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

(11) PI 0820960-0 B1

(22) Data do Depósito: 05/12/2008

(45) Data de Concessão: 07/04/2020

(54) Título: COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E USO DA COMPOSIÇÃO

(51) Int.Cl.: A61K 31/35; A61K 39/39; C07D 309/10; C07H 5/06; A61P 37/04.

(30) Prioridade Unionista: 05/12/2007 US 60/992460.

(73) Titular(es): ABIVAX.

(72) Inventor(es): VINCENT SERRA.

(86) Pedido PCT: PCT IB2008003945 de 05/12/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/101475 de 20/08/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 04/06/2010

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E USO DA COMPOSIÇÃO São aqui fornecidas composições compreendendo o composto da fórmula. Também fornecidos são métodos de melhorar uma resposta imune de um indivíduo a um antígeno administrando o antígeno e a composição. A melhor resposta imune pode ser uma resposta imune humoral, uma resposta de célula T CD4+, uma resposta de célula T CD8+ ou resultar na ativação de células que apresentam antígeno. Métodos de melhorar a resposta imune por administração intramuscular de um antígeno e a composição incluindo o composto da fórmula I também são fornecidos.

“COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E USO DA COMPOSIÇÃO”

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADOS

[0001] Este pedido de patente reivindica prioridade para o pedido de patente provisório U.S. N° de série 60/992.460 depositado em 5 de dezembro de 2007, que está aqui incorporado pela referência na íntegra.

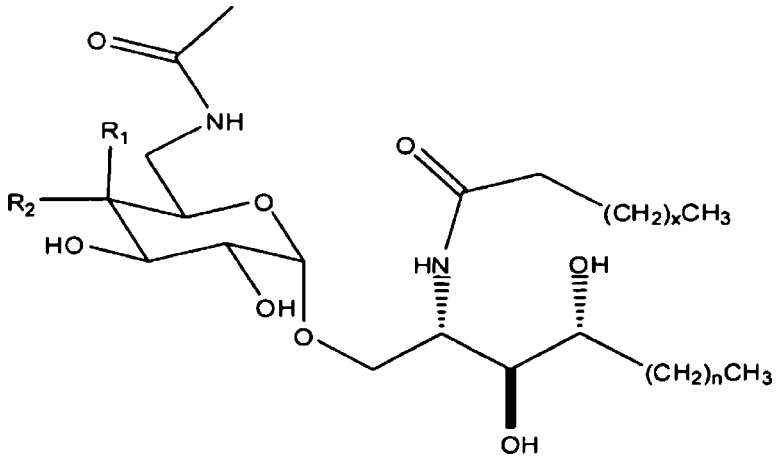
INTRODUÇÃO

[0002] O propósito fundamental de uma vacina é fornecer imunidade duradoura contra uma condição patológica. Idealmente, vacinas fornecem anticorpos funcionalmente ativos, trazem à tona imunidade mediada por célula, e ativam linfócitos T e B com reatividade altamente específica, bem como “memória” para fornecer proteção contra contatos adicionais com antígeno.

[0003] Adjuvantes são aditivos de vacina que não especificamente aumentam a resposta imune. Os mecanismos pelos quais adjuvantes melhoram o sistema imune variam amplamente. Adjuvantes podem ser classificados como sistemas “imunomodulatórios” ou de “distribuição de antígeno”. Adjuvantes imunomodulatórios iniciam o sistema imune regulando a ação de células imunes por meio da alteração da produção de linfocina. Sistemas de distribuição de antígeno, por outro lado, funcionam para distribuir o antígeno nas células imunes apropriadas. Além do mais, adjuvantes podem melhorar a velocidade ou duração de uma resposta imune, modular a distribuição da atividade, especificidade, isotipo ou subclasse do anticorpo, estimular imunidade mediada por célula, promover a imunidade da mucosa ou melhorar as respostas imunes em indivíduos imunologicamente imaturos ou idosos. Adjuvantes podem afetar a resposta imune inata, humoral ou mediada por célula ou uma combinação destes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0004] Verificou-se que um glicolipídeo sintético de uma classe particular quando usado em combinação com uma preparação de vacina é capaz de ativar respostas imunes tanto humoral quanto celular quando administrado a um indivíduo. Desta forma, a invenção fornece composições compreendendo compostos da fórmula I, em que a fórmula I é mostrada a seguir:



(I)

[0005] onde R_1 e R_2 são independentemente selecionados de — H ou -OH, x é um número inteiro de 18 a 26 e n é um número inteiro de 10 a 15. Composições incluindo o composto da fórmula I e um antígeno também são fornecidas.

[0006] Em um outro aspecto, a invenção fornece métodos de melhorar a resposta imune em um indivíduo a um antígeno administrando uma composição incluindo o composto da fórmula I e um antígeno. A melhor resposta imune pode ser uma resposta imune humoral, uma resposta de célula T CD4+, uma resposta de célula T citotóxica CD8+ ou ativação de células que apresentam antígeno (APCs). A resposta imune do indivíduo é melhorada com relação a um controle apropriado.

[0007] Em um aspecto adicional, as composições da invenção são administradas intramuscularmente.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0008] FIGURA 1 é um gráfico que apresenta a porcentagem de lise específica de células alvo específicas para Ova no sangue de camundongos injetados intravenosamente (IV) com PBS-96, PBS-14 ou PBS-I I, com ou sem Ova.

[0009] FIGURA 2 é um gráfico que apresenta a porcentagem de lise específica de células alvo específicas para Ova no sangue de camundongos injetados IV com αGalCer, PBS-57, PBS-96 ou PBS-14, com ou sem Ova.

[0010] FIGURA 3 é um gráfico que apresenta a lise específica de células alvo específicas para Ova no sangue de camundongos injetados intramuscularmente (IM) com αGalCer, PBS-57, PBS-96 ou PBS-14, com ou sem Ova.

[0011] FIGURA 4A é um gráfico que apresenta acúmulo de IFNγ no soro de camundongos 24 horas depois da inoculação com concentrações variadas de PBS-57.

[0012] FIGURA 4B é um gráfico que apresenta acúmulo de IFNγ no soro de camundongos 24 horas depois da inoculação com concentrações variadas de PBS-14.

[0013] FIGURA 4C é um gráfico que apresenta acúmulo de IFNγ no soro de camundongos 24 horas depois da inoculação com concentrações variadas de PBS-96.

[0014] FIGURA 4D é um gráfico que apresenta acúmulo de IFNγ no soro de camundongos 24 horas depois da inoculação com concentrações variadas de αGalCer.

[0015] FIGURA 5 é um gráfico que compara acúmulo de IFNγ no soro de camundongos 24 horas depois da inoculação com 100 ng de PBS-57, PBS-96, PBS-14 ou PBS-11.

[0016] FIGURA 6 é um gráfico que apresenta lise específica de células alvo específicas para Ova no sangue de camundongos injetados IV com PBS-11, PBS-57, PBS-96 ou PBS-14, com ou sem Ova.

[0017] FIGURA 7 é um gráfico que mostra lise específica de células alvo específicas de OVA em camundongos injetados IM com 100 ng do adjuvante indicado, com ou sem OVA.

[0018] FIGURA 8 é um gráfico que mostra lise específica de células alvo específicas de OVA em camundongos injetados IM com 10 ng do adjuvante indicado, com ou sem OVA.

[0019] FIGURA 9 é um gráfico que mostra porcentagens de células T CD8+ responsivas ao pentâmero SIINFEKL em camundongos injetados IM com 1 μg do adjuvante indicado, com ou sem OVA.

[0020] FIGURA 10 é um gráfico que mostra porcentagens de células T CD8+ responsivas ao pentâmero SIINFEKL em camundongos injetados IM com 100 ng do adjuvante indicado, com ou sem OVA.

[0021] FIGURA 11 é um gráfico que mostra titulações de IgGl no sangue de camundongos injetados IM com 100 ng do adjuvante indicado, com ou sem OVA.

[0022] FIGURA 12 é um gráfico que mostra titulações de IgG2a no sangue de camundongos injetados IM com 100 ng do adjuvante indicado, com ou sem OVA.

[0023] FIGURA 13 apresenta fórmulas estruturais para PBS-14, PBS-96, PBS-I l, PBS-57 e αGalCer.

DESCRIÇÃO DETALHADA DE VÁRIAS MODALIDADES

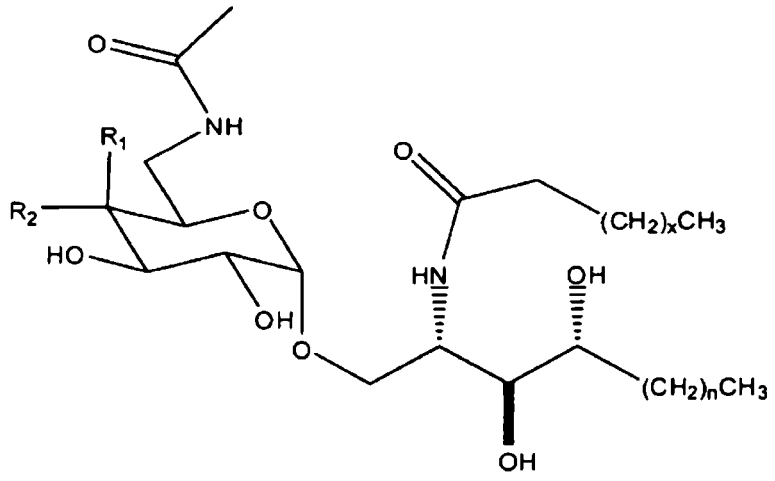
[0024] Adjuvantes melhoram a imunogenicidade de antígenos na preparação de vacinas de uma variedade de maneiras. Um adjuvante efetivo também pode ser usado para combinação com uma ampla variedade de antígenos para melhorar a resposta imune trazida à tona pela administração do antígeno. Por exemplo, no caso de toxinas, uma boa resposta imune humoral é requerida. No caso de bactérias intracelulares, uma resposta mediada por célula, mediada principalmente por células T citotóxicas e células ThI, é importante. No caso de infecções virais, respostas tanto humoral quanto celular são fundamentais para controlar a infecção. A capacidade de um adjuvante de melhorar não somente a resposta imune humoral, mas também a mediada por célula aumenta a probabilidade de desenvolver imunidade de longa duração.

[0025] Espécies de lipídeo foram investigadas para propriedades de adjuvantes. Inúmeras moléculas de lipídeo natural e sintético são processadas por células que apresentam antígeno e apresentadas por moléculas CDI a células NKT. O composto protótipo usado para estudar ativação de célula NKT in vitro e in vivo é KRN7000, uma α-galactosiceramida ("αGalCer") derivada de esponja marinha Agelas mauritianus. Compostos adicionais recentemente identificados incluem isoglobotriexosilceramida ("iGB3") que é um glicolipídeo endógeno e deoxigalactosiyceramidas 6"amino 6" modificadas, da forma descrita no pedido de patente PCT/US07/66250, cuja descrição está aqui incorporada pela referência. Estes compostos ativam células NKT e sobre-regulam respostas da citocina in vitro. Entretanto, no contexto de vacinações in vivo, pouco se sabe com relação à efetividade do efeito de adjuvante do lipídeo para estes compostos.

[0026] Observou-se que glicoesfingolipídeos da fórmula I contendo um grupo

amino e uma cadeia de ácido graxo saturada, inesperadamente têm a capacidade de estimular tanto uma resposta imune mediada por célula quanto humoral in vivo. Além do mais, compostos da fórmula I são capazes de estimular uma resposta imune contra um antígeno nominal fraco para produzir anticorpos e simultaneamente fornecer lise mediada por célula de células que expressam antígenos de superfície específicos. Dois compostos da fórmula I, designados PBS-96 e PBS-14, mostraram estimular respostas imunes tanto mediadas por célula quanto humorais in vivo. Estes compostos também estimularam uma resposta imune contra um antígeno nominal fraco para produzir anticorpos e trazer à tona uma resposta mediada por célula. Além do mais, observou-se que estes compostos estimulam uma resposta mais robusta quando injetados intramuscularmente ou em dosagens mais baixas comparado a outros glicosingolipídeos, tais como PBS-57 e αGalCer.

[0027] Em uma modalidade, a invenção fornece uma composição compreendendo um composto da fórmula I, onde a fórmula I é:



(I)

[0028] onde R_1 e R_2 são independentemente selecionados de -H ou -OH, x é um número inteiro de 18 a 26 e n é um número inteiro de 10 a 15. Compostos da fórmula I adequadamente têm um grupo amida na posição C6 da molécula de galactose ou glicose e uma cadeia de acila saturada na porção ceramida do composto. A composição ainda pode incluir um carreador fisiologicamente aceitável. Um carreador "fisiologicamente aceitável" é qualquer carreador que é adequado para administração in vivo (por exemplo, administração oral, transdérmica ou parenteral) ou uso in vitro,

isto é, cultura celular. Carreadores fisiologicamente aceitáveis adequados para administração in vivo incluem água, soluções tamponadas e soluções de glicose, entre outros. Componentes adicionais das composições podem incluir excipientes, tais como estabilizantes, conservantes, diluentes, emulsificantes ou lubrificantes além do carreador fisiologicamente aceitável.

[0029] Excipientes adequados incluem, mas sem limitações, Tween 20, DMSO, sacarose, L-histadina, polissorbato 20 e soro. Adequadamente o composto da fórmula I é formulado em um lipossoma.

[0030] Adequadamente o lipossoma é um tipo de SUV composto de fosfatidil colina (PC)/fosfatidil glicerol (PG)/Colesterol em uma razão de 8 µ moles/2 µ moles/5 µ moles/1 mg. Versados na tecnologia perceberão que o composto da fórmula I pode ser formulado de uma variedade de maneiras para administração a um indivíduo.

[0031] Em uma outra modalidade, a invenção fornece métodos de melhorar uma resposta imune a um antígeno em um indivíduo administrando uma composição contendo o composto da fórmula I e o antígeno. Da forma aqui usada, um "indivíduo" é um mamífero, por exemplo, um camundongo, ou mais adequadamente um humano. "Melhorar a resposta imune" refere-se à capacidade do composto de melhorar a resposta imune humoral e/ou mediada pela célula de um indivíduo ao antígeno com relação a um controle adequado. Maior ativação de células que apresentam antígeno também está incluída como uma melhor resposta imune do indivíduo. Para o propósito de determinar se a resposta imune é melhor com relação ao um controle, uma comparação quantitativa do sinal em uma amostra de um indivíduo vacinado com antígeno e o composto pode ser comparada ao sinal em uma amostra de um indivíduo vacinado com antígeno sozinho. A resposta imune a o antígeno podem ser medidos de uma variedade de maneiras que serão evidentes pelos versados na tecnologia. Nos exemplos, a resposta imune é medida a título de um ensaio de lise celular específico citotóxico, um ensaio de ligação ao pentâmero, ou um ensaio ELISA, o desempenho que é rotina para os versados na tecnologia.

[0032] Em modalidades particulares, a resposta imune é melhorada pelo menos 25 %, pelo menos 30 %, pelo menos 50 %, pelo menos 60 %, pelo menos 65 %, pelo

menos 70 %, pelo menos 75 %, pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 100 %, pelo menos 150 %, pelo menos 200 %, pelo menos 400 %, pelo menos 500 %, pelo menos 750 % ou pelo menos 1000 %, com relação a um controle adequado. Um controle adequado é um indivíduo que foi administrado com um antígeno, mas não uma composição da invenção. Porcentagem de melhora pode ser calculada usando a seguinte fórmula:

[0033] [(valor que representa a resposta imune do indivíduo depois do tratamento com composição contendo o composto da fórmula I) - (valor que representa resposta imune de controle)/(valor que representa resposta imune do indivíduo depois do tratamento com composição contendo o composto da fórmula I)] x 100.

[0034] Da forma aqui usada, os termos “administração”, “co-administração” e “coadministrando” referem-se à administração do adjuvante e o antígeno concorrentemente, isto é, simultaneamente no tempo ou sequencialmente, isto é, administração do adjuvante seguido pela administração do antígeno, ou administração do antígeno seguido pela administração do adjuvante. Depois da administração do adjuvante ou antígeno, o outro componente pode ser administrado substancialmente imediatamente daí em diante ou depois de um período de tempo efetivo daí em diante; o período de tempo efetivo é a quantidade de tempo dada para realização de benefício máximo da administração dos componentes. Alternativamente, o adjuvante e antígeno podem ser co-formulados.

[0035] O antígeno pode ser um polipeptídeo, polinucleotídeo, ou fração de carboidrato, ou combinações destes, por exemplo, uma glicoproteína. O antígeno é adequadamente derivado de um agente infeccioso (por exemplo, um microrganismo patogênico), um tumor, uma molécula endógena (por exemplo, um “auto molécula) ou, para propósitos de estudo, um antígeno nominal, tal como ovalbumina (aqui referida como “OVA”). Adequadamente o antígeno está englobado em uma vacina. Composições de vacina são adequadamente formuladas para incluir o composto da fórmula I. “Vacina” refere-se a uma composição que, quando administradas a um indivíduo, induz respostas imunes celulares ou humorais. Composições farmacêuticas usadas em conjunto com a invenção adequadamente incluem o composto da fórmula

I e uma vacina. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas usadas em conjunto com a invenção adequadamente incluem PBS-96 e um antígeno ou PBS- 14 e um antígeno. As estruturas de PBS- 96 e PBS-14 são mostradas na FIGURA 13. PBS-96 e PBS-14 ativam células NKT in vitro e in vivo. Tanto PBS-96 quanto PBS-14 contêm um grupo amida na posição C6 da galactose e uma cadeia de acila saturada na porção ceramida do composto. PBS-96 e PBS-14 melhoram a resposta da célula T CD8+ a um antígeno e PBS-96 e PBS-14 induz a liberação de IFN-γ in vivo. Além do mais, PBS-96 e PBS-14 são inesperadamente superiores a outros glicoesfingolipídeos quando usados em concentrações mais baixas e também quando injetados intramuscularmente.

[0036] Composições incluindo compostos da fórmula I podem ser formuladas usando uma variedade de métodos preparativos e ingredientes inativos conhecidos pelos versados na tecnologia. (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., (2000), que está aqui incorporado pela referência.) Composições da invenção também podem conter um sistema de distribuição de antígeno adequado para alvejar o antígeno para as células imunes. Sistemas de distribuição de antígeno são conhecidos na tecnologia e incluem, mas sem limitações, MVA (vírus ankara modificado), adenovírus, lentivírus, subunidade translocada de toxina pertussis ou shiga ou lipossomas encapsulados de antígeno. Dosagens efetivas do composto da fórmula I em uma composição de vacina podem ser determinadas pelos versados na tecnologia, mas tipicamente variam de cerca de 1 nanograma a cerca de 10.000 microgramas por quilograma de peso corporal, embora eles sejam tipicamente cerca de 1.000 microgramas ou menos por quilograma de peso corporal. Em algumas modalidades, a dosagem efetiva varia de cerca de 10 nanogramas a cerca de 1.000 microgramas por quilograma de peso corporal. Em uma outra modalidade, a dosagem efetiva varia de cerca de 100 nanogramas a cerca de 500 microgramas por quilograma de peso corporal. Em uma outra modalidade, a dosagem efetiva varia de cerca de 1 microgramas a cerca de 250 microgramas por quilograma de peso corporal. Para propósitos de estudo, uma dosagem adequada para um camundongo é de 1 ng a 1 µg de composto da fórmula I por 100 µL de dosagem dependendo da via de

administração. Por exemplo, dosagem de cerca de 100 ng é adequada para injeção intravenosa em um camundongo e dosagem de no mínimo 10 ng mostrou ser efetiva para injeção intramuscular. A composição compreendendo o composto da fórmula I pode ser administrada em uma dosagem única, ou dividida em múltiplas dosagens por um período de semanas ou meses.

[0037] Um ou mais antígenos podem estar incluídos nas composições ou podem ser formulados independentemente. Da forma aqui usada, um "antígeno" refere-se a uma molécula que estimula uma resposta imune em um indivíduo ao qual ela foi administrada. Percebe-se que a dosagem do antígeno dependerá do antígeno específico, e da idade e estado imune do indivíduo, bem como de outros fatores relevantes que podem ser determinados pelos versados na tecnologia.

[0038] Microrganismos totais ou porções destes (por exemplo, membrana fantasma; preparações de membrana brutas, lisados e outras preparações de microrganismos) podem ser utilizados como antígenos. Adequadamente, antígenos são derivados de agentes infecciosos atenuados ou mortos. Agentes infecciosos adequados dos quais um antígeno pode ser derivado incluem, mas sem limitações, patógenos e microrganismos, tais como bactérias, parasitas e vírus. Em alguns contextos, antígenos adequados são obtidos ou derivados de um patógeno viral que é associado a uma doença humana incluindo, mas sem limitações, HIV/AIDS {Retroviridae, por exemplo, moléculas gpl20 para isolados de HIV-I e HIV-2, HTLV-I, HTLV-I I), vírus influenza (Orthomyxoviridae, por exemplo, tipos A, B e C), herpes (por exemplo, vírus da herpes simplex, glicoproteínas gB, gD e gH de HSV-I e HSV-2), infecções por rotavírus (Reoviridae), infecções respiratórias (parainfluenza e vírus sincicial respiratório), Poliomielite (Picornaviridae, por exemplo, poliovírus, rinovírus), sarampo e caxumba (Paramixoviridae), Rubella (Togaviridae, por exemplo, vírus da rubéola), hepatite (por exemplo, vírus da hepatite tipos A, B, C, D, E e/ou G), cimegalovírus (por exemplo, gB e gH), gastroenterite (Caliciviridae), febre amarela e do Nilo do oeste (Flaviviridae), raiva (Rhabdoviridae), febre hemorrágica coreana (Bunyaviridae), febre venezualana (Arenaviridae), verrugas (Papillomavirus), vírus da imunodeficiência simiana, vírus da encefalite, vírus varicela zóster, vírus Epstein-Barr,

e outras famílias de vírus, incluindo Coronaviridae, Birnaviridae e Filoviridae.

[0039] Bactérias e antígenos parasíticos específicos também podem ser obtidas ou derivadas de agentes que causam doença conhecidos e podem ser usadas nas composições para vacinar contra doenças incluindo, mas sem limitações, difteria, pertusse, tétano, tuberculose, pneumonia bacteriana ou fúngica, otite média, gonorréia, cólera, tifóide, meningite, mononucleose, praga, shigelose ou salmonelose, doenças de Legionnaires, doença de Lyme, lepra, malária, tênia, oncocerciase, esquistossomose, trpanosomíase, leishmanioses, giardíases, amebíases, filarioses, Borrelia, e triquinose. Antígenos adicionais podem ser obtidos ou derivados de patógenos não convencionais, tais como os agentes que causam kuru, doença de Creutzfeldt- Jakob (CJD), scrapie, encefalopatia transmissível pelo leite e doenças prejudiciais crônicas ou de partículas infecciosas proteináceas, tais como príons que são associados à doença da vaca louca.

[0040] Patógenos específicos adicionais dos quais antígenos podem ser derivados incluem M. tuberculosis, Chlamydia, N. gonorrhoeae, Shigella, Salmonella, Vibrio cholerae, Treponema pallidum, Pseudomonas, Bordetella pertussis, Brucella, Francisella tularensis, Helicobacter pylori, Leptospira interrogans, Legionella pneumophila, Yersinia pestis, Streptococcus (tipos A e B), pneumococcus, meningococcus, Haemophilus influenza (tipo b), Toxoplasma gondii, Moraxella catarrhalis, donovanosis, e actinomycosis; patógenos fúngicos incluem candidíases e aspergilose; patógenos parasíticos incluem Tênias, fascíola, nemátodo, amebíase, giardíase, Cryptosporidium, Schistosoma, Pneumocystis carinii, tricomoniase e triquinose. A presente invenção também pode ser usada para fornecer uma resposta imune adequada contra inúmeras doenças veterinárias, tais como doenças de pés-e-boca, coronavírus, Pasteurella multocida, Helicobacter, Strongylus vulgaris, Actinobacillus pleuropneumonia, vírus da diarréia viral bovina (BVDV), Klebsiella pneumoniae, E. coli, e Bordetella pertussis, parapertussis e brochiseptica.

[0041] Em outras modalidades, antígenos para inclusão nas composições que podem ser usados em conjunto com a presente invenção são antígenos derivados de tumor ou células tumorais totais autólogas ou alogeneicas. Adequadamente, o

antígeno tumoral é um antígeno tumoral específico (TSA) ou um antígeno associado ao tumor (TAA). Vários antígenos tumorais e seus padrões de expressão são conhecidos na tecnologia e podem ser selecionados como base no tipo de tumor a ser tratado. Exemplos não limitantes de antígenos tumorais incluem cdk4 (melanoma), β-catenina (melanoma), caspase-8 (carcinoma de célula escamosa), MAGE-I e MAGE-3 (melanoma, mama, glioma), tirosinase (melanoma), idiotipo Ig de superfície (por exemplo, BCR) (linfoma), Her-2/neu (mama, ovário), MUC-I (mama, pancreático) e HPV E6 e E7 (carcinoma cervical). Antígenos tumorais adequados adicionais incluem antígeno específico da próstata (PSA), sialyl Tn (STn), proteínas de choque térmico e peptídeos tumorais associados (por exemplo, gp96), moléculas de gangliosídeos (por exemplo, GM2, GD2, e GD3), antígeno carcinoembriônico (CEA) e MART-I.

[0042] Conforme percebido por um versado na tecnologia, composições farmacêuticas são adequadamente formuladas para ser compatíveis com a via de administração destinada. Exemplos de vias adequadas de administração incluem administração parenteral, por exemplo, intravenosa, intradérmica, subcutânea, intramuscular, oral (por exemplo, inalação), enteral, transdérmica (tópica), transmucosal, e retal. Conforme mostrado nos exemplos, observou-se que os compostos da fórmula I fornecem uma melhora inesperadamente robusta da resposta imune depois da administração intramuscular.

[0043] Uma outra modalidade da invenção é um método de estimular uma resposta imune humoral a um antígeno. O método inclui co-administrar um composto da fórmula I e um antígeno a um indivíduo, da forma descrita anteriormente. Da forma aqui usada, uma “resposta imune humoral” refere-se à produção de anticorpos por células B e o processo acessório que o acompanha incluindo, mas sem limitações, por exemplo, ativação de Th2 e produção de citocina, formação do centro germinal e troca de isotipo, produção de maturação de afinidade e geração de célula de memória. Para o propósito de determinar se uma resposta imune humoral é ativada, uma comparação quantitativa do sinal em uma amostra de um indivíduo administrado com antígeno e um composto da fórmula I pode ser feita a uma amostra de um indivíduo

administrado com antígeno sozinho. A resposta imune humoral pode ser avaliada medindo as funções efetoras dos anticorpos, incluindo neutralização do patógeno ou toxina, ativação do complemento clássico, e promoção de opsonina de fagocitose e eliminação do patógeno. Os anticorpos produzidos na resposta para co-administrar o composto da fórmula I e um antígeno podem ser de qualquer tipo, por exemplo, IgM, IgA, ou IgG (tais como IgGl ou IgG2). A resposta imune humoral pode ser ensaiada por qualquer método quantitativo conhecido na tecnologia, por exemplo, ELISA, ensaio de imunodifusão radial única (SRID), imunoensaio enzimático (EIA), ou ensaio de inibição da hemaglutinação (HAI).

[0044] Uma modalidade adicional da invenção é um método de ativar linfócitos T CD4+ em um indivíduo. Conforme se sabe na tecnologia, células T CD4+, ou "células T auxiliares," são células que reconhecem antígenos apresentados pelo marcador de histocompatibilidade principal de classe II (MHC) na superfície das células que apresentam antígeno, e secretam linfocinas para estimular ramificações tanto mediadas por células quanto mediadas por anticorpo do sistema imune. A ativação de célula T CD4+ promove secreção de linfocina, troca de isotipo de imunoglobulina, maturação de afinidade da resposta do anticorpo, ativação do macrófago e melhor atividade de células matadoras naturais (NK) e T citotóxicas (CTL). Linfocinas são proteínas secretadas por linfócitos que afetam sua própria atividade e/ou a atividade de outras células. Linfocinas incluem, mas sem limitações, interleucinas e citocinas, por exemplo, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL- 12, ou IFNγ. Para o propósito de determinar se um linfócito T CD4+ é ativado uma comparação quantitativa do sinal em uma amostra de um indivíduo vacinado com antígeno e um composto da fórmula I pode ser feita com uma amostra de um indivíduo vacinado com antígeno sozinho. Métodos para ensaiar ativação de células T CD4+ são conhecidos na tecnologia.

[0045] Uma outra modalidade da invenção é um método de ativar linfócitos CD8+ T em um indivíduo. Linfócitos CD8+ T reconhecem antígenos apresentados por moléculas MHC de classe I (presentes em todas as células nucleadas). O combate do complexo de peptídeo de classe I de MHC resulta na distribuição de grânulos líticos para a célula alvo causando lise da célula alvo. Métodos usados para ensaiar a

ativação de células T CD8+ são conhecidos na tecnologia e incluem, mas sem limitações, análise ELISPOT, ELISA, FACS para ligação de tetrâmero/pentâmero e ensaios citotóxicos. Alternativamente, um modelo de camundongo pode ser usado para monitorar a ativação de células T CD8+ usando um ensaio fluorescente para medir a citotoxidade mediada por célula, da forma descrita em Hermans et al, 2004, Journal of Immunologic Methods, 285:25-40, incorporado pela referência na íntegra. Neste ensaio, camundongos são imunizados no dia 0 com a vacina com ou sem o composto de teste. Células alvo singenéicas são criadas isolando esplenócitos de um segundo conjunto de camundongos e marcando as células com dois corantes fluorescentes de marcação de célula separados ou concentrações altas e baixas de um único corante fluorescente, por exemplo, CFSE ou CMTMR. Um conjunto de células alvo é carregado com peptídeos específicos para o antígeno, enquanto que um segundo conjunto de células alvo é carregado com um peptídeo irrelevante. As duas populações de célula alvo são misturadas em quantidades iguais e injetadas nos camundongos imunizados. 24 horas depois, camundongos são sacrificados e esplenócitos e amostras de sangue são obtidos. Os níveis de cada conjunto de células alvo são analisados por citometria de fluxo. Ativação de linfócitos CD8+ é determinada comparando o número de células alvo em uma amostra vacinada com antígeno e composto de teste ao número de células alvo em uma amostra de um indivíduo vacinado com antígeno somente.

[0046] Outros aspectos da invenção ficarão evidentes considerando os seguintes exemplos não limitantes e figuras em anexo.

EXEMPLOS

[0047] Exemplo 1: Teste para melhora da resposta de célula T CD8+ por PBS-96, PBS- 14 e PBS-11 injetados intravenosamente em um modelo de camundongo

[0048] Um modelo de camundongo foi usado para testar resposta de célula T citotóxica específica in vivo (CD8+) trazida à tona por compostos adjuvantes de teste em combinação com antígeno quando administrados intravenosamente. Oito grupos de 3 camundongos foram imunizados no dia 0 com antígeno (Ovalbumina, Ova, grau VII, Sigma, St. Louis, MO) com ou sem adjuvante, adjuvante sozinho, ou carreador

sozinho (controle) em um total de 100 µL de PBS intravenosamente (veia da cauda lateral). Compostos adjuvantes de teste foram 1 µg de PBS-96, 1 µg de PBS- 14, 1 µg de PBS-I I com ou sem 50 µg de antígeno Ovalbumina (OVA).

[0049] Células alvo singenéicas foram preparadas isolando esplenócitos de um segundo conjunto de camundongos C57/B1/6J CD45.2 fêmeas e marcando as células tanto com concentração baixa (0,6 µM por 8 min a 37 °C) quanto com concentração alta (6 µM por 8 minutos de 37 °C) de CFSE (corante fluorescente). A população marcada com concentração alta de CFSE foi pré-carregada com 5 µM de peptídeo SIINFEKL (Peptídeo específico Ova, NeoMPS, Inc, San Diego, CA) por 60 minutos a 37 °C. A população marcada com baixa concentração de CFSE foi pré-carregada com 5 µL de peptídeo LCMV gp33-41 (peptídeo não Ova, NeoMPS, Inc, San Diego, CA) por 60 minutos a 37 °C. Células alvo foram misturadas com uma razão final de 47/53 de baixa concentração de células carregadas CFSE para concentração alta de células carregadas CFSE ($2x10^7$ células totais por 100 µL) e injetadas intravenosamente em cada um dos camundongos imunizados no dia 10. Camundongos foram sacrificados no dia 11 e células do baço e amostras de sangue do sino orbital foram coletadas. A porcentagem de sobrevivência média das células alvo pulsadas com peptídeo (concentração alta marcada com CFSE) foi calculada com relação à população do controle por análise citométrica de fluxo. Atividade citométrica foi expressa como porcentagem de lise específica (100 menos a porcentagem de sobrevivência média dos alvos pulsados com peptídeo). FIGURA 1 apresenta a porcentagem de lise específica de células alvo no sangue de camundongos imunizados. Somente a administração das combinações de Ova e PBS-96 ou PBS-14 resultou em lise citotóxica das células alvo específicas para Ova. Ao contrário, administração de PBS-11 não resultou na lise específica das células.

[0050] Exemplo 2: Comparação da melhora da resposta de célula T CD8+ por PBS-96, PBS-14, PBS-II, PBS-57 e αGalCer quando injetado intravenosa e intramuscularmente em um modelo de camundongo

[0051] Para determinar a capacidade dos compostos adjuvantes de teste de induzir uma resposta de célula T citotóxica específica in vivo (CD8+) quando

administrados em combinação com antígeno, compostos adjuvantes de teste ainda foram ensaiados usando o método descrito no exemplo 1. Dezoito grupos de camundongos foram imunizados no dia 0 tanto intravenosamente (IV) (grupos 1-9 de 3 camundongos por grupo) quanto intramuscularmente (grupos 10-18 de 6 camundongos por grupo) como se segue:

- Grupo 1 : 400 µg de Ova em 100 µL de PBS por IV;
- Grupo 2: 1 µg de αGalCer em 100 µL de PBS por IV;
- Grupo 3 : 1 µg de PBS-57 em 100 µL de PBS por IV;
- Grupo 4: 1 µg de PBS-14 em 100 µL de PBS por IV;
- Grupo 5: 1 µg de PBS-96 em 100 µL de PBS por IV;
- Grupo 6: 400 µg de Ova + 1 µg de αGalCer em 100 µL de PBS por IV;
- Grupo 7: 400 µg de Ova + 1 µg de PBS-57 em 100 µL de PBS por IV;
- Grupo 8: 400 µg de Ova + 1 µg de PBS-14 em 100 µL de PBS por IV;
- Grupo 9: 400 µg de Ova + 1 µg de PBS-96 em 100 µL de PBS por IV;
- Grupo 10: 400 µg de Ova em 50 µL de PBS por IM;
- Grupo 11: 1 µg de αGalCer em 50 µL de PBS por IM;
- Grupo 12: 1 µg de PBS-57 em 50 µL de PBS por IM;
- Grupo 13: 1 µg de PBS-14 em 50 µL de PBS por IM;
- Grupo 14: 1 µg de PBS-96 em 50 µL de PBS por IM;
- Grupo 15: 400 µg de Ova + 1 µg de αGalCer em 50 µL de PBS por IM;
- Grupo 16: 400 µg de Ova + 1 µg de PBS-57 em 50 µL de PBS por IM;
- Grupo 17: 400 µg de Ova + 1 µg de PBS-14 em 50 µL de PBS por IM;
- Grupo 18: 400 µg de Ova + 1 µg de PBS-96 em 50 µL de PBS por IM.

[0052] Células alvo foram misturadas com uma razão final de 50/50 de baixa concentração de células carregadas CFSE para concentração alta células carregadas CFSE ($1x10^7$ células de cada concentração, $2x10^7$ células totais por 100 µL) e injetadas intravenosamente em cada um dos camundongos imunizados no dia 10. No dia 11, camundongos foram sacrificados e amostras de sangue foram coletadas do sino orbital. Lise celular das células alvo específicas de OVA foi monitorada por citometria de fluxo das células so sangue periféricas. Lise celular específica foi

determinada da forma descrita anteriormente.

[0053] FIGURA 2 mostra os resultados para camundongos injetados intravenosamente. A resposta citotóxica específica para Ova média em camundongos tratados com Ova somente foi 11,8 ± 14,4 %, com Ova e αGalCer foi 79,9 ± 0,8 %, em camundongos tratados com Ova e PBS-57 foi 88,1 ± 6,2 %, em camundongos tratados com Ova e PBS-14 foi 83,3 ± 6,1 %, e em camundongos tratados com Ova e PBS96 foi 89,2 ± 10,3 %. Resultados mostraram que PBS-14 e PBS-96 foram tão efetivos quanto PBS-57 na indução de respostas citotóxicas específicas para OVA in vivo.

[0054] FIGURA 3 mostra os resultados para camundongos injetados intramuscularmente. O resposta citotóxica específica para Ova média em camundongos tratados com Ova somente foi 1,60 ± 14,33 %, em camundongos tratados com OVA e αGalCer foi -5,85 ± 11,01 %, em camundongos tratados com Ova e PBS-57 foi 56,11 ± 13,34 %, em camundongos tratados com Ova e PBS-14 foi 52,07 ± 29,56 %, e em camundongos tratados com OVA e PBS-96 foi 50,29 ± 42,6 %. Estes resultados demonstram que PBS-96 e PBS-14 ambos trazem à tona uma resposta imune tão efetivamente quanto PBS-57 tanto intravenosa quanto intramuscularmente e que PBS-14, PBS-96 e PBS-57 são mais efetivos que αGalCer depois da injeção intramuscular.

[0055] Exemplo 3: Estímulo in vivo de IFNγ por compostos adjuvantes de teste

[0056] Para testar a capacidade dos compostos de teste adjuvantes de estimular liberação de citocina in vivo, camundongos C57BL/6 foram administrados com os compostos em diferentes concentrações intravenosamente e a produção de IFNγ no soro foi medida 24 horas depois por ELISA. Grupos de 3 camundongos foram inoculados intravenosamente (veia da cauda) no dia 0 como se segue:

Grupo 1: 100 µL de PBS sozinho

Grupo 2: 1 µg de αGalCer em 100 µL de PBS

Grupo 3: 100 ng de αGalCer em 100 µL de PBS

Grupo 4: 1 ng de αGalCer em 100 µL de PBS

Grupo 5: 0,1 ng de αGalCer em 100 µL de PBS

Grupo 6: 100 ng de αGalCer e 400µg de Ova em 100 µL de PBS

Grupo 7: 1 µg de PBS-57 em 100 µL de PBS

Grupo 8: 100 ng de PBS-57 em 100 µL de PBS

Grupo 9: 1 ng de PBS-57 em 100 µL de PBS

Grupo 10: 0,1 ng de PBS-57 em 100 µL de PBS

Grupo 11 : 100 ng de PBS-57 e 400 µg de Ova em 100 µL de PBS

Grupo 12: 1 µg de PBS- 14 em 100 µL de PBS

Grupo 13: 100 ng de PBS-14 em 100 µL de PBS

Grupo 14: 1 ng de PBS-14 em 100 µL de PBS

Grupo 15: 0,1 ng de PBS-14 em 100 µL de PBS

Grupo 16: 100 ng de PBS-14 e 400µg de Ova em 100 µL de PBS

Grupo 17: 1 µg de PBS-96 em 100 µL de PBS

Grupo 18: 100 ng de PBS-96 em 100 µL de PBS

Grupo 19: 1 ng de PBS-96 em 100 µL de PBS

Grupo 20: 0,1 ng de PBS-96 em 100 µL de PBS

Grupo 21: 100 ng de PBS-96 e 400 µg de Ova em 100 µL de PBS.

[0057] 24 horas depois da inoculação, amostras de sangue foram coletadas dos camundongos e níveis de IFNγ foram detectados por estojo ELISA. Dois estojos ELISA foram usados, Quantikine mouse IFNγ (RD systems) foi usado para testar todas as amostras e ELISA mIFNγ (Diaclone) foi usado para testar grupo 1, 2, 3, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 16, 17, 18 e 21. Todos os soros foram diluídos antes do uso em ELISA como se segue:

Grupo 1 :1/1	Grupo 2:1/50	Grupo 3: 1/50
Grupo 4: 1/20	Grupo 5: 1/10	Grupo 6: 1/50
Grupo 7: 1/50	Grupo 8: 1/50	Grupo 9: 1/20
Grupo 10: 1/10	Grupo 11: 1/50	Grupo 12: 1/50
Grupo 13: 1/50	Grupo 14: 1/20	Grupo 15: 1/10
Grupo 16: 1/50	Grupo 17: 1/50	Grupo 18: 1/50
Grupo 19: 1/20	Grupo 20: 1/10	Grupo 21 : 1/50

[0058] Os resultados são expressos como concentração de IFNγ (pg/mL) no soro

e levado em consideração o fator de diluição. FIGURA 4 apresenta os resultados usando o Estojo Quantikine mouse IFNγ da RD systems. FIGURA 4A apresenta os resultados de níveis de IFNγ para camundongos imunizados com PBS-57. FIGURA 4B apresenta os resultados dos níveis de IFNγ para camundongos imunizados com PBS-14. FIGURA 4C apresenta os resultados de níveis de IFNγ para camundongos imunizados com PBS-96 e FIGURA 4D apresenta os resultados de níveis de IFNγ para camundongos imunizados com αGalCer. Em 0,1 ng, todos os candidatos a adjuvante induzem liberação de citocina, mas camundongos imunizados com αGalCer produziram três ou quatro vezes menos IFNγ que camundongos imunizados com PBS-57, PBS-14 ou PBS-96 (1540,57 ± 397,53 pg/mL, 4398,05 ± 880,86 pg/mL, 6669,31 ± 1231,82 pg/mL, 5823,33 ± 720,69 pg/mL, respectivamente). Em 1 ng de composto adjuvante de teste, PBS-57, PBS-14 e PBS-96 (11425,98 ± 833,04 pg/mL, 7481,15 ± 3454,03 pg/mL e 6271,95 ± 3737,53 pg/mL, em média, respectivamente) mostraram uma maior resposta que αGalCer (média de 3802,99 ± 586,02 pg/mL). Em 100 ng de composto adjuvante de teste, PBS- 57, PBS-96 e PBS-14 todos produziram maiores níveis de IFNγ que αGalCer (21432,76 ± 4312,76 pg/mL para PBS-57, 19679,89±1443,48 pg/mL para PBS-96, 19582,18 ± 3421,20 pg/mL para PBS-14, e 7714,37 ± 3529,07 pg/mL para αGalCer, em média). Em 1 µg de composto de teste, PBS-57 mostrou uma resposta mais fraca (3353,45 ± 867,57 pg/mL) comparada à dosagem de 100 ng (21432,76 ± 4312,76 pg/mL), enquanto que PBS-14 ou PBS-96 ainda mostraram uma resposta menos, mais robusta (16392,53 ± 5957,70 pg/mL e 17720,11 ± 2869,97 pg/mL, respectivamente) que na dosagem de 100 ng (19582,18 ± 3421,20 pg/mL e 19679,89 ± 1443,48 pg/mL, respectivamente).

[0059] Um outro conjunto de camundongos foi usado para comparar a capacidade dos compostos adjuvantes de estimular liberação in vivo de citocina pelo método descrito anteriormente. Cinco grupos de camundongos C57BL/6 foram administrados com 100 ng de PBS-57, PBS-14, PBS-96, ou PBS-11 em 100 µL de PBS ou 100 µL de PBS sozinho intravenosamente. A produção de IFNγ no soro foi medida 24 horas depois por ELISA. FIGURA 5 apresenta os resultados para camundongos imunizados com 100 ng de PBS-I I, PBS- 96, PBS-14 e PBS-57.

[0060] No geral, a administração de PBS-14 e PBS-96 deu uma resposta de IFNγ similar ao PBS-57 e uma resposta inesperadamente maior que administração de PBS-11.

[0061] Exemplo 4: Comparação da melhora da resposta de célula T CD8+ por PBS-96, PBS-14, PBS-11, e PBS-57

[0062] Para determinar a capacidade dos compostos adjuvantes de teste de induzir resposta de célula T citotóxica específica in vivo (CD8+) em combinação com antígeno, os compostos de teste foram testados pelo método descrito no exemplo 1. Nove grupos de camundongos foram imunizados no dia 0 intravenosamente (IV) como se segue:

- Grupo 1 : 400 µg de Ova em 100 µL de PBS;
- Grupo 2: 1 µg de PBS-11 em 100 µL de PBS;
- Grupo 3: 1 µg de formulação inédita de PBS-57 em 100 µL de PBS;
- Grupo 4: 1 µg de PBS-14 em 100 µL de PBS;
- Grupo 5: 1 µg de PBS-96 em 100 µL de PBS;
- Grupo 6: 400 µg de Ova + 1 µg de PBS-11 em 100 µL de PBS;
- Grupo 7: 400 µg de Ova + 1 µg de formulação inédita de PBS-57 em100 µL de PBS;
- Grupo 8: 400 µg de Ova + 1 µg de PBS-14 em 100 µL de PBS;
- Grupo 9: 400 µg de Ova + 1 µg de PBS-96 em 100 µL de PBS.

[0063] Células alvo foram misturadas com uma razão final de 50/50 de baixa concentração de células carregadas CFSE para concentração alta de células carregadas CFSE (1x10 células de cada concentração, 2x10 células totais por 100 µL) e injetadas intravenosamente em cada um dos camundongos imunizados no dia 10. No dia 11, camundongos foram sacrificados e amostras de sangue foram coletadas do sino orbital. Lise celular específica das células alvo específicas para Ova foi monitorada por citometria de fluxo das células do sangue periféricas. Lise celular específica foi determinada da forma descrita anteriormente. Os resultados são mostrados na FIGURA 6. A lise celular específica para Ova média foi 11,8 +14,4 % para camundongos tratados com Ova somente, 32,3 ± 2,5 % para camundongos

tratados com Ova e PBS-11, 88,1 ± 6,2 % em camundongos tratados com Ova e PBS-57, 83,3 ± 6,1 % para camundongos tratados com Ova e PBS-14, e 89,2 ± 10,3 % em camundongos tratados com Ova e PBS-96. Estes resultados demonstram que PBS-14 e PBS-96 são tão efetivos quanto PBS-57 na indução de uma resposta citotóxica in vivo depois da administração intravenosa em combinação com antígeno.

[0064] Exemplo 5. Comparação da melhora da resposta de célula T CD8+ diminuindo as quantidades de adjuvante depois da injeção intramuscular

[0065] Para determinar a capacidade relativa dos compostos adjuvantes de teste de melhorar a resposta imune, um experimento similar ao descrito no exemplo 2 foi realizado. Neste experimento camundongos foram injetados intravenosamente com quantidades decrescentes de adjuvante (100 ng e 10 ng, respectivamente) em combinação com 50 µg de OVA antígeno no dia 0 como se segue:

[0066] Experimento A:

Grupo 1 : 50 µg de Ova em 100 µL de PBS

Grupo 2: 100 ng αGalCer ;

Grupo 3: 100 ng PBS-11

Grupo 4: 100 ng PBS-14

Grupo 5: 100 ng PBS-57

Grupo 6: 100 ng PBS-96

Grupo 7: 50 µg de Ova com 100 ng αGalCer;

Grupo 8: 50 µg de Ova com 100 ng PBS-11

Grupo 9: 50 µg de Ova com 100 ng PBS-14

Grupo 10: 50 µg de Ova com 100 ng PBS-57

Grupo 11: 50 µg de Ova com 100 ng PBS-96

[0067] Experimento B:

Grupo 1: 50 µg de Ova em 100 µL de PBS

Grupo 2: 10 ng αGalCer;

Grupo 3: 10 ng PBS-11

Grupo 4: 10 ng PBS-14

Grupo 5: 10 ng PBS-57

Grupo 6: 10 ng PBS-9

Grupo 7: 50 µg de Ova com 10 ng αGalCer;

Grupo 8: 50 µg de Ova com 10 ng PBS-11

Grupo 9: 50 µg de Ova com 10 ng PBS-14

Grupo 10: 50 µg de Ova com 10 ng PBS-57

Grupo 11: 50 µg de Ova com 10 ng PBS-96

[0068] Células alvo foram administradas no dia 10 do experimento e sangue foi coletado no dia 11. Os resultados para o experimento A usando 100 ng de cada adjuvante são mostrados na FIGURA 7 e os resultados para o experimento B são mostrados na FIGURA 8. FIGURA 7 e 8 demonstram que PBS-14 e PBS-96 são inesperadamente melhores que outros adjuvantes na melhora da resposta da célula T CD8+ a um antígeno em dosagens inferiores quando administrados intramuscularmente. De fato, depois da administração de OVA e somente 10 ng tanto de PBS-14 quanto de PBS-96 intramuscularmente a porcentagem de lise específica das células alvo por células T CD8+ ainda é acima de 60 %, enquanto que a porcentagem de lise específica de células alvo depois da administração de OVA e a mesma quantidade de PBS-57, PBS-1 1 ou αGalCer não foi diferenciada dos controles.

[0069] Exemplo 6. Comparação da melhora da resposta de célula T CD8+ por quantidades decrescentes de adjuvante depois da injeção intramuscular

[0070] Para verificar os resultados obtidos usando o ensaio de citotoxicidade in vivo descrito nos exemplos anteriores, experimentos similares foram realizados e ativação de célula T CD8+ foi determinada medindo a porcentagem de células T CD8+ específicas para OVA usando um ensaio de pentâmero. Resumidamente, camundongos foram injetados intramuscularmente com as quantidades indicadas de OVA e composto adjuvante de teste tanto em 1 µg quanto em 100 ng por camundongo, respectivamente no dia 0 como se segue:

[0071] Experimento A:

Grupo 1 : 100 µL de PBS;

Grupo 2: 50 µg de Ova em 100 µL de PBS;

Grupo 3: 50 µg de Ova com 1 µg αGalCer;

Grupo 4: 50 µg de Ova com 1 µg de PBS-11

Grupo 5: 50 µg de Ova com 1 µg de PBS-14

Grupo 6: 50 µg de Ova com 1 µg de PBS-57

Grupo 7: 50 µg de Ova com 1 µg de PBS-96

[0072] Experimento B:

Grupo 1: 100 µL de PBS;

Grupo 2: 50 µg de Ova em 100 µL de PBS;

Grupo 3: 50 µg de Ova com 100 ng αGalCer;

Grupo 4: 50 µg de Ova com 100 ng PBS-11

Grupo 5: 50 µg de Ova com 100 ng PB S- 14

Grupo 6: 50 µg de Ova com 100 ng PBS-57

Grupo 7: 50 µg de Ova com 100 ng PBS-96

[0073] Uma segunda injeção foi administrada aos camundongos no dia 14 e sangue foi coletado dos camundongos no dia 21. Os linfócitos foram coletados e analisados por análise FACS usando pentâmero SIINFEKL H-2K^b e CD8 anticorpo para detectar células T CD8+ responsivas ao OVA.

[0074] Os resultados do experimento A são mostrados na FIGURA 9 e os resultados do experimento B são mostrados na FIGURA 10. FIGURA 9 demonstra que quando administrados em I µg de PBS- 14, PBS-96 e PBS-57 melhoraram a porcentagem de células T CD8+ específicas para OVA depois da vacinação, enquanto que PBS-11 e αGalCer não foram tão efetivos. FIGURA 10 demonstra que em dosagens inferiores de 100 ng de PBS-14 e PBS-96 foram surpreendentemente melhores na melhora da resposta da célula T CD8+ a um antígeno comparado ao PBS-57, PBS-11 e αGalCer.

[0075] Exemplo 7. Comparação da melhora da resposta humoral depois da imunização intramuscular com adjuvante e antígeno

[0076] Para avaliar se as respostas imunes humoral e de célula auxiliar T CD4+ também melhoraram pela administração dos adjuvantes de teste com antígeno, as respostas dos anticorpos IgG1 e IgG2a foram medidas em camundongos vacinados

com OVA com ou sem os adjuvantes de teste. Camundongos (6 por grupo) foram injetados intramuscularmente com 50 µg de OVA tanto sozinho quanto em combinação com 100 ng dos adjuvantes indicados (adjuvante de Freund foi usado como um controle positivo) como se segue:

Grupo 1: 500 µg de Ova com CFA/IFA (Controle positivo)

Grupo 2: 50 µg de Ova

Grupo 3: 50 µg de Ova e 100 ng de αGalCer

Grupo 4: 50 µg de Ova e 100 ng de PBS-11

Grupo 5: 50 µg de Ova e 100 ng de PBS-14

Grupo 6: 50 µg de Ova e 100 ng de PBS-57

Grupo 7: 50 µg de Ova e 100 ng de PBS-96

[0077] Nos 14 dias depois da injeção, amostras de sangue foram coletadas e ELISAs para IgGl e IgG2a foram realizados usando anticorpos monoclonais de camundongo específicos para isotipo IgG1 ou IgG2a de OVA. Os resultados são mostrados como o título do anticorpo no sangue periférico em ng/mL. Os resultados para IgGl são apresentados na FIGURA 11 e os para IgG2a são apresentados na FIGURA 12. Conforme mostrado na FIGURA 11, PBS-14, PBS-96 e PBS-57 foram todos capazes de trazer à tona um título de IgG1 robusto e melhorar o título de IgG1 específico para OVA comparado à vacinação com Ova somente ou OVA em combinação com PBS-11 ou αGalCer. Surpreendentemente, PBS-14 e PBS-96 melhoraram o título de IgG2a específico para OVA, bem como adjuvante de Freund e muito melhor que PBS-57.

[0078] Embora as composições e métodos desta invenção tenham sido descritos em termos de modalidades exemplares, ficará evidente para os versados na tecnologia que variações podem ser aplicadas às composições e métodos e nas etapas ou na sequência dos métodos aqui descritos se fugir do conceito, espírito e escopo da invenção. Mais especificamente, ficará evidente que certos agentes que são tanto química quanto fisiologicamente relacionados podem ser substituídos pelos agentes aqui descritos, enquanto que os mesmos resultados ou similares podem ser alcançados. Julga-se que todos tais substituintes e modificações similares evidentes

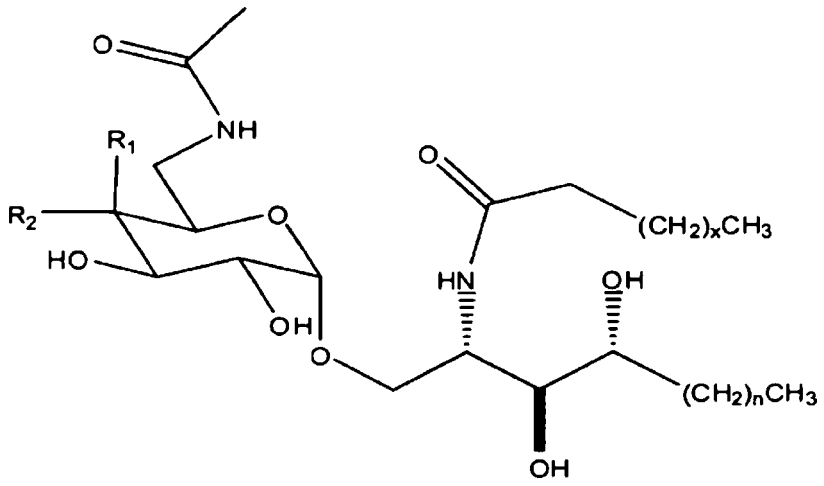
para os versados na tecnologia estão no espírito, escopo e conceito da invenção. Além do mais, todas as patentes e pedidos de patente aqui listados ou descritos estão incorporados na íntegra pela referência.

[0079] Da forma usada neste pedido de patente e nas reivindicações em anexo, as formas singulares “um,” “uma”, “o” e “a” incluem referentes no plural, a menos que o contexto claramente indique de outra maneira. Assim, por exemplo, referência a uma composição contendo “um polinucleotídeo” inclui uma mistura de dois ou mais polinucleotídeos. Também se deve notar que o termo “ou” é geralmente empregado no seu sentido de incluir “e/ou”, a menos que o contexto claramente indique de outra maneira. Todas as publicações, patentes e pedidos de patente referenciados neste pedido de patente são indicativos do nível de cada versado na tecnologia à qual esta invenção pertence. Todas as publicações, patentes e pedidos de patente estão aqui expressamente incorporados pela referência do mesmo modo como se cada publicação ou pedido de patente individual estivesse específica e individualmente indicado pela referência. No caso de conflito entre a presente revelação e as patentes, publicações e referências incorporadas, a presente descrição deve controlar.

[0080] Especificamente também se entende que qualquer valor numérico aqui citado inclui todos os valores do valor inferior ao valor superior, isto é, todas as possíveis combinações de valores numéricos entre o menor valor e o maior valor enumerados são considerados expressamente estabelecidos neste pedido de patente.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um composto da fórmula I:



(I)

em que R_1 é H ou -OH, R_2 é -H ou -OH, x é um número inteiro de 18 a 26, e n é um número inteiro de 10 a 15.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que x é 23.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que x é 21.

4. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que n é 13.

5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente um antígeno, dito antígeno sendo um polipeptídeo, polinucleotídeo ou antígeno de carboidrato, derivado de um agente infeccioso, um tumor, ou uma molécula endógena.

6. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a composição como definida na reivindicação 1 e um antígeno.

7. Uso da composição tal como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é para preparar uma vacina para tratar, em combinação com um antígeno, uma infecção ou um tumor, em que o composto da fórmula (I) melhora uma

resposta imune de um indivíduo a um antígeno, em que a resposta imune do indivíduo ao antígeno é melhorada com relação a uma resposta imune de um controle ao antígeno.

8. Uso da composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é para preparar uma vacina para tratar, em combinação com um antígeno, uma infecção ou um tumor, em que o composto da fórmula (I) melhora uma resposta imune humoral de um indivíduo a um antígeno, em que a resposta imune humoral do indivíduo ao antígeno é melhorada com relação a uma resposta imune de um controle ao antígeno.

9. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a resposta imune humoral compreende produção de anticorpos IgG ou anticorpos IgA.

10. Uso da composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é para preparar uma vacina para tratar, em combinação com um antígeno, uma infecção ou um tumor, em que o composto da fórmula (I) melhora uma resposta de célula T CD4+ de um indivíduo a um antígeno, em que a resposta imune do indivíduo ao antígeno é melhorada com relação a uma resposta de célula T CD4+ de um controle ao antígeno.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de a resposta de célula T CD4+ melhorada compreende ativação de linfócitos T CD4+.

12. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a ativação dos linfócitos T CD4+ compreende um aumento em uma resposta imune Th1 e/ou Th2.

13. Uso da composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é para preparar uma vacina para tratar, em combinação com um antígeno, uma infecção ou um tumor, em que o composto da formula (I) melhora a resposta da célula T CD8+ de um indivíduo a um antígeno, em que a resposta imune do indivíduo ao antígeno é melhorada com relação a uma resposta de célula T CD8+ de um controle ao antígeno.

14. Uso de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a ativação dos linfócitos T CD8+ compreende um aumento na resposta citotóxica.

15. Uso da composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é para preparar uma vacina para tratar, em combinação com um antígeno, uma infecção ou um tumor, em que o composto da fórmula (I) melhora a ativação de células que apresentam antígeno de um indivíduo a um antígeno, em que a resposta imune do indivíduo ao antígeno é melhorada com relação à ativação de células que apresentam antígeno de um controle ao antígeno.

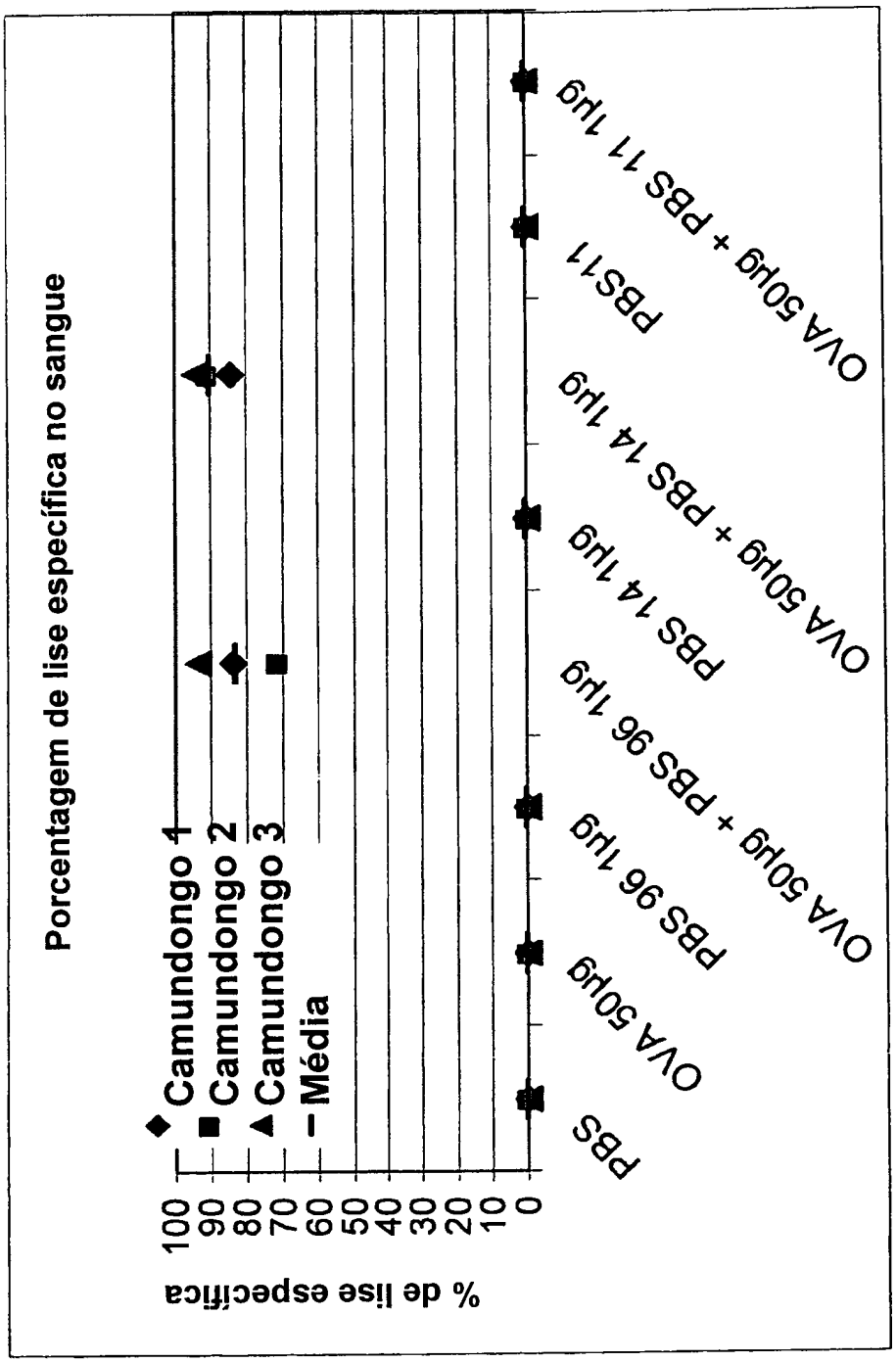

Porcentagem de lise específica no sangue
Camundongo 4
Camundongo 2
Camundongo 3
Média
% de lise específica
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
PBS
OVA 50µg
PBS 96 1µg
OVA 50µg + PBS 96 1µg
PBS 14 1µg
OVA 50µg + PBS 14 1µg
PBS11
OVA 50µg + PBS 11 1µg

FIG. 1

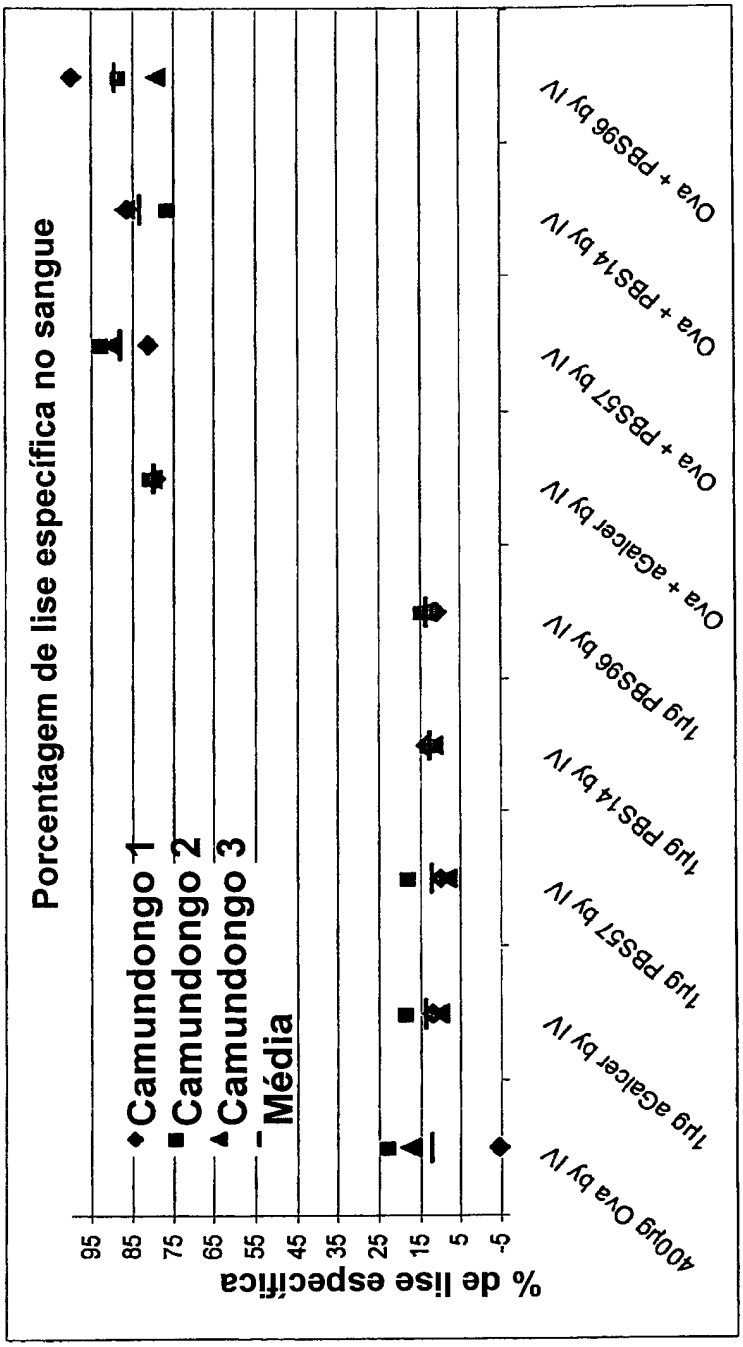

Porcentagem de lise específica no sangue
Camundongo 1
Camundongo 2
Camundongo 3
Média
% de lise específica
95
85
75
65
55
45
35
25
15
5
-5
400µg Ova by IV
1µg aGalcer by IV
1µg PBS57 by IV
1µg PBS14 by IV
1µg PBS96 by IV
Ova + aGalcer by IV
Ova + PBS57 by IV
Ova + PBS14 by IV
Ova + PBS96 by IV

FIG. 2

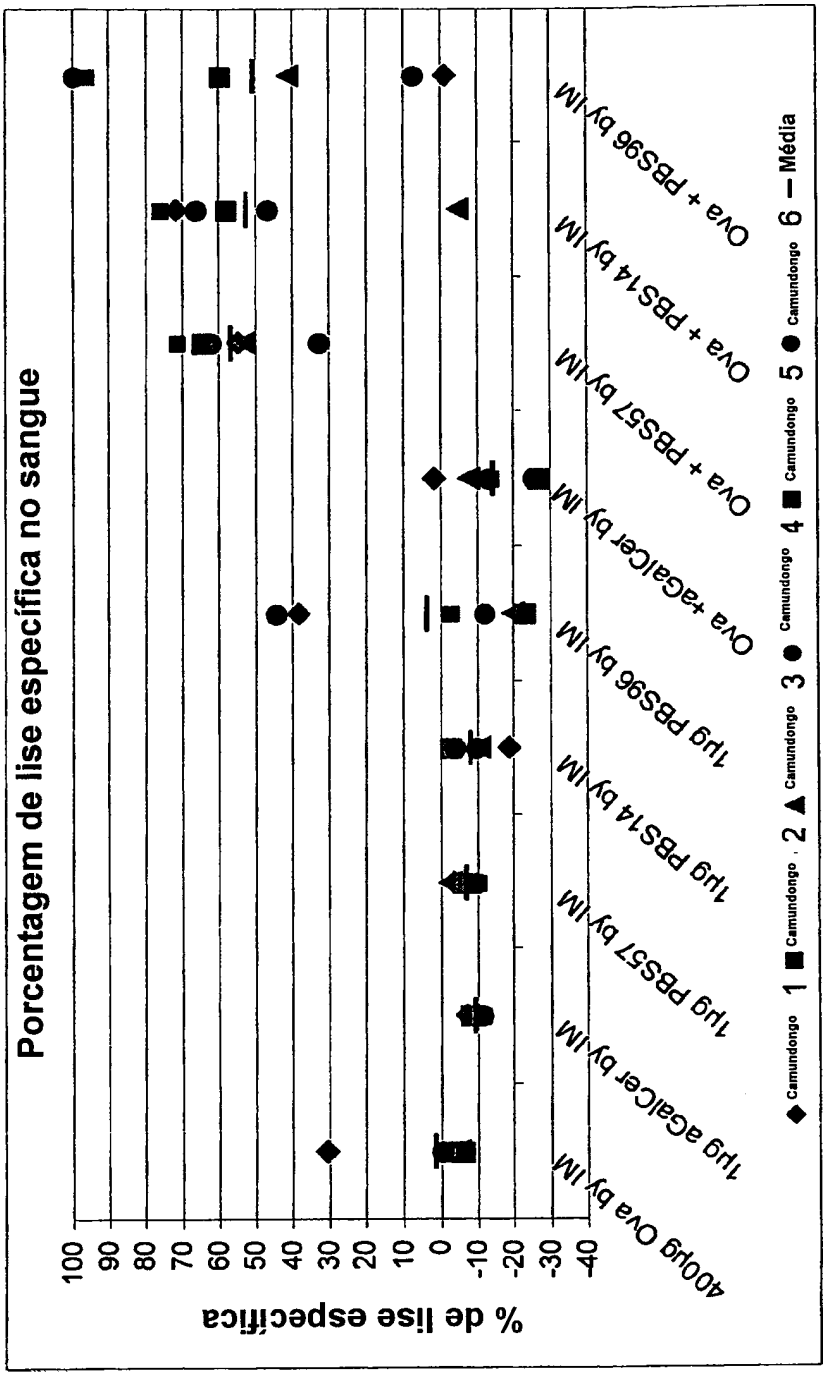

Porcentagem de lise específica no sangue
% de lise específica
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
400µg Ova by IM
1µg aGalCer by IM
1µg PBS57 by IM
1µg PBS14 by IM
1µg PBS96 by IM
Ova +aGalCer by IM
Ova + PBS57 by IM
Ova + PBS14 by IM
Ova + PBS96 by IM
Camundongo 1
Camundongo 2
Camundongo 3
Camundongo 4
Camundongo 5
Camundongo 6 — Média

FIG. 3

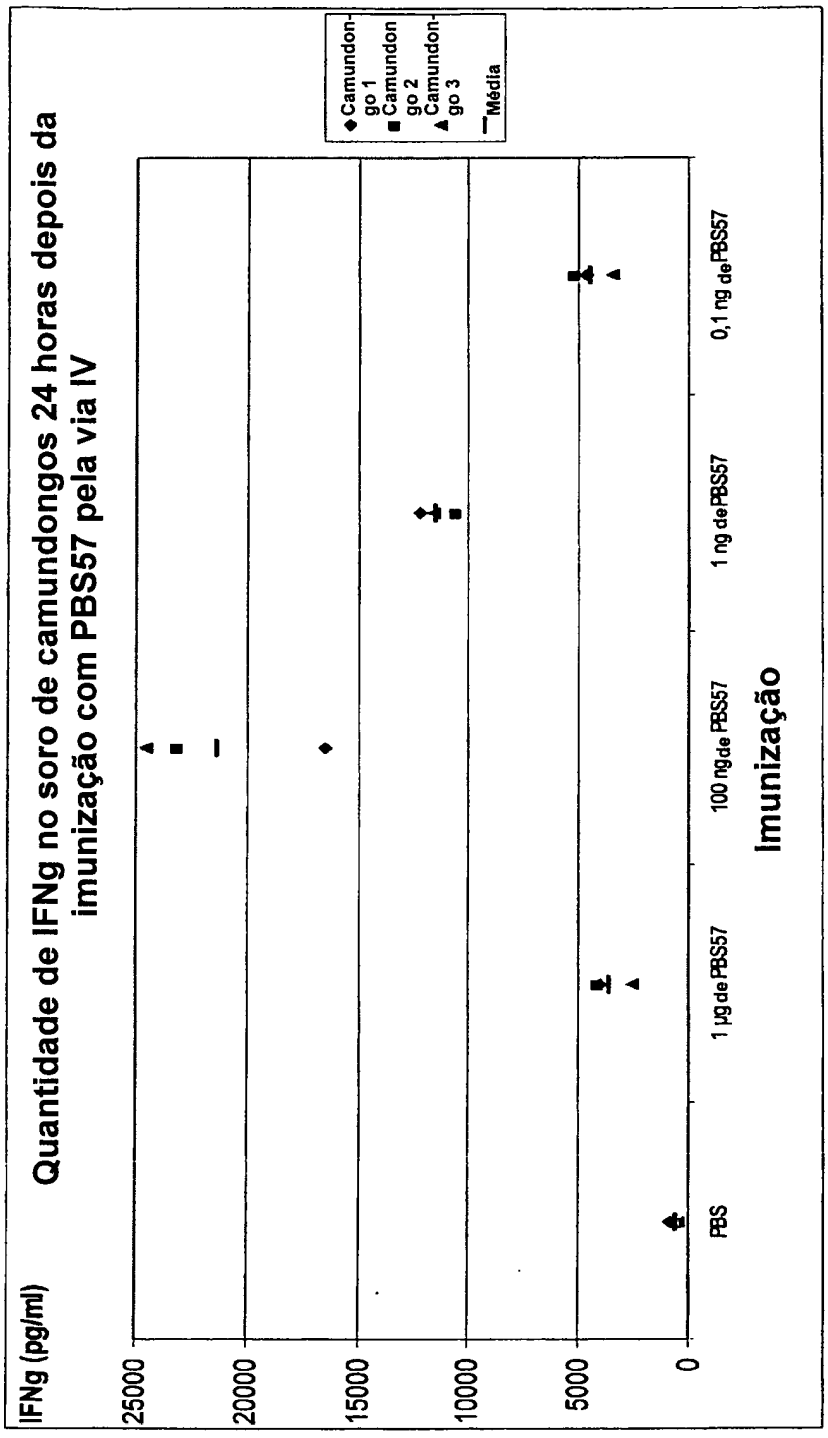

Quantidade de IFNg no soro de camundongos 24 horas depois da imunização com PBS57 pela via IV
IFNg (pg/ml)
25000
20000
15000
10000
5000
0
PBS
1 µg de PBS57
100 ng de PBS57
1 ng de PBS57
0,1 ng de PBS57
Imunização
Camundongo 1
Camundongo 2
Camundongo 3
Média

FIG. 4A

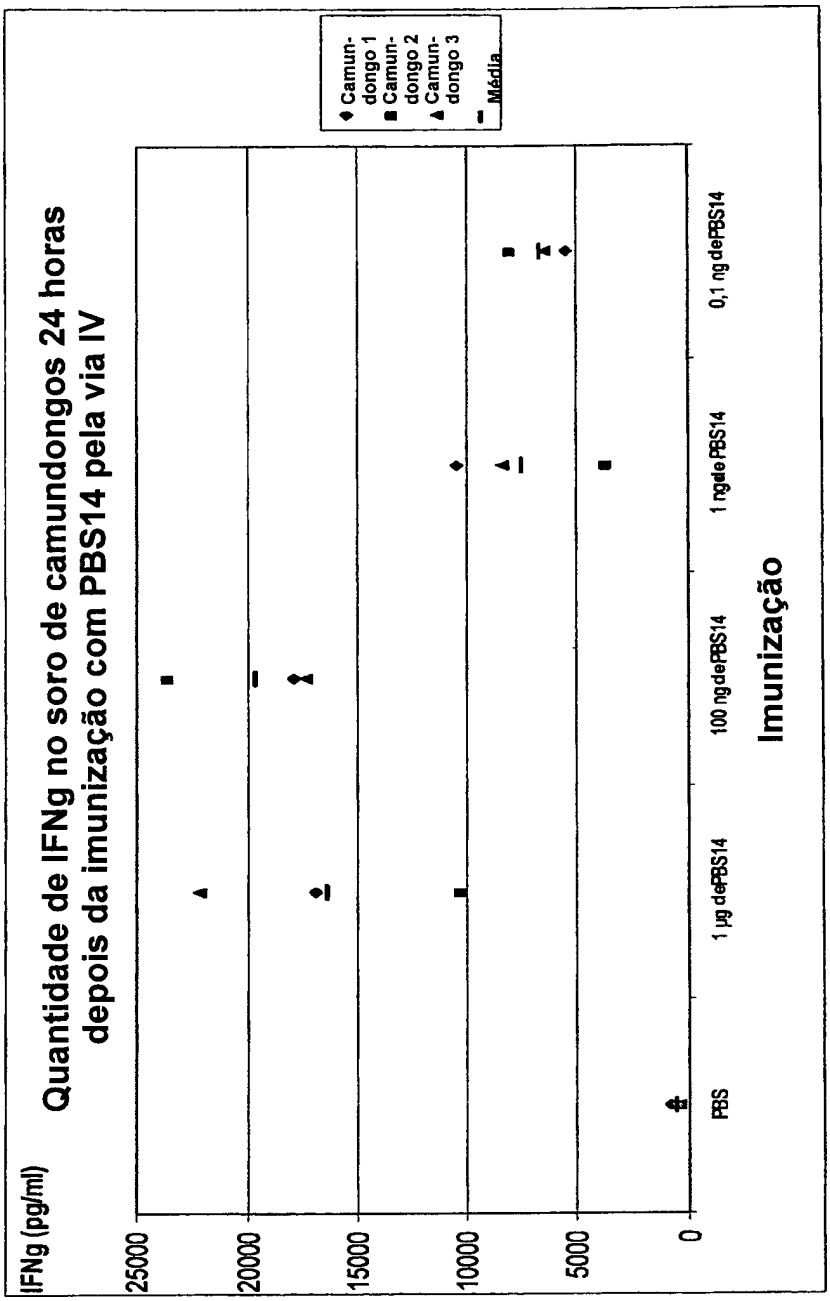

Quantidade de IFNg no soro de camundongos 24 horas depois da imunização com PBS14 pela via IV
IFNg (pg/ml)
25000
20000
15000
10000
5000
0
PBS
1 µg dePBS14
100 ngdePBS14
1 ngde PBS14
0,1 ng dePBS14
Imunização
Camundongo 1
Camundongo 2
Camundongo 3
Média

FIG. 4B

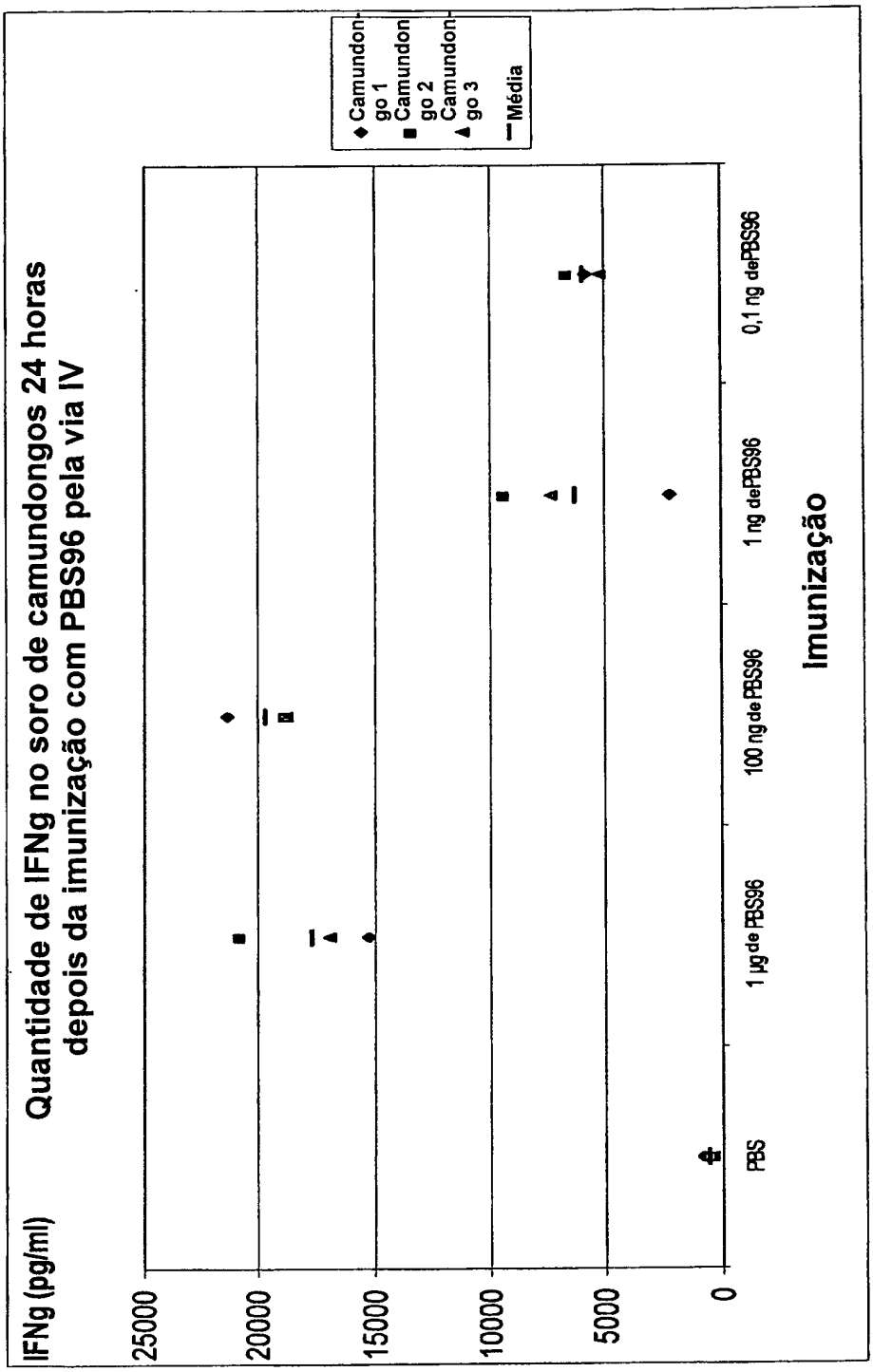

Quantidade de IFNg no soro de camundongos 24 horas depois da imunização com PBS96 pela via IV
IFNg (pg/ml)
25000
20000
15000
10000
5000
0
PBS
1 µg de PBS96
100 ng de PBS96
1 ng de PBS96
0,1 ng de PBS96
Imunização
Camundongo 1
Camundongo 2
Camundongo 3
Média

FIG. 4C

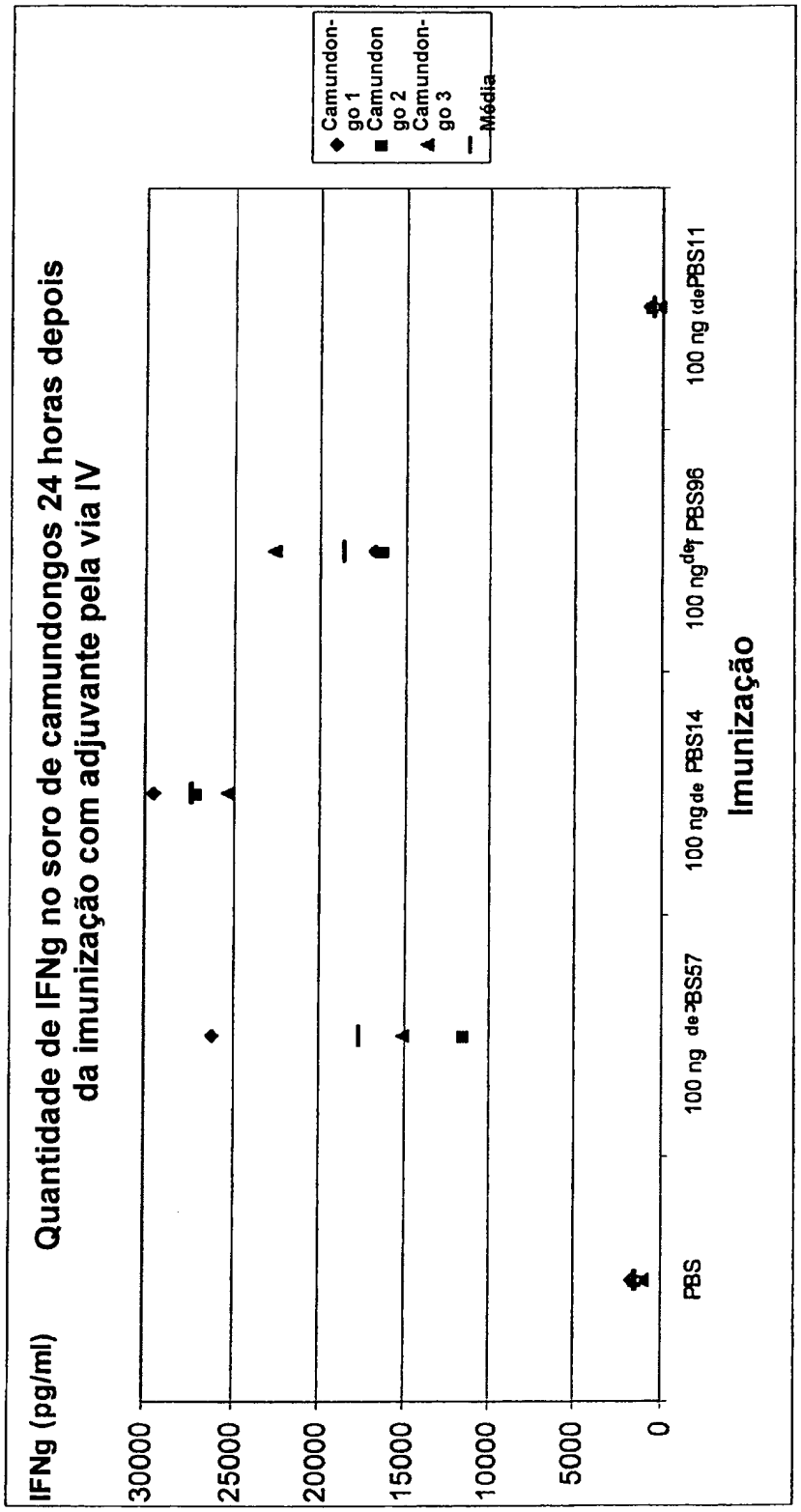

IFNg (pg/ml)
Quantidade de IFNg no soro de camundongos 24 horas depois da imunização com adjuvante pela via IV
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Camundongo 1
Camundongo 2
Camundongo 3
Média
PBS
100 ng de PBS57
100 ng de PBS14
100 ng de PBS96
100 ng de PBS11
Imunização

FIG. 5

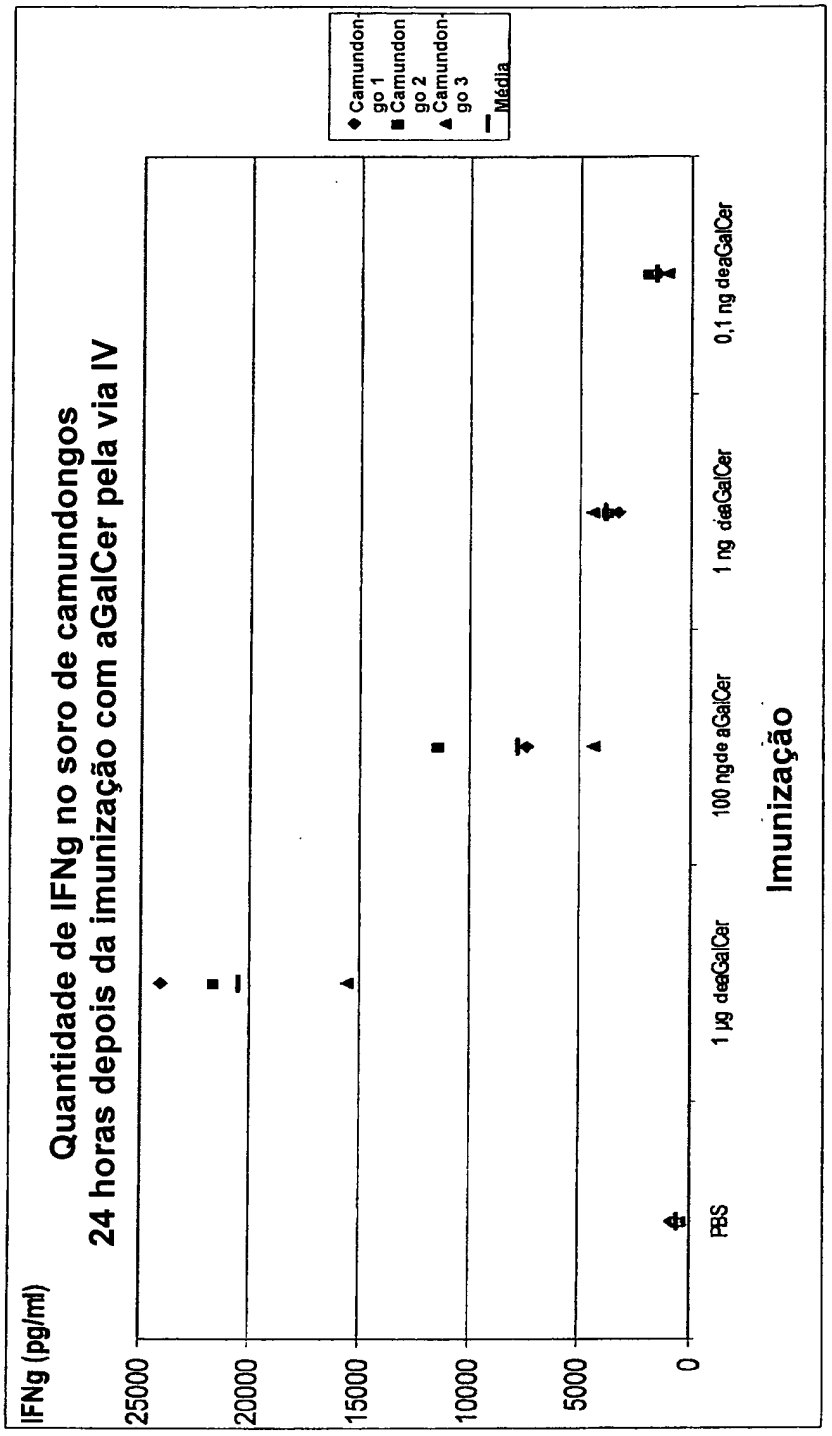

Quantidade de IFNg no soro de camundongos
24 horas depois da imunização com aGalCer pela via IV
IFNg (pg/ml)
25000
20000
15000
10000
5000
0
PBS
1 µg deaGalCer
100 ngde aGalCer
1 ng deaGalCer
0,1 ng deaGalCer
Imunização
Camundongo 1
Camundongo 2
Camundongo 3
Média

FIG. 4D

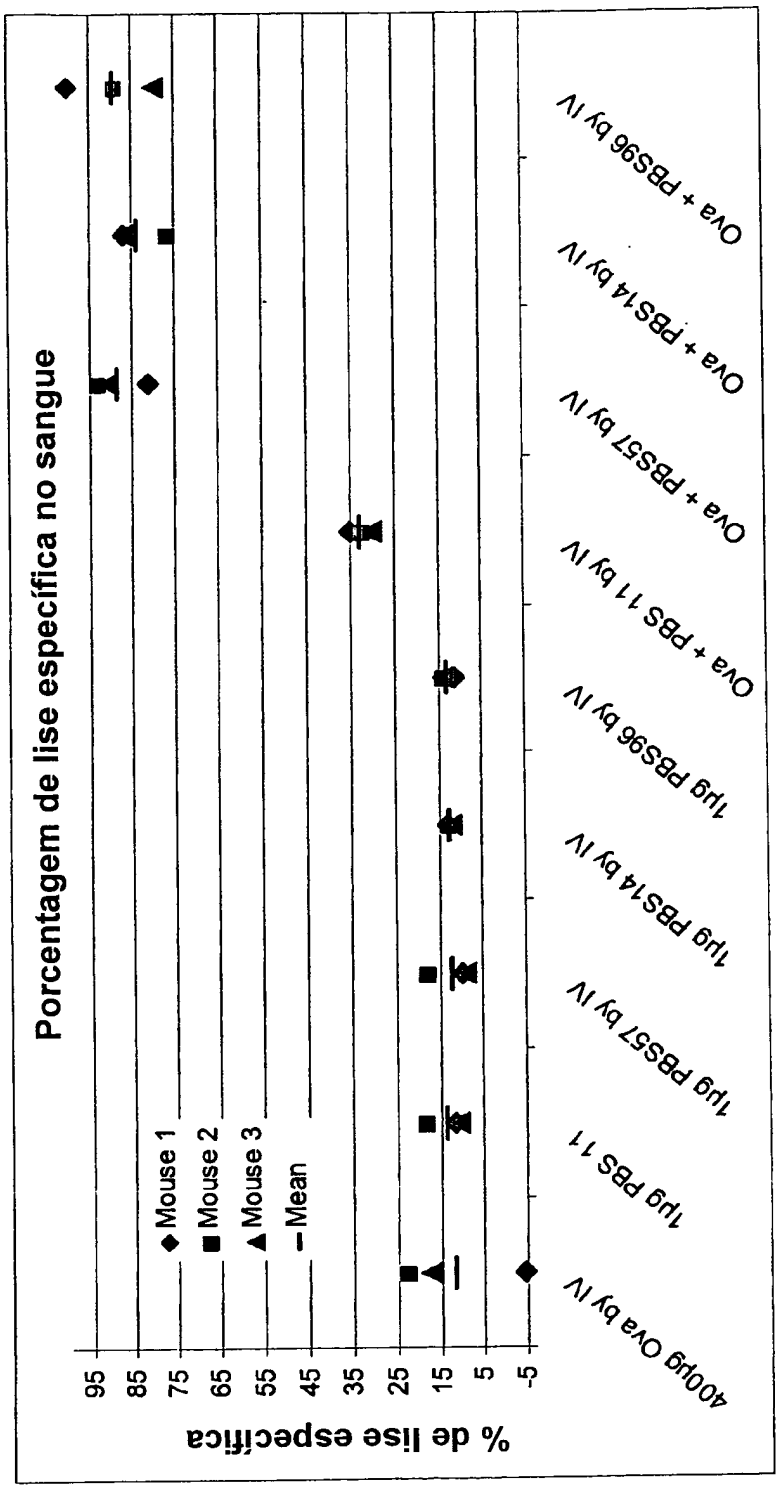

Porcentagem de lise específica no sangue
% de lise específica
95
85
75
65
55
45
35
25
15
5
-5
Mouse 1
Mouse 2
Mouse 3
Mean
400µg OVa by IV
1µg PBS 11
1µg PBS57 by IV
1µg PBS14 by IV
1µg PBS96 by IV
OVa + PBS 11 by IV
OVa + PBS57 by IV
OVa + PBS14 by IV
OVa + PBS96 by IV

FIG. 6

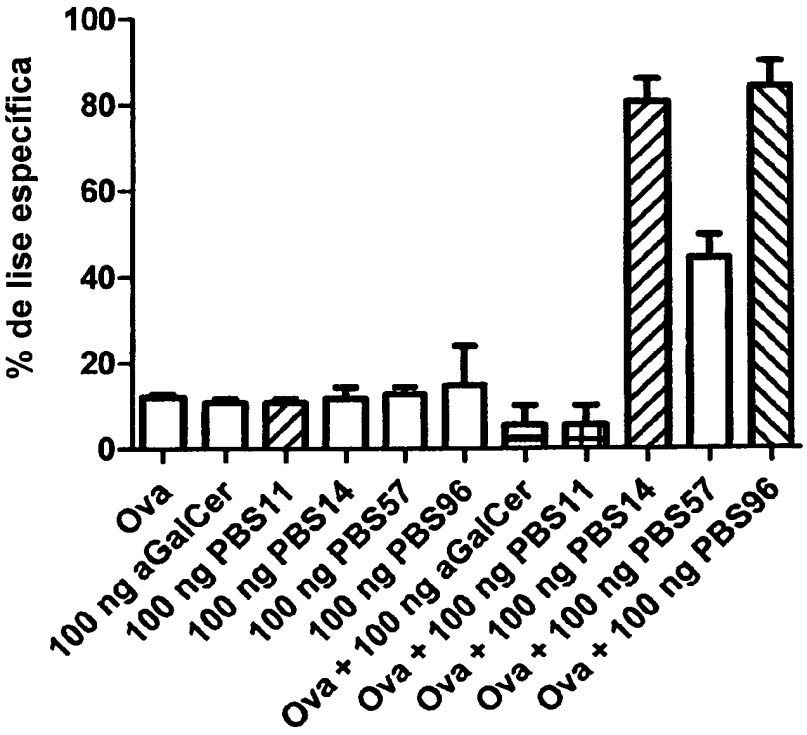

% de lise específica
100
80
60
40
20
0
Ova
100 ng aGalCer
100 ng PBS11
100 ng PBS14
100 ng PBS57
100 ng PBS96
Ova + 100 ng aGalCer
Ova + 100 ng PBS11
Ova + 100 ng PBS14
Ova + 100 ng PBS57
Ova + 100 ng PBS96

FIG. 7

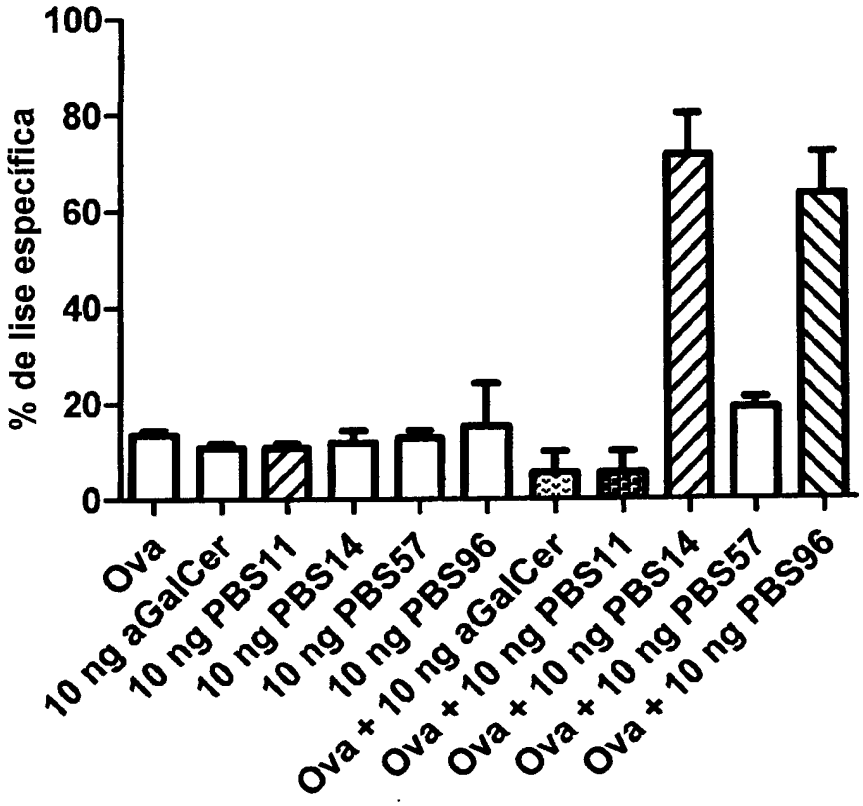

100
80
60
40
20
0
% de lise específica
Ova
10 ng aGalCer
10 ng PBS11
10 ng PBS14
10 ng PBS57
10 ng PBS96
Ova + 10 ng aGalCer
Ova + 10 ng PBS11
Ova + 10 ng PBS14
Ova + 10 ng PBS57
Ova + 10 ng PBS96

FIG. 8

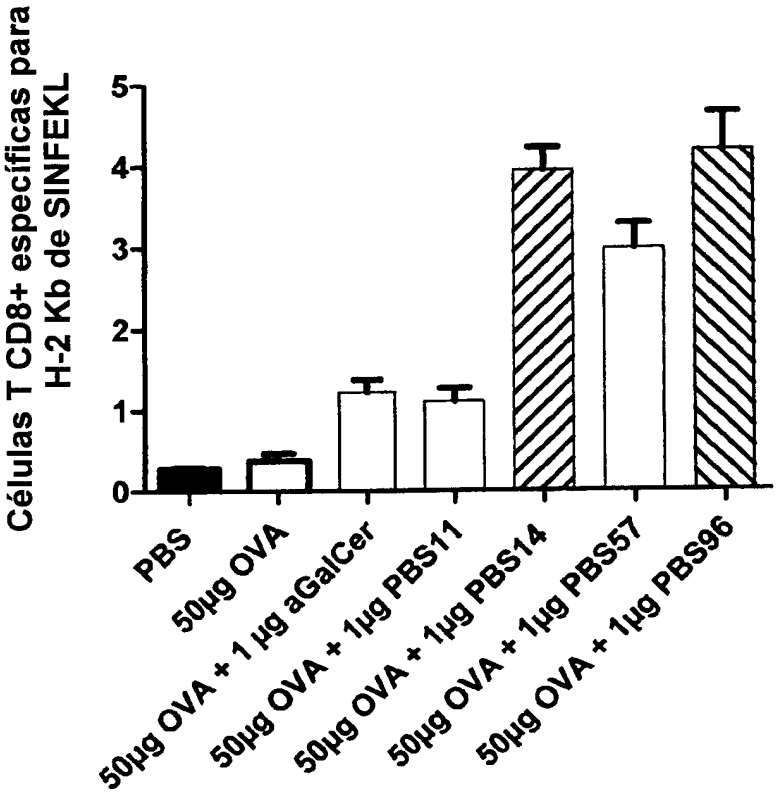

Células T CD8+ específicas para H-2 Kb de SINFEKL
0
1
2
3
4
5
PBS
50µg OVA
50µg OVA + 1 µg aGalCer
50µg OVA + 1µg PBS11
50µg OVA + 1µg PBS14
50µg OVA + 1µg PBS57
50µg OVA + 1µg PBS96
1 µg de adjuvante

FIG. 9

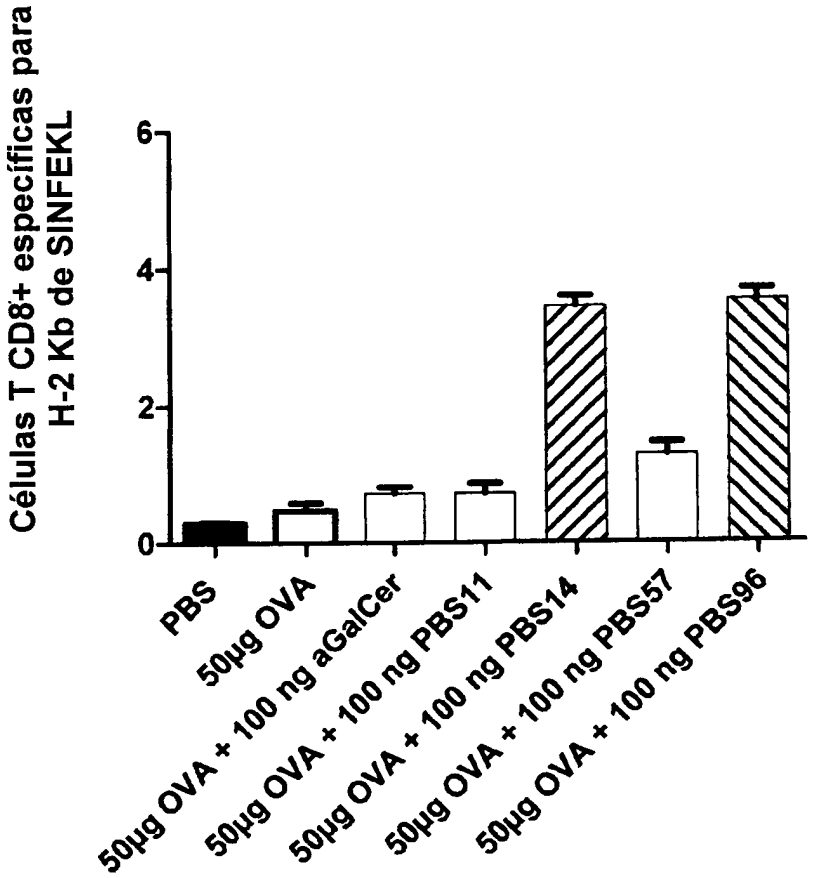

Células T CD8+ específicas para H-2 Kb de SINFEKL
6
4
2
0
PBS
50µg OVA
50µg OVA + 100 ng aGalCer
50µg OVA + 100 ng PBS11
50µg OVA + 100 ng PBS14
50µg OVA + 100 ng PBS57
50µg OVA + 100 ng PBS96

FIG. 10

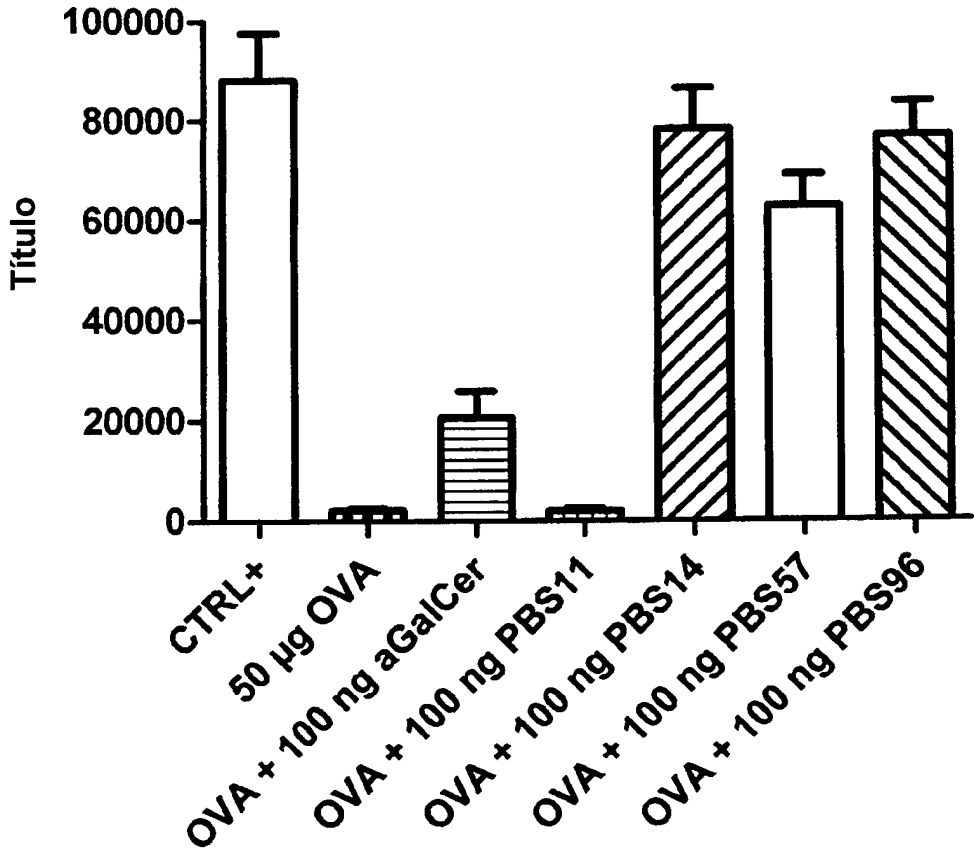

100000
80000
60000
40000
20000
0
Título
CTRL+
50 µg OVA
OVA + 100 ng aGalCer
OVA + 100 ng PBS11
OVA + 100 ng PBS14
OVA + 100 ng PBS57
OVA + 100 ng PBS96
Imunização com 50 µg de OVA

FIG. 11

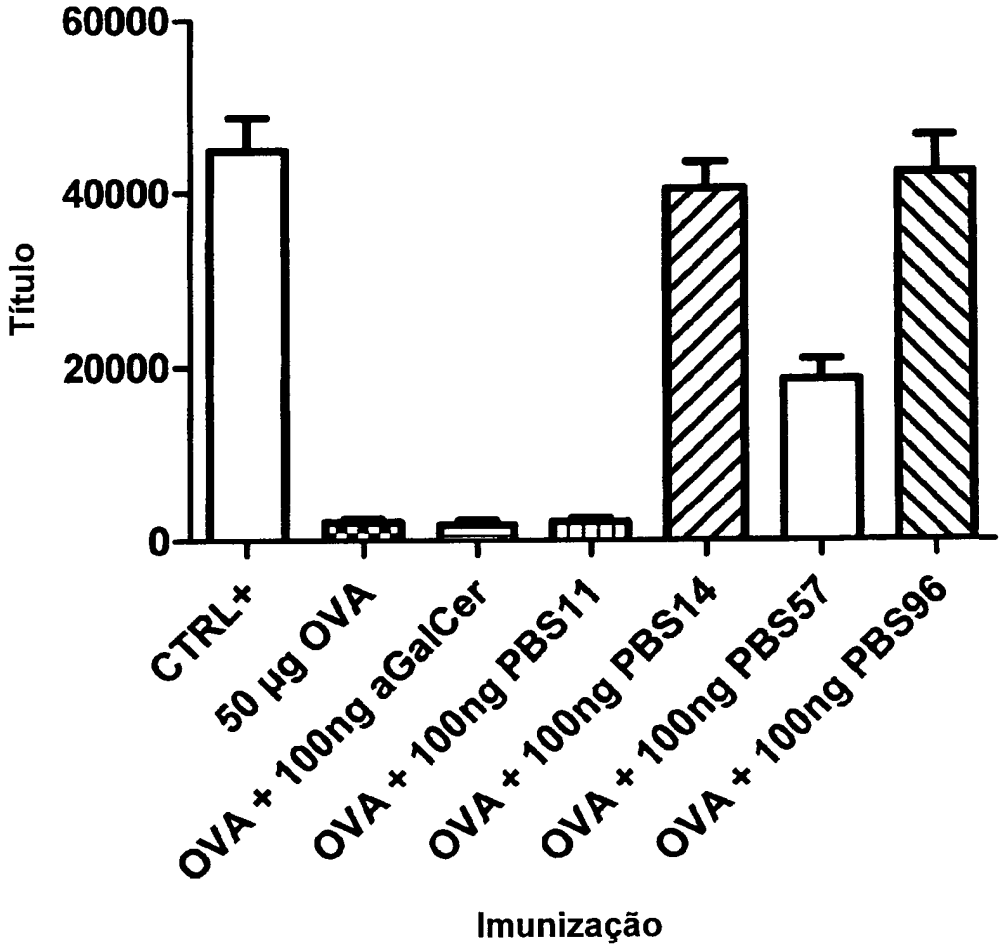
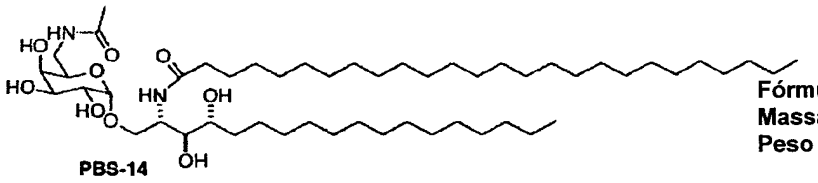
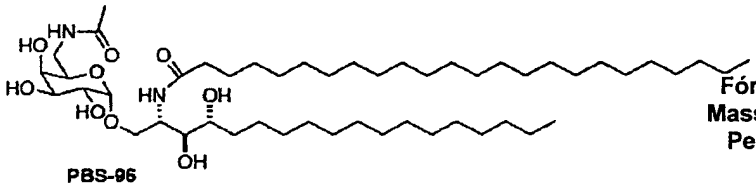

60000
40000
20000
0
Título
CTRL+
50 µg OVA
OVA + 100ng aGalCer
OVA + 100ng PBS11
OVA + 100ng PBS14
OVA + 100ng PBS57
OVA + 100ng PBS96
Imunização

FIG. 12



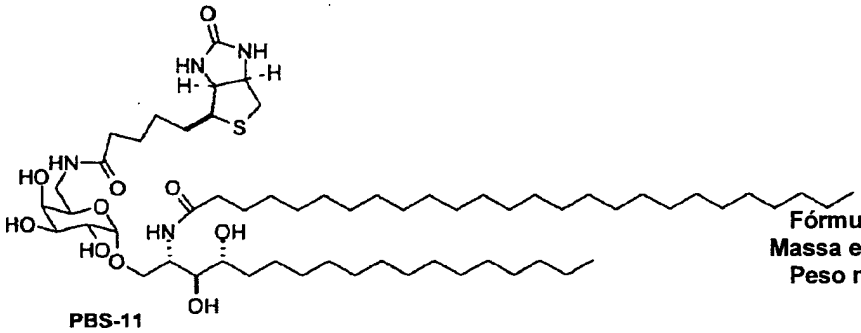
PBS-14

Fórmula química:: $C_{32}H_{102}N_2O_9$
Massa exata: 898.7585
Peso molecular: 899.3743



PBS-96

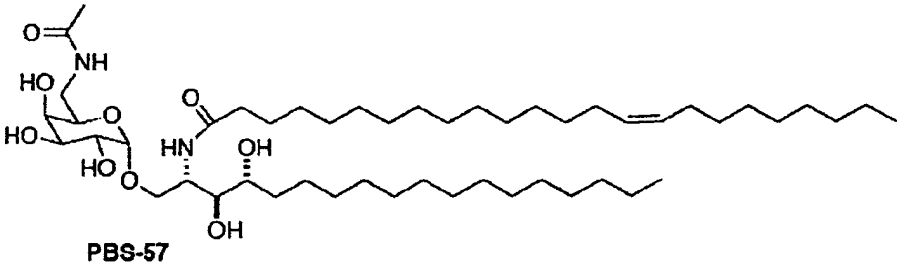
Fórmula química: $C_{50}H_{98}N_2O_9$
Massa exata: 870.7272
Peso molecular: 871.3211



PBS-11

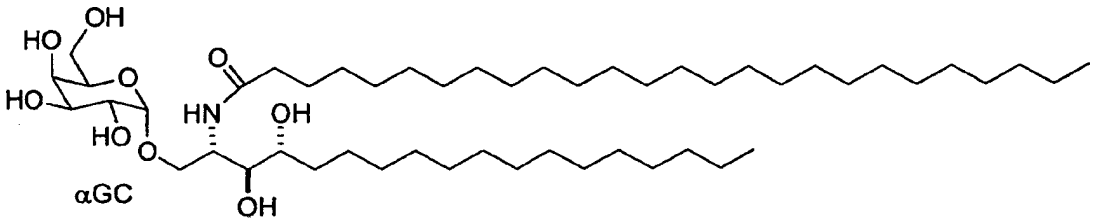
Fórmula química:$C_{60}H_{114}N_4O_{10}S$
Massa exata: 1082.83
Peso molecular: 1083.63

(Técnica anterior)



PBS-57

(Técnica anterior)



αGC

(Técnica anterior)

FIG. 13