma das reivindicações 14 a 22, caracterizada pela referida proteína ou péptido compreender o epitopo B da proteína VP1 do vírus da poliomielite.

25. Micropartícula de acordo com uma das reivindicações 14 a 22, caracterizada pela referida proteína ou péptido compreender o epitopo B da proteína gp 120 do vírus HIV-1.

26. Medicamento ou vacina caracterizado por compreender micropartículas de acordo com uma das reivindicações 14 a 25.

27. Composição farmacêutica caracterizada por compreender micropartículas, de acordo com uma das reivindicações 14 a 25, em associação com diluentes e adjuvantes farmaceuticamente compatíveis.

Lisboa, 26 SET. 2000

Por INSTITUT PASTEUR



ENGº MANUEL MONIZ PEREIRA

Agente Oficial da Propriedade Industrial

Arco da Conceição, 3, 1º - 1100 LISBOA

RESUMO

MICROPARTÍCULAS TRANSPORTANDO ANTIGENES E A SUA UTILIZAÇÃO PARA A INDUÇÃO DE RESPOSTAS HUMORAIS OU CELULARES

Utilização de micropartículas em material sintético polimérico, transportando na superfície uma ou mais proteínas ligadas de forma covalente e capazes de comportar um ou mais epitopos, para a indução de uma resposta imunitária, sendo as densidades da(s) proteína(s) na superfície da micropartícula, assim como o(s) seu(s) peso(s) molecular(es) ajustados a fim de orientar a resposta imunitária no sentido da indução de uma resposta humoral e celular ou no sentido da indução de uma resposta maioritariamente celular. As micropartículas possuem um diâmetro médio compreendido entre cerca de 0,25 e cerca de 1,5 μm .