



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

(11) PI 0517003-6 B1



(22) Data do Depósito: 16/10/2005

(45) Data de Concessão: 13/10/2021

(54) Título: COMBINAÇÃO COMPREENDENDO UM PRIMEIRO CONSTITUINTE E UM SEGUNDO CONSTITUINTE SEPARADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO DE FABRICAÇÃO DA MESMA

(51) Int.Cl.: A61K 39/39.

(30) Prioridade Unionista: 21/10/2004 EP 04 025096.1.

(73) Titular(es): VAKZINE PROJEKT MANAGEMENT GMBH.

(72) Inventor(es): ALBRECHT LÄUFER; BERND EISELE; LEANDER GRODE.

(86) Pedido PCT: PCT EP2005011127 de 16/10/2005

(87) Publicação PCT: WO 2006/045468 de 04/05/2006

(85) Data do Início da Fase Nacional: 20/04/2007

(57) Resumo: COMBINAÇÃO DE MYCOBACTERIUM RECOMBINANTE E UM AGENTE BIOLOGICAMENTE ATIVO COMO VACINA. A presente invenção refere-se a uma combinação compreendendo um primeiro constituinte e um segundo constituinte, em que o primeiro constituinte é uma célula bacteriana que compreende pelo menos uma molécula de ácido nucléico recombinante que codifique um peptídeo ou polipeptídeo de escape fagolisossômico, e em que o segundo constituinte é um agente biologicamente ativo.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"COMBINAÇÃO COMPREENDENDO UM PRIMEIRO CONSTITUINTE
E UM SEGUNDO CONSTITUINTE SEPARADO, COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA E MÉTODO DE FABRICAÇÃO DA MESMA".**

[001] A presente invenção refere-se a uma combinação compreendendo pelo menos dois constituintes, ao uso dessa combinação como uma composição farmacêutica, a seu uso para a fabricação de um medicamento, a métodos para o tratamento de um paciente usando essa combinação e a um método para a fabricação dessa combinação.

[002] A moderna medicina molecular focaliza intensamente o uso de compostos imunogênicos ou compostos moduladores do sistema imune de um paciente para o tratamento desse paciente. As respectivas doenças são, entre outras, tumores e doenças infecciosas.

[003] Em ambos os casos, compostos antigênicos, isto é, compostos que sejam adequados para provocar uma resposta imune ou fortalecer uma resposta imune são administrados ao organismo do paciente. A utilidade dos respectivos compostos é, entretanto, em muitos casos, limitada, o que requer um reforço da resposta imune para atingir um nível clinicamente relevante de eficiência e eficácia. Esse reforço pode ser realizado por administração repetida o respectivo agente ou por uso de um adjuvante.

[004] A técnica anterior apresenta vários adjuvantes, como óleos minerais, micobactérias inativadas, compostos de alumínio e outros.

[005] Os adjuvantes conhecidos na técnica, entretanto, nem sempre tem um desempenho de maneira suficiente para atender às necessidades médicas, em particular com relação a novos regimes de tratamento, como o uso de células que expressam citocinas conforme, por exemplo, descrito no pedido de patente internacional PCT/US94/01631.

[006] O problema subjacente à presente invenção é, portanto, o de apresentar composições, mais particularmente composições farmacêuticas, que compreendam pelo menos um primeiro constituinte e um segundo constituinte, em que o primeiro constituinte é um adjuvante e o segundo constituinte é um agente biologicamente ativo.

[007] Esse problema é resolvido, em um primeiro aspecto, por uma combinação compreendendo um primeiro constituinte e um segundo constituinte, em que o primeiro constituinte é uma célula bacteriana que compreende pelo menos uma molécula de ácido nucléico recombinante que codifica um peptídeo ou polipeptídeo de escape fagolisossômico, e em que o segundo constituinte é um agente biologicamente ativo.

[008] Em uma modalidade, a célula bacteriana é deficiente em urease.

[009] Em uma modalidade adicional, a célula bacteriana é uma célula de *Mycobacterium*.

[0010] Em uma modalidade preferida, a célula é uma célula de *Mycobacterium bovis*.

[0011] Em uma modalidade preferida, pelo menos um ácido nucléico codificador de subunidade de urease celular da célula bacteriana está inativado.

[0012] Em uma modalidade mais preferida, pelo menos uma sequência codificadora de subunidade C da urease bacteriana está inativada.

[0013] Em uma modalidade, o domínio de escape fagolisossômico é um domínio de escape fagolisossômico de *Listeria*.

[0014] Em uma modalidade, o domínio fagolisossômico é codificado por uma molécula de ácido nucléico selecionada do grupo que compreende:

a) uma sequência de nucleotídeos compreendendo os nucleotídeos 211 - 1.722 conforme mostrado na SEQ ID NO: 1;

b) uma sequência de nucleotídeos que codifique a mesma sequência de aminoácidos que a sequência de a); e

c) uma sequência de nucleotídeos que se hibridize sob condições rigorosas com a sequência de a) ou b).

[0015] Em uma modalidade, a célula bacteriana compreende pelo menos uma molécula de ácido nucléico recombinante que codifica um peptídeo ou polipeptídeo capaz de provocar uma resposta imune em um mamífero.

[0016] Em uma modalidade preferida, o peptídeo ou polipeptídeo é selecionado de auto-antígenos, antígenos tumorais, antígenos virais, antígenos de parasitas, antígenos bacterianos e seus fragmentos imunogênicos.

[0017] Em uma modalidade preferida adicional, o peptídeo ou polipeptídeo é parte de um polipeptídeo de fusão.

[0018] Em uma modalidade, o polipeptídeo de fusão compreende:

a) pelo menos um domínio de um polipeptídeo, em que o domínio de polipeptídeo é capaz de provocar uma resposta imune em um mamífero; e

b) um domínio de escape fagolisossômico.

[0019] Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo é o polipeptídeo conforme definido na reivindicação 9 ou parte dele.

[0020] Em uma modalidade preferida adicional, o domínio de escape fagolisossômico é um domínio do domínio de escape fagolisossômico conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 11.

[0021] Em uma modalidade preferida, a célula bacteriana é rBCG:Hly ou rBCG Δ ureC:Hly.

[0022] Em uma modalidade, o agente biologicamente ativo é uma célula eucariótica e, mais preferivelmente, uma célula eucariótica geneticamente manipulada que expresse uma citocina.

[0023] Em uma modalidade preferida, a citocina é selecionada do grupo que compreende interleucina-2, interleucina-4, interleucina-12 e interferon-gama.

[0024] Em uma modalidade mais preferida, a célula co-expressa duas ou mais citocinas.

[0025] Em uma modalidade ainda mais preferida, a célula co-expressa IL-2 e interferon-gama.

[0026] Em uma modalidade preferida, a célula é autóloga com relação a um sujeito ao qual a célula e/ou a composição seja administrada ou deva ser administrada.

[0027] Em uma modalidade alternativa preferida, a célula é alogênica com relação a um sujeito ao qual a célula e/ou a composição seja administrada ou deva ser administrada.

[0028] Em uma modalidade preferida, a célula é selecionada do grupo que compreende células apresentadoras de antígenos não-profissionais, células apresentadoras de antígenos profissionais, células tumorais e células dendríticas.

[0029] Em uma modalidade mais preferida, a célula tumoral é uma célula de um tumor imunogênico, e em que as células tumorais são, de preferência, selecionadas do grupo que compreende células de melanoma, células de carcinoma renal, células de tumor de mama, células de tumor cerebral, células de tumor de próstata, câncer de pulmão de células não pequenas, carcinoma de cólon, tumor escamoso de cabeça e pescoço.

[0030] Em uma modalidade preferida, a célula é uma célula alogênica e corresponde a HLA classe I.

[0031] Em outra modalidade preferida, a célula expressa outra imunomolécula selecionada do grupo que compreende uma citocina, uma molécula de adesão, um fator co-estimulador, um antígeno associado a tumor, um antígeno específico para tumor e um antígeno de parasita.

[0032] Em uma modalidade mais preferida, o antígeno de parasita é a proteína gp190/MSP1 de *Plasmodium*, de preferência *Plasmodium falciparum*, ou seu fragmento capaz de provocar uma resposta imune em um mamífero.

[0033] Em uma modalidade preferida, o agente biologicamente ativo é a proteína gp190/MSP1 de *Plasmodium*, de preferência *Plasmodium falciparum*, ou seu fragmento capaz de provocar uma resposta imune em um mamífero.

[0034] Em uma modalidade, o agente biologicamente ativo é o citomegalovírus humano.

[0035] Em uma modalidade preferida, o agente biologicamente ativo é uma partícula viral ou uma multidão delas, de preferência liberadas após a infecção de células de mamíferos por citomegalovírus humano, em que as partículas (a) estão envolvidas por uma membrana lipídica em que as glicoproteínas virais estejam incrustadas, e (b) não contêm DNA nem capsídeos virais.

[0036] Em uma modalidade preferida, as partículas contêm uma proteína de fusão compreendendo uma ou mais partes do antígeno de células T pp65 (UL83) e uma ou mais partes de uma ou mais proteínas que não sejam pp65.

[0037] Em uma modalidade preferida, o antígeno de células T pp65 é fusionado a uma ou mais partes de uma glicoproteína do citomegalovírus humano, em que a glicoproteína é selecionada do grupo que compreende a glicoproteína de HCMV gH, a proteína de HCMV IE₁ (ppUL123) e a glicoproteína de HCMV gB.

[0038] Em uma modalidade preferida, o antígeno de células T é fusionado a uma ou mais partes de uma proteína que seja parte de um patógeno humano diferente do HCMV.

[0039] Em uma modalidade preferida, o patógeno é selecionado do grupo que compreende HIV-1, HBV, HCV e influenza.

[0040] Em uma modalidade preferida, a(s) partícula(s) contém(êm) partes de pelo menos duas glicoproteínas que sejam variantes de uma glicoproteína particular de diferentes cepas de HCMV.

[0041] Em uma modalidade mais preferida, uma das duas variantes da glicoproteína de HCMV particular é a variante da cepa Towne de HCMV, e a outra é a variante da cepa Ad169 de HCMV.

[0042] Em uma modalidade preferida, as células de mamíferos são fibroblastos, de preferência fibroblastos de prepúcio.

[0043] Em uma modalidade preferida, a partícula é um corpo denso.

[0044] Em uma modalidade preferida, o agente biologicamente ativo é um corpo denso, de preferência um corpo denso de HCMV ou um corpo denso conforme aqui definido.

[0045] Em uma modalidade, o agente biologicamente ativo é um antígeno de *Mycobacterium*, de preferência *Mycobacterium ssp*.

[0046] Em uma modalidade preferida, o *Mycobacterium* é selecionado do grupo que compreende *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. africanum* e *M. paratuberculosis*.

[0047] Em uma modalidade preferida, o antígeno é o antígeno 85.

[0048] Em um segundo aspecto, o problema subjacente à presente invenção é resolvido por uma composição, de preferência uma composição farmacêutica, compreendendo uma combinação de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção e, opcionalmente, um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0049] Em um terceiro aspecto, o problema subjacente à presente invenção é resolvido pelo uso de uma combinação de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção, ou uma combinação de acordo com o segundo aspecto da presente invenção, ou cada um dos constituintes dessa combinação para a fabricação de um medicamento.

[0050] Em uma modalidade, o medicamento é para a prevenção e/ou tratamento de uma doença selecionada do grupo que compreende

câncer e doenças infecciosas.

[0051] Aqueles versados na técnica reconhecerão que a composição da presente invenção e seus constituintes também podem, isoladamente ou em combinação, de preferência ser usados para a prevenção de uma doença. Isso, em modalidades preferidas, baseia-se no fato de que o primeiro constituinte da combinação de acordo com a presente invenção é adequado para provocar uma resposta imune e, mais particularmente, uma resposta imune específica, que permite ao corpo do respectivo ser humano ou animal combater a doença antes de uma manifestação da doença e, mais especificamente, antes de uma manifestação clínica ou medicamento relevante das doenças.

[0052] Em uma modalidade preferida, o câncer é um tumor imunogênico, em que o tumor é, de preferência, selecionado do grupo que compreende câncer de próstata, melanoma, carcinoma renal, tumor de mama, tumores cerebrais, câncer de pulmão de células não pequenas, carcinoma de cólon e tumor escamoso de cabeça e pescoço.

[0053] Em uma modalidade alternativa, a doença infecciosa é malária.

[0054] Em uma modalidade preferida, o agente biologicamente ativo é a proteína gp190/MSP1 de *Plasmodium* ou seu fragmento capaz de provocar uma resposta imune em um mamífero.

[0055] Em uma modalidade alternativa, a doença infecciosa é infecção por HCMV, de preferência infecção por HCMV humano. Em uma modalidade preferida, o agente biologicamente ativo é um corpo denso conforme aqui exposto.

[0056] Em uma modalidade alternativa, a doença infecciosa é tuberculose. Em uma modalidade preferida, o agente biologicamente ativo é um antígeno de *Mycobacterium*, de preferência *Mycobacterium* ssp. Mais preferivelmente, o *Mycobacterium* é selecionado do grupo que compreende *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. africanum* e *M.*

paratuberculosis. Ainda mais preferivelmente, o antígeno é o antígeno 85.

[0057] Em um quarto aspecto, o problema subjacente à presente invenção é resolvido pelo uso de uma combinação de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção ou de cada um dos constituintes dessa combinação para a fabricação de uma vacina.

[0058] Em um quinto aspecto, o problema subjacente à presente invenção é resolvido por um método para o tratamento de um paciente que sofra de uma doença e necessite desse tratamento, compreendendo a administração de uma combinação de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção ou de uma combinação farmacêutica de acordo com o segundo aspecto da presente invenção.

[0059] Em um sexto aspecto, o problema subjacente à presente invenção é resolvido por um método para a fabricação de uma combinação farmacêutica, de preferência uma composição farmacêutica de acordo com o segundo aspecto da presente invenção, compreendendo as etapas de:

- fornecimento, como primeiro constituinte, de uma célula bacteriana que compreende pelo menos uma molécula de ácido nucléico recombinante que codifique um peptídeo ou polipeptídeo de escape fagolisossômico;

- fornecimento, como segundo constituinte, de um agente biologicamente ativo; e

- formulação do primeiro constituinte e segundo constituinte em uma composição farmacêutica.

[0060] Em um sétimo aspecto, o problema subjacente à presente invenção é resolvido por um método para a fabricação de uma combinação farmacêutica, de preferência uma composição farmacêutica de acordo com o segundo aspecto da presente invenção, compreendendo as etapas de:

- fornecimento, como primeiro constituinte, de uma célula bacteriana que compreenda pelo menos uma molécula de ácido nucléico recombinante que codifique um peptídeo ou polipeptídeo de escape fagolisossômico;
- fornecimento, como segundo constituinte, de um agente biologicamente ativo; e
- formulação do primeiro e segundo constituintes separadamente.

[0061] Em uma modalidade, o primeiro constituinte formulado e o segundo constituinte formulado são embalados em uma única embalagem.

[0062] Alternativamente, o primeiro constituinte formulado e o segundo constituinte formulado são embalados em embalagens separadas.

[0063] Em uma modalidade mais preferida, as embalagens são unidades de dosagem única ou compreendem múltiplas unidades de dosagem única.

[0064] Os presentes inventores descobriram, surpreendentemente, que uma célula bacteriana, que pode ser uma célula bacteriana Gram-positiva ou Gram-negativa que expresse um peptídeo ou polipeptídeo de escape fagolisossômico, é um adjuvante particularmente útil, que pode ser usado em combinação com um agente biologicamente ativo. Mais particularmente, os presentes inventores reconheceram que *Mycobacterium bovis*, de preferência *Mycobacterium bovis* Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) e, mais preferivelmente, *Mycobacterium* como BCG que codifique ou expresse um peptídeo ou polipeptídeo de escape fagolisossômico, é um meio adequado para provocar uma resposta imune ou reforçar a resposta imune, particularmente mediada, quando se usam agentes biologicamente ativos e, mais particularmente, outros agentes biologicamente ativos de provocação imune. Um tipo particularmente preferido de

agentes biologicamente ativos provocadores de resposta imune é uma célula que expresse pelo menos uma citocina ou um antígeno de parasita, ou um antígeno tumoral ou de parasita ou um antígeno viral.

[0065] Sem desejarem se limitar a qualquer teoria, os presentes inventores são de opinião de que esse peptídeo ou polipeptídeo de escape fagolisossômico permite que quaisquer antígenos derivados da célula bacteriana ou do agente biologicamente ativo e adequados para provocar uma resposta imune sejam mais eficientes para fazê-lo, uma vez que esteja disponível esse peptídeo de escape fagolisossômico. Em outras palavras, ao permitir que os antígenos criados pelo aprisionamento da célula bacteriana nos fagolisossomos escapem deles e, portanto, se apresentem ao sistema imune, aumenta-se o acesso a antígenos específicos de BCG e, dessa forma, cria-se o efeito adjuvante superior usado com relação à presente invenção.

[0066] O tipo de distribuição de peptídeos na via de apresentação MHC classe I pode potencializar a resposta imune específica para BCG já existente e sua atividade adjuvante.

[0067] O efeito adjuvante de BCG e, mais particularmente, de BCG ou qualquer microrganismo, de preferência qualquer organismo *Mycobacterium*, que codifique ou expresse um peptídeo ou polipeptídeo de escape fagolisossômico é um achado surpreendente adicional dos presentes inventores, que pode ser, de preferência, utilizado quando esse microrganismo causador de efeito adjuvante é combinado ou co-administrado com um segundo agente biologicamente ativo ou adicional. Diferentemente de outros adjuvantes que estimulam uma resposta imune TH2, o adjuvante acima descrito, isto é, microrganismo, pode ser usado para provocar uma resposta imune TH1. Essa resposta imune TH1 é útil na medida em que induz uma resposta imune celular. Consequentemente, em um aspecto adicional, a invenção se refere ao uso de um microrganismo que codifique e/ou expresse um peptídeo de

escape fagolisossômico, em que o microrganismo é, de preferência BCG e, mais preferivelmente, BCG conforme aqui descrito e, o mais preferivelmente, um BCG ure C-deficiente, como um adjuvante.

[0068] Ainda mais surpreendentemente, os presentes inventores descobriram que um microrganismo, de preferência BCG ou seus derivados, que codifique e/ou expresse um peptídeo de escape fagolisossômico e, mais preferivelmente, BCG conforme aqui descrito em suas várias modalidades, incluindo, mas não limitados a, rBCG:Hly e, o mais preferivelmente, um BCG ure C-deficiente, como BCG: rBCG Δ ureC: Hly e seus derivados, é superior a BCG sem um peptídeo de escape fagolisossômico, na medida em que seja capaz de induzir uma pronunciada resposta de CD8 que seja específica para o respectivo microrganismo, como *Mycobacterium* e, além disso, também uma pronunciada resposta de CD8 que seja específica para o antígeno representado por ou dado como o agente biologicamente ativo, conforme aqui exposto e/ou definido. Em outras palavras, o microrganismo aqui usado como ou citado como o primeiro constituinte, nesta modalidade, isto é, compreendendo um peptídeo de escape fagolisossômico e, mais preferivelmente, além disso, sendo ureC negativo, não se limita a provocar a resposta imune de CD8 específica para o microrganismo, em contraste com o que aqueles versados na técnica esperariam.

[0069] Em uma modalidade preferida, esse peptídeo ou polipeptídeo de escape fagolisossômico é o polipeptídeo de escape fagolisossômico de *L. monocytogenes*, listeriolisina (Hly). A listeriolisina é uma citolisina ativada por sulfidril formadora de poros e é responsável pela liberação de microrganismos *L. monocytogenes* dos vacúolos fagolisossômicos no citosol de células hospedeiras. Essa função de escape pode ser transferida para várias células bacterianas, como *Bacillus subtilis*, cepas atenuadas de *Salmonella ssp.* e *Mycobacterium*

também, conforme descrito no pedido de patente internacional PCT/EP2004/004345. Da mesma forma, o pedido de patente internacional WO 99/101496 apresenta cepas recombinantes de *Mycobacterium bovis* que secretam proteínas de fusão com listeriolisina biologicamente ativas. A célula bacteriana formadora do primeiro constituinte da composição de acordo com a presente invenção exibe, portanto, um mecanismo de formação de poros para perfurar membranas endossômicas, levando a uma imunoproteção superior.

[0070] Aqueles versados na técnica reconhecerão que há vários domínios de escape fagolisossômico, pelo que se prefere o domínio de escape fagolisossômico de listeria que é descrito, por exemplo, na patente norte-americana nº 5.733.151. Mais preferivelmente, o domínio de escape fagolisossômico é derivado do organismo *L. monocytogenes*, mais preferivelmente, o domínio de escape fagolisossômico é codificado por uma molécula de ácido nucléico selecionada de a) uma sequência de nucleotídeos compreendendo os nucleotídeos 211 - 1.722 conforme mostrados na SEQ ID NO: 1, b) uma sequência de nucleotídeos que codifique a mesma sequência de aminoácidos que a sequência de a), e c) uma sequência de nucleotídeos que se hibridize sob condições rigorosas com a sequência de a) ou b). Outros polipeptídeos de escape fagolisossômico que podem ser usados com essa finalidade são, entre outros, hemolisina (perfringolisina) de *Clostridium perfringens* (O'Brien D. K. *et al.*, Infect. Immun. setembro de 2004; 72(9):5204-15); hemolisina de *Vibrio*, mais particularmente *Vibrio vulnificus* (Lee S. E. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 5 de novembro de 2004; 324(1):86-91); hemolisina/citolisina de estreptococos do grupo B (Liu G. Y. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 5 de outubro de 2004; 101(40):14491-14496. Epub 20 de setembro de 2004); hemolisina BL de *Bacillus*, mais particularmente *Bacillus cereus* (Moravek M. *et al.*, FEMS Microbiol. Lett. 1º de setembro de 2004; 238(1):107-13); hemolisina de

Bordetella, mais particularmente *Bordetella pertusis* (Bassin L. *et al.*, Infect. Immun. setembro de 2004; 72(9):5530-3); hemolisina de *Escherichia coli* (Wyborn N. R. *et al.*, Microbiology maio de 2004; 150(Pt 5):1495-505) e hemolisina de *Shigella* (Sharma K. *et al.*, Microbios. 2001; 106(413):31-8).

[0071] Além da sequência de nucleotídeos representada na SEQ ID NO: 1, a presente invenção também compreende sequências de ácidos nucleicos que se hibridizam com elas. Na presente invenção, o termo “hibridização” é usado conforme definido em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101-1.104). De acordo com a presente invenção, o termo “hibridização” é usado se um sinal de hibridização positivo ainda puder ser observado após lavagem durante uma hora com 1 X SSC e 0,1% de SDS a 55°C, de preferência a 62°C e, mais preferivelmente, a 68°C. Uma sequência que se hibridiza com uma sequência de nucleotídeos como a SEQ ID NO: 1 sob essas condições de lavagem é uma sequência de nucleotídeos codificadora de domínio de escape fagolisossômico preferida pela presente invenção.

[0072] Uma sequência de nucleotídeos que codifique um domínio de escape fagolisossômico conforme acima descrito pode ser obtida diretamente de um organismo *Listeria* ou de qualquer fonte recombinante, por exemplo, uma célula de *E. coli* recombinante contendo a molécula de ácido nucleico de *Listeria* correspondente ou sua variante, conforme acima descrito.

[0073] Deve-se reconhecer que essa célula bacteriana compreendendo pelo menos uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifique um peptídeo de escape fagolisossômico e, mais particularmente, essa célula bacteriana sendo uma célula de *Mycobacterium* compreendendo Hly é particularmente preferido para a composição de acordo com a presente invenção. Em uma modalidade preferida

adicional, a dita célula bacteriana é, além disso, deficiente de urease, mais particularmente, ureC deficiente. Esse organismo também é chamado de BCG: rBCG Δ ureC: Hly ou de BKG.

[0074] *Mycobacterium* e, mais particularmente, *Mycobacterium bovis* Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) tem sido amplamente usado como vacina viável para a prevenção de tuberculose, embora sua eficácia ainda seja questionável. Todavia, concorda-se que o BCG possa proteger contra, ou pelo menos melhorar, formas graves de tuberculose sistêmica em crianças.

[0075] Entretanto, novas formas de BCG foram agora desenvolvidas. Os presentes inventores descobriram que essas novas formas de BCG são particularmente úteis como adjuvantes, quando administradas juntamente com um agente biologicamente ativo e podem, portanto, ser usadas como o primeiro constituinte da combinação de acordo com a presente invenção.

[0076] A célula bacteriana que é usada como o primeiro constituinte da combinação de acordo com a presente invenção é, de preferência, deficiente de urease. Esse traço resulta em um perfil de segurança aumentado pois, por causa da deficiência de ureia, a célula micobacteriana não sobreviveria em um ambiente em que essa atividade enzimática fosse requerida, como no fagolisossomo.

[0077] A deficiência de urease pode ser conseguida por inativação parcial ou completa de uma ou várias moléculas de ácidos nucleicos celulares que codifiquem uma subunidade da urease, particularmente ureA que codifica a subunidade A da urease, ureB que codifica a subunidade B da urease e/ou ureC que codifica a subunidade C da urease. As sequências de ureA, ureB e ureC em *Mycobacteria*, particularmente *M. bovis* e *M. tuberculosis* e as proteínas por elas codificadas são descritas por Reyrat *et al.* (1995) e Clemens *et al.* (1995), que são aqui incorporados por referência.

[0078] De preferência, a cepa bacteriana deficiente de urease é obtida por deleções e/ou inserções de um ou vários nucleotídeos nas sequências de ácidos nucleicos codificadoras de subunidades da urease e/ou nas sequências de controle de expressão. Deleções e/ou inserções podem ser geradas por recombinação homóloga, inserção de transposon ou outros métodos adequados.

[0079] Em uma modalidade particularmente preferida, a sequência de ureC é inativada, por exemplo, por construção de um vetor suicida contendo um gene ureC rompido por um gene marcador de seleção, transformação da célula alvo com o vetor e triagem de células positivas para o marcador de seleção com um fenótipo urease negativo, conforme descrito por Reyrat *et al.* (supra).

[0080] De acordo com a presente invenção, várias espécies de *Mycobacterium* podem ser usadas como a célula bacteriana formadora do primeiro constituinte da composição de acordo com a presente invenção, a saber, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. smegmatis*, *M. canettii*, *M. marinum* ou *M. fortuitum*. Também está dentro da presente invenção que se possam usar outros microrganismos, de preferência microrganismos intracelulares, que exibam uma das ou ambas as características acima mencionadas, a saber, codifiquem ou expressem um peptídeo ou polipeptídeo de escape fagolisossômico e sejam urease negativos, mais particularmente ureC negativos.

[0081] Em uma modalidade adicional, a respectiva célula bacteriana é atenuada. Em uma modalidade mais preferida, a célula bacteriana é atenuada, mas ainda está viva e é mais particularmente adequada para provocar uma resposta TH1.

[0082] Em uma modalidade mais preferida, a respectiva célula bacteriana é uma célula bacteriana viva.

[0083] Em uma modalidade adicional, a célula bacteriana também compreende pelo menos uma molécula de ácido nucleico recombinante

que codifique um peptídeo ou polipeptídeo capaz de provocar uma resposta imune em um mamífero. Conforme aqui usado, o termo provocar uma resposta imune em um mamífero significa que, por exposição desse peptídeo ou polipeptídeo ao sistema imune de um mamífero ou de parte dele, pode-se criar uma resposta imune que seja uma resposta imune mediada por células B. Alternativamente, entretanto, a resposta imune é uma resposta imune mediada por células T, mais preferivelmente uma resposta de células T CD8 MHC de classe 1 restrita.

[0084] Mais preferivelmente, esse peptídeo ou polipeptídeo é selecionado do grupo que compreende auto-antígenos, antígenos tumorais, antígenos virais, antígenos de parasitas, antígenos bacterianos e seus fragmentos imunogênicos. De preferência, um fragmento imunogênico é parte desse antígeno que ainda seja capaz de provocar uma resposta imune. Um antígeno particularmente preferido é a proteína gp190/MSP1 de *Plasmodium*, conforme aqui descrito em maiores detalhes. Um antígeno viral particularmente preferido adicional é o corpo denso de HCMV, conforme aqui descrito em maiores detalhes. Ainda um antígeno adicional são antígenos adequados para provocar uma resposta imune contra tuberculose e, mais especificamente, contra *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. africanum* e *M. paratuberculosis*. Um antígeno particularmente preferido é o antígeno 85. Esse antígeno é, em uma modalidade preferida, o segundo constituinte.

[0085] Aqueles versados na técnica reconhecerão que, sempre que aqui for feita referência a um antígeno, esse termo também compreende seus fragmentos ou formas com mutação. Seus fragmentos e formas com mutação são considerados como o respectivo antígeno, contanto que essa sua forma com mutação ou fragmento exiba pelo menos uma característica do antígeno de comprimento total ou tipo selvagem. De

preferência, essa característica é sua capacidade de provocar uma resposta imune, mais preferivelmente uma resposta imune quando usado juntamente com ou em combinação com o primeiro constituinte ou um adjuvante conforme aqui descrito. Em uma modalidade ainda mais preferida, essa resposta imune é uma resposta imune de CD8 específica. Isso também se aplica a polipeptídeos e proteínas, respectivamente.

[0086] Aqueles versados na técnica também reconhecerão que, sempre que aqui for feita referência a um ácido nucléico e a um ácido nucléico que codifique um polipeptídeo ou proteína, respectivamente, o termo também deve compreender aqueles ácidos nucléicos que codifiquem o polipeptídeo ou proteína, opcionalmente seu fragmento ou forma com mutação, de preferência conforme aqui definido, em vista da degeneração do código genético ou em vista da necessidade de adaptar a sequência para o uso de códons do respectivo organismo hospedeiro ou de produção.

[0087] O termo polipeptídeo, proteína ou antígeno derivado de um organismo significa, de preferência, que a sequência de aminoácidos do respectivo polipeptídeo, proteína ou antígeno é uma do respectivo organismo, pelo que a sequência e, portanto, também o correspondente ácido nucléico codificador podem ser seus fragmentos e formas com mutação.

[0088] Deve-se reconhecer que o peptídeo ou polipeptídeo capaz de provocar uma resposta imune em um mamífero pode ser o segundo constituinte da composição. Está dentro da presente invenção que o peptídeo ou polipeptídeo seja parte de um polipeptídeo de fusão. De preferência, esse polipeptídeo de fusão compreende o peptídeo ou polipeptídeo capaz de provocar uma resposta imune em um mamífero ou seu domínio ainda com esse traço, e o polipeptídeo de fusão também compreende um domínio de escape fagolisossômico, de preferência um

domínio de escape fagolisossômico conforme acima descrito com relação às modalidades do primeiro constituinte da presente invenção. O domínio de um polipeptídeo que é capaz de provocar uma resposta imune em um mamífero pode ser, no caso de esse peptídeo ser um antígeno bacteriano, derivado de um microrganismo, de preferência do gênero *Mycobacterium* e, mais preferivelmente, de *Mycobacterium tuberculosis* ou de *Mycobacterium bovis*. Esse domínio tem um comprimento de pelo menos 6, de preferência de pelo menos 8 aminoácidos. O domínio imunogênico é, de preferência, uma parte de um polipeptídeo nativo de *Mycobacterium*. Entretanto, domínios imunogênicos modificados que possam ser derivados de um domínio imunogênico nativo por substituição, deleção e/ou adição de um ou vários aminoácidos também estão dentro do âmbito da presente invenção. Em uma modalidade preferida, o domínio é um domínio da proteína gp190/MSP1 de *Plasmodium*.

[0089] Em uma modalidade, a proteína de fusão é codificada por uma molécula de ácido nucléico recombinante, a saber, uma molécula de ácido nucléico de acordo com a SEQ ID NO: 1. Essa molécula de ácido nucléico compreende uma sequência codificadora de peptídeo de sinal (nucleotídeos 1 a 120), uma sequência codificadora de um domínio imunogênico (nucleotídeos 112 a 153), uma sequência codificadora de elo peptídico (nucleotídeos 154 a 210), uma sequência codificadora de um domínio fagolisossômico (nucleotídeos 211 a 1.722), uma sequência codificadora de elo peptídeo adicional (nucleotídeos 1.723 a 1.800) e uma sequência codificadora de um peptídeo aleatório (nucleotídeos 1.801 a 1.870). A sequência de aminoácidos correspondente é mostrada na SEQ ID NO: 2.

[0090] Em uma modalidade particularmente preferida, mais particularmente quando o primeiro constituinte é rBCG:Hly ou rBCG Δ ureC:Hly, o segundo constituinte é um agente biologicamente

ativo e, mais particularmente, uma célula geneticamente manipulada. De preferência, a célula geneticamente manipulada é uma célula eucariótica. Mais preferivelmente, essa célula geneticamente manipulada expressa pelo menos uma citocina. Uma citocina, conforme aqui usado, é uma proteína secretada que influencia o comportamento e as características de outras células. Citocinas preferidas são interleucinas, quimiocinas, linfocinas, monocinas e fatores do crescimento. Citocinas particularmente preferidas são interleucinas e interferons, em que interleucinas preferidas são a interleucina-2, interleucina-4, interleucina-12, de preferência interleucina-2, e o interferon é, de preferência, interferon-alfa, interferon-beta ou interferon-gama, mais preferivelmente interferon-gama.

[0091] Conforme aqui preferencialmente usado, uma célula geneticamente manipulada é uma célula modificada com relação à composição genética que está presente na célula por inserção de material genético exógeno. Essa modificação da composição genética compreende a introdução de material genético ainda não presente na célula, para ser ácido nucléico verdadeiramente estranho, ou para ativar uma parte do material genético endógeno, em que esse material genético endógeno não esteja presente ou ativo sem o dito material genético exógeno presente, pelo que o material genético exógeno não é necessariamente um material genético, mas pode ser qualquer material ativo para isso. Os métodos para conseguir essa modificação são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, material de DNA exógeno pode ser introduzido na célula por tecnologia de precipitação de fosfato de cálcio, tecnologia de vetor viral, eletroporação, lipofecção, sistemas de vetor viral, como sistemas virais adeno-associados, microinjeção ou abordagens biolísticas. O resultado dessa manipulação genética é que a célula geneticamente manipulada seja capaz de expressar certos produtos genéticos que não eram expressados antes.

[0092] Os presentes inventores descobriram que a co-expressão de interleucinas, e mais particularmente interleucina-2, e interferon-gama, em combinação com a célula bacteriana descrita como o primeiro constituinte da combinação de acordo com a presente invenção, proporciona uma maneira muito eficaz de aumentar a resposta imune de um organismo, mais particularmente a resposta TH1. A célula particular pode ser escolhida de várias células, como células apresentadoras de antígenos não-profissionais, células apresentadoras de antígenos profissionais, células tumorais e células dendríticas. Entre esses tipos de células, as células tumorais são particularmente preferidas. Com a administração dessas células tumorais, pacientes com câncer aos quais essas células tumorais tenham sido introduzidas experimentam um efeito aumentado da eficácia de abordagens de vacinação de tumor. De preferência, as células usadas para esse processo de vacinação são tiradas da mesma entidade tumoral ou de uma similar ao tumor a ser tratado usando a combinação de acordo com a presente invenção. Os efeitos benéficos do uso de células geneticamente manipuladas que são, entre outras, descritas no pedido de patente internacional WO 94/18995 são, dessa forma, aumentados ainda mais pelo uso da célula bacteriana que forma o primeiro constituinte da combinação de acordo com a presente invenção.

[0093] Está dentro da presente invenção que a célula apresentadora de antígeno profissional seja uma célula dendrítica, que é, então, usada como um agente biologicamente ativo conforme aqui descrito ou é um componente adicional do agente biologicamente ativo, em que, de preferência, nessa modalidade, o agente biologicamente ativo é uma célula geneticamente manipulada, mais preferivelmente uma célula que expressa citocina, conforme aqui descrita, em que a célula, ainda mais preferivelmente, co-expressa duas citocinas e, o mais preferivelmente, interleucina-2 e interferon-gama. As células dendríticas são, de

preferência, carregadas com antígenos de um tumor, em que o tumor é um para cujo tratamento a célula dendrítica seja usada, de preferência em combinação com os adjuvantes conforme aqui descritos e/ou a combinação de um adjuvante e um agente biologicamente ativo como, por exemplo, as ditas células que co-expressam citocinas. A carga das células dendríticas é conhecida por aqueles versados na técnica e, por exemplo, descrita em Vari e Hart ((2004) *Cytotherapy*: 6(2): 111-121). Essas células dendríticas, isoladamente ou em combinação com qualquer um dos adjuvantes aqui descritos, particularmente BCG ou BKG, ou qualquer combinação do primeiro e segundo constituintes aqui descritos, é usada de preferência para o tratamento de qualquer uma das doenças aqui descritas. De preferência, essa doença é qualquer doença tumoral aqui descrita.

[0094] Tumores e cânceres preferidos, respectivamente, que podem ser tratados com esse tipo de abordagem são, em particular, tumores ou cânceres imunogênicos como, entre outros, melanoma, câncer renal, tumor de mama, tumor cerebral, tumor de próstata, câncer de pulmão de células não pequenas, carcinoma de cólon e tumor escamoso de cabeça e pescoço.

[0095] A expressão de uma citocina e, mais particularmente, a co-expressão de interleucina-2 e interferon-gama permite uma eficácia aumentada dos antígenos tumorais apresentados pela célula geneticamente manipulada. A melhora na resposta antitumoral é ocasionada por dois mecanismos diferentes, que operam na mesma direção. Do lado aferente, a secreção de INF γ aumenta a expressão de MHC e moléculas de adesão na superfície celular, levando a uma melhor apresentação de antígenos específicos do tumor a células T CD8⁺ por moléculas MHC I e, portanto, a um melhor reconhecimento de células tumorais por células T. Do lado eferente, a secreção de IL-2 em íntima proximidade a células tumorais aumenta a atividade de células T

CD8⁺. Assim, de preferência, a célula geneticamente manipulada que expressa pelo menos uma citocina está, em uma modalidade preferida, pelo menos em certa medida, relacionada à entidade tumoral para cujo tratamento é usada. Evidentemente, deve-se entender que outras linhagens celulares podem ser usadas, pelo que é mais preferível que a dita célula, além de ser geneticamente manipulada conforme aqui descrito, também expresse certos antígenos característicos da entidade tumoral a ser assim tratada.

[0096] Aqueles versados na técnica reconhecerão que, em princípio, a célula geneticamente manipulada pode ser uma célula autóloga. Isso significa que uma célula é retirada de um paciente a ser tratado usando-se a combinação de acordo com a presente invenção, em que as células retiradas normalmente são retiradas do tumor a ser tratado, e as células são manipuladas para serem células geneticamente manipuladas conforme aqui definido. Subsequentemente, esse tipo de célula é administrado novamente ao paciente como parte da combinação de acordo com a presente invenção.

[0097] Para aumentar a eficácia das células geneticamente manipuladas, essas células também podem expressar outra imunomolécula. Conforme aqui usado, imunomolécula compreende qualquer molécula que seja adequada para afetar o sistema imune. Imunomoléculas compreendem, entre outras, citocinas, moléculas de adesão, fator co-estimulador, antígeno associado a tumor, antígeno específico de tumor e antígeno de parasita.

[0098] Em uma modalidade adicional, a célula geneticamente manipulada é uma célula alogênica. Uma célula alogênica é, em uma modalidade preferida, uma célula originada da mesma espécie, entretanto, não originada do mesmo indivíduo. Células alogênicas são células derivadas da mesma espécie, mas antigenicamente distintas. Em uma modalidade particularmente preferida, a célula alogênica

corresponde à respectiva população celular do tumor a ser tratado. Mais preferivelmente, a correspondência estará relacionada a algumas das ou a todas as classes de antígenos linfocíticos humanos (HLA) com os pacientes a serem tratados usando a combinação de acordo com a presente invenção. Entretanto, podem-se usar diferentes graus de correspondência. Mais particularmente, a correspondência será uma correspondência de HLA classe I. HLA classe I compreende as subclasses A, B e C. A correspondência de HLA classe I será dada se houver uma correspondência entre a célula usada como o segundo constituinte da composição de acordo com a presente invenção e as células que constituem o tumor em um paciente a ser tratado usando a dita composição.

[0099] Deve-se reconhecer que a correspondência e a extensão dessa correspondência requeridas estão ao alcance daqueles versados na técnica. Uma possível abordagem experimental é inocular diferentes grupos de animais/pacientes com diferentes graus de correspondência e, então, desafiar com o tumor para examinar os efeitos. Alternativamente, o teste pode ser feito diretamente com pacientes de tumor.

[00100] Uma linhagem celular particularmente preferida é a LNCaP, que co-expressa interleucina-2 e interferon-gama e que deve ser usada como o segundo constituinte com relação à combinação de acordo com a presente invenção, mais particularmente para o tratamento de câncer de próstata, em que o primeiro constituinte é rBCG:Hly ou rBCG Δ ureC:Hly.

[00101] Em uma modalidade adicional, o agente biologicamente ativo é um antígeno de parasita, mais particularmente a proteína gp190/MSP1 de *Plasmodium*. De preferência, o respectivo antígeno é derivado de *Plasmodium falciparum*. De preferência, o respectivo antígeno é derivado da sequência de aminoácidos da proteína MSP-1 de *Plasmodium*, de preferência da proteína MSP-1 de *Plasmodium falciparum*. O termo

antígeno de parasita, conforme aqui usado, significa o antígeno de comprimento total, assim como seus fragmentos, contanto que sejam adequados para provocar uma resposta imune, mais preferivelmente uma resposta TH1 ou uma resposta TH1 mediada, de preferência em um mamífero, ainda mais preferivelmente com relação à composição de acordo com a presente invenção, em que o primeiro constituinte é, mais preferivelmente, rBCG:Hly e rBCG Δ ureC:Hly, respectivamente.

[00102] Essa modalidade é particularmente útil no tratamento de malária.

[00103] Está no âmbito da presente invenção que esse antígeno de parasita possa ser expressado por uma célula bacteriana agindo como primeiro constituinte ou a combinação de acordo com a presente invenção, ou uma célula eucariótica agindo como segundo constituinte da composição de acordo com a presente invenção. Entretanto, também está no âmbito da presente invenção que o antígeno de parasita seja expressado pela célula bacteriana, que compreende pelo menos uma molécula de ácido nucléico recombinante codificando um peptídeo ou polipeptídeo de escape fagolisossômico conforme especificado para várias modalidades da presente invenção.

[00104] Deve-se reconhecer que gp190/MSP consiste em vários domínios de ocorrência natural, e que esses domínios, isoladamente ou em combinação, podem ser um antígeno de parasita conforme de preferência aqui usado. gp190/MSP foi considerada durante muito tempo como um candidato em potencial para uma vacina contra malária. Entretanto, sua preparação foi considerada extremamente trabalhosa, não permitindo produção em grande escala desse antígeno. Em vista disso, uma vacina contra malária em potencial não se tornou disponível. Entretanto, com base no achado técnico do pedido de patente internacional WO 98/14583, esse antígeno de *Plasmodium* pode se tornar disponível em grandes quantidades. Deve-se reconhecer que

esse antígeno de parasita não se limita ao antígeno gp190/MSP, mas também compreende seus homólogos encontrados em outras espécies de *Plasmodium*, além do *Plasmodium falciparum*, como *P. vivax*. O achado técnico do dito pedido de patente internacional é aqui incorporado por referência e permite que aqueles versados na técnica preparem qualquer quantidade desse antígeno necessária para incorporação na composição de acordo com a presente invenção como segundo constituinte. Vacinas de DNA são, por exemplo, descritas em Grode L., Mollenkopf H. J., Mattow J. Stein M., Mann P., Knapp B., Ulmer J. Kaufmann S. H. Application of mycobacterial proteomics to vaccine design: improved protection by *Mycobacterium bovis* BCG primer-Rv3407 DNA boost vaccination against tuberculosis. Infect. Immun. 2004 Nov; 72(11):6471-9.

[00105] Em uma modalidade adicional, o agente biologicamente ativo é uma partícula ou grupo de partículas virais ou uma multidão de partículas virais que sejam, de preferência, liberadas após a infecção de células de mamíferos pelo citomegalovírus humano (HCMV), em que as partículas (a) estão envolvidas por uma membrana lipídica na qual as glicoproteínas virais estejam incrustadas, e (b) não contêm DNA nem capsídeos virais, ou são corpos densos, de preferência corpos densos de citomegalovírus humano. Essas partículas, conforme será aqui descrito em maiores detalhes, são usadas, de preferência, para a prevenção e/ou tratamento de uma infecção pelo citomegalovírus humano que é o vírus do herpes beta. Um grupo particularmente relevante de sujeitos que podem ser tratados usando-se a combinação de acordo com esse aspecto da presente invenção são pacientes que tenham sofrido um transplante de medula óssea.

[00106] Em uma pessoa imunocompetente, a infecção por HCMV normalmente não é notada, com os sintomas mais leves e não específicos. Em contraste, em certos grupos de risco, por exemplo, em

pacientes imunossuprimidos, como pacientes de AIDS ou receptores de transplantes, e após infecção pré-natal, a infecção por HCMV tem manifestações sérias, constituindo, portanto, um grupo adicional de pacientes que podem ser tratados usando-se a combinação de adjuvante e as respectivas partículas.

[00107] De acordo com o ensinamento técnico do pedido de patente internacional PCT/EP 00/01794, provou-se que os chamados corpos densos de HCMV são eficientes em termos de indução de uma resposta imune e, por fim, uma proteção imune contra a infecção por HCMV. Assim, os ditos corpos densos proporcionam uma indução de longa duração de anticorpos neutralizadores, que protegem contra a infecção por HCMV com superposição de cepas. Isso é proporcionado pela indução eficiente da chamada “resposta de células auxiliares” (linfócitos T CD4-positivos) contra HCMV para auxiliar na maturação de linfócitos B secretores de anticorpos. Além disso, os ditos corpos densos são adequados para induzir a formação de células T citotóxicas contra HCMV, em que linfócitos desse tipo são de importância crucial para terminar uma infecção por HCMV que tenha ocorrido e limita a disseminação do vírus pelo corpo. Finalmente, esses corpos densos são adequados para minimizar os efeitos colaterais de uma vacina.

[00108] Corpos densos são induzidos pela infecção por HCMV e liberados no meio de cultura de culturas de fibroblastos humanos primários infectados. São estruturas que são visíveis sob microscopia eletrônica, e mais de 90% de sua massa protéica consiste em pp65. São comparáveis com partículas virais, por possuírem uma membrana lipídica celular modificada por glicoproteínas virais e serem ejetados da célula. As glicoproteínas virais estão, muito provavelmente, na conformação natural nesse invólucro. Como os corpos densos não contêm DNA viral e nenhum capsídeo viral, são não infecciosos. Podem ser concentrados em grande quantidade a partir do sobrenadante de

cultura celular por métodos estabelecidos. Tanto aplicações de vacina preventiva, quanto terapêutica podem ser realizadas usando-se esses corpos densos, particularmente em combinação como adjuvante aqui descrito.

[00109] Corpos densos são envolvidos por uma membrana lipídica que torna possível a fusão das partículas a certas células de mamíferos, de modo que seu conteúdo entre no citoplasma da célula. A membrana das partículas contém glicoproteínas virais que representam os principais antígenos para anticorpos neutralizadores de vírus. As partículas também se caracterizam pelo fato de não conterem DNA nem capsídeo viral. Além disso, contêm o antígeno viral para células T pp65 (ppUL83), que tanto estimula a formação de células T auxiliaadoras, quanto é um antígeno essencial para induzir linfócitos T citotóxicos (CTL) contra HCMV.

[00110] Essas propriedades, particularmente a combinação de antígenos capazes de induzir tanto anticorpos neutralizadores, quanto uma resposta celular adequada, tornam as partículas adequadas como vacinas contra HCMV.

[00111] Da mesma forma, os corpos densos induzem, independentemente da via de administração, respostas de células T auxiliaadoras do tipo Th1, que os qualificam como uma vacina contra HCMV.

[00112] Em uma modalidade adicional, descrevem-se corpos densos ou as respectivas partículas que contêm uma proteína de fusão que compreende, em uma parte, uma ou mais seções do antígeno viral para células T pp65 (ppUL83) ou a proteína e, em outra parte, uma ou mais seções de uma ou mais outras proteínas.

[00113] Isso torna possível otimizar a antigenicidade das partículas, porque essa proteína de fusão está presente em grandes quantidades nas partículas. Além disso, sabe-se que a expressão de antígenos da resposta imune celular e humoral em uma molécula pode aumentar

distintamente a antigenicidade. As várias seções de pp65 e as outras proteínas podem ser fusionadas entre si diretamente, mas também é possível, por exemplo, que quatro sequências de elo que não sejam um constituinte natural de uma das proteínas envolvidas estejam presentes entre as várias seções. As sequências desse tipo podem surgir por causa da clonagem ou ser incorporadas deliberadamente para influenciar as propriedades do antígeno. Entretanto, a proteína de fusão não contém, de preferência, nenhuma sequência estranha que não seja um constituinte de um dos parceiros de fusão. Nessas modalidades, a proteína de fusão consiste em uma ou mais partes da pp65 e uma ou mais partes de uma ou mais outras proteínas.

[00114] Aplica-se a todas as modalidades aqui mencionadas que a pp65 completa ou uma ou mais de suas partes podem estar presentes na proteína de fusão. A expressão “uma proteína de fusão (consistindo) em pp65” não deve, para fins deste pedido, ser entendida como restrita a pp65 completa. Uma “parte” ou “seção” de uma proteína presente na proteína de fusão compreende pelo menos 6, de preferência pelo menos 8, mais preferivelmente pelo menos 9, 15 ou 20 aminoácidos consecutivos da proteína da qual é derivada.

[00115] Uma modalidade preferida compreende uma proteína de fusão de pp65 (ppUL83) e um ou mais epítopos neutralizadores das glicoproteínas virais gB ou gH. Partículas desse tipo podem ser geradas conforme descrito no pedido de patente internacional PCT/EP 00/01794. A proteína de fusão pode entrar, mediante captação específica para antígeno, em células B específicas para glicoproteínas que, por sua vez, são capazes de apresentar epítopos tanto das glicoproteínas, quanto de pp65 no contexto de MHC classe II. Além disso, também é possível que partes da proteína de fusão sejam apresentadas por células apresentadoras de antígenos profissionais (APC) no contexto de MHC classe II. Em ambos os casos, o resultado

é uma estimulação eficiente da resposta T_H tanto para pp65, quanto para glicoproteínas virais. Essas células T_H são capazes de estimular células B específicas para glicoproteínas, que apresentam peptídeos de pp65 e glicoproteínas virais no contexto de MHC classe II, para formar anticorpos neutralizadores tanto homóloga, quanto heterologamente. Além disso, partículas desse tipo podem, como vírions infecciosos, ser recolhidas por células, e peptídeos de pp65 podem ser introduzidos por carregamento exógeno na via MHC classe I. Isso resulta, incomumente para vacinas mortas, em uma estimulação da resposta CTL a HCMV.

[00116] Em uma modalidade preferida adicional, as partículas contêm uma proteína de fusão consistindo em pp65 e uma ou mais partes de outra proteína de HCMV, a proteína IE1 (ppUL123). As partes da proteína IE1 que devem estar particularmente presentes são aquelas contra as quais se formam células T citotóxicas em seres humanos durante a infecção natural. Peptídeos da proteína IE1 são, em alguns casos, apresentados por moléculas de MHC classe I diferente dos peptídeos de pp65. A adição desses epítopos “CTL” adicionais de IE1 se destina a assegurar que, após a imunização, sujeitos inoculados que expressem diferentes moléculas de MHC classe I sejam capazes de gerar CTL contra HCMV de maneira tão abrangente quanto possível.

[00117] Em uma modalidade preferida adicional, as partículas contêm uma proteína de fusão consistindo em pp65, em um ou mais epítopos neutralizadores de glicoproteínas de HCMV e em um ou mais epítopos CTL de IE1. A fusão de pp65 com epítopos neutralizadores e epítopos CTL se destina a assegurar que seja possível simultaneamente neutralizar anticorpos e formar CTL por sujeitos inoculados de maneira tão abrangentes quanto possível, isto é, pelo número máximo de pessoas diferindo em padrão de MHC classe I.

[00118] Em uma modalidade preferida adicional, as partículas contêm uma proteína de fusão de pp65 e um ou mais epítopos de outro

patógeno humano. Partes adequadas de outros patógenos humanos são antígenos contra os quais se formam anticorpos neutralizadores em seres humanos. É possível, mediante fusão desses “antígenos neutralizadores” com um antígeno para células T pp65, esperar um aumento acentuado na resposta imune (resposta de anticorpos) em comparação com o uso do “antígeno neutralizador” isolado. Exemplos desses “antígenos neutralizadores” que devem ser mencionados são proteínas de superfície do vírus da hepatite B (da região HbsAG), do vírus da hepatite C (por exemplo, E2), dos vírus da imunodeficiência humana (HIV, da região Env), do vírus da influenza (hemaglutinina, neuraminidase, nucleoproteína) ou outros patógenos virais. Patógenos humanos adequados adicionais são bactérias, como *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria meningitidis* e outras. Finalmente, antígenos de patógenos eucarióticos, como plasmódios (malária), poderiam ser fusionados a pp65.

[00119] Em uma modalidade preferida adicional, as partículas contêm uma proteína de fusão consistindo em pp65 e uma ou mais partes de proteínas de outros patógenos contra os quais são gerados CTL em seres humanos na infecção natural com esses patógenos. Exemplos desses epítomos CTL que podem ser mencionados são partes de proteínas de HIV-1, de HBV, de HCV ou de vírus da influenza. A intenção desse procedimento é utilizar as propriedades imunogênicas únicas dos corpos densos para gerar CTL protetora contra patógenos heterólogos em seres humanos.

[00120] Em uma modalidade preferida adicional, as partículas contêm uma proteína de fusão consistindo em pp65, em um ou mais epítomos neutralizadores de um patógeno heterólogo e em um ou mais epítomos CTL do mesmo patógeno. Essa fusão se destina a assegurar que sujeitos inoculados sejam capazes de formar tanto anticorpos protetores e CTL contra esse patógeno.

[00121] A invenção também se refere a partículas virais contendo pelo menos duas glicoproteínas diferentes que sejam variantes da mesma glicoproteína de diferentes cepas de HCMV.

[00122] Uma modalidade preferida contém exatamente duas variantes, uma variante correspondendo à cepa Towne de HCMV, e a outra variante correspondendo à cepa Ad169 de HCMV. A modalidade preferida contém a glicoproteína gB tanto da cepa Towne, quanto da cepa Ad169.

[00123] Essas duas proteínas podem ser incorporadas com eficiência idêntica na membrana de corpos densos recombinantes na célula infectada. Esses corpos densos recombinantes são adequados para induzir não apenas a superposição de cepas, mas também a resposta imune neutralizadora específica para cepa para as duas cepas de HCMV prototípicas.

[00124] Finalmente, a invenção também se refere a um método pelo qual se preparam partículas virais que sejam completamente livres de vírus infecciosos. Conforme aqui preferencialmente usado, o termo livre de vírus infecciosos significa que a preparação assim obtida é não infecciosa com relação ao nível de detecção. Se forem produzidas partículas a partir de uma população celular que tenha sido infectada com HCMV, há um risco de que partículas virais infecciosas sejam transportadas durante a purificação das partículas. Isso representa uma desvantagem para uma vacina.

[00125] O método da invenção minimiza esse risco. Para isso, inicialmente produz-se uma cepa de HCMV portadora de uma deleção em um gene essencial. Isso significa uma deleção da função do gene. Na maioria dos casos, isso se baseia na ausência de um produto de gene funcional, mas também é possível que a função de uma sequência de gene regulador seja desarranjada para que o HCMV não seja mais viável. Isso pode ocorrer por alteração da sequência de ácido nucléico

do HCMV, por exemplo, por mutações pontuais, deleções reais, inserções ou outras mutações. Esse vírus defeituoso só pode replicar em células que expressem o gene que foi deletado no HCMV e, portanto, tornem possível a montagem de vírions. Fibroblastos primários representam atualmente o único sistema razoavelmente permitido para a replicação in vitro de HCMV. Uma transfecção estável dessas células até agora só foi possível com o auxílio de métodos de transferência retroviral. Isso é, entretanto, uma séria desvantagem se essas células tiverem de ser usadas para produzir vacinas. O método da invenção torna disponíveis células transfectadas de maneira estável que podem ser produzidas sem transferência de gene retroviral, mas em que o HCM também possa se replicar.

[00126] Uma modalidade preferida compreende fibroblastos de prepúcio humano que tenham sido transfectados de maneira estável com o gene de proteína de capsídeo maior UL86. A transfecção é realizada, de preferência, com um auxiliar contendo lipídio, que leva a uma eficiência de transfecção muito elevada. Em uma modalidade preferida, o reagente “Fugene”, que pode ser adquirido na Roche Diagnostics, Mannheim, é empregado para a transfecção.

[00127] Vírus deficientes cujo gene de proteína de capsídeo maior UL86 tenha sido deletado podem se replicar nessas células. Se fibroblastos “não complementares” forem infectados com esse vírus deficiente, é, então, possível isolar delas partículas de vacina viral livres de partículas virais infecciosas.

[00128] Outra possibilidade para a produção das partículas da invenção sem o risco de infecção é reconstituir as partículas em células sem infectar com HCMV. Para isso, todos os genes que codificam constituintes das partículas têm de ser expressados nessas células. Esses genes, para essa finalidade, têm de ser inseridos nas células.

[00129] Células de insetos infectadas por baculovírus são

preferencialmente usadas para essa finalidade. Os genes que codificam os constituintes polipeptídicos das partículas são clonados em vetores de expressão de baculovírus. A produção de baculovírus recombinantes é seguida por co-infecção de células de insetos, de preferência células Sf9, pelos vários vírus. Os genes são expressados nas células de insetos, e os polipeptídeos resultantes são combinados para fornecer as partículas desejadas. Finalmente, as partículas são liberadas pelas células de insetos. Isso representa uma possibilidade para produzir partículas não-infecciosas que podem ser usadas como vacinas.

[00130] Uma possibilidade alternativa é clonar os constituintes necessários para a reconstituição de corpos densos em baculovírus recombinantes sob o controle do promotor/intensificador IE maior de HCMV (MIEP). Demonstra-se que baculovírus recombinantes são capazes de infectar células eucarióticas superiores como, por exemplo, células de mamíferos, e que genes estranhos sob o controle de um promotor eucariótico forte, como MIEP, são fortemente expressados nessas células. A vantagem desse procedimento seria que qualquer modificação importante, como glicosilação, de proteínas antigênicas dos corpos densos ocorreria de uma maneira mais natural em células de mamíferos do que em células de insetos. Além disso, há inúmeras dessas linhagens celulares que já estão aprovadas para produção de vacinas.

[00131] Em uma modalidade adicional, o agente biologicamente ativo é uma célula apresentadora de antígeno, em que essa célula apresentadora de antígeno apresenta antígenos capazes de provocar uma resposta imune contra tuberculose e, mais especificamente, contra *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. africanum* e *M. paratuberculosis*. Em uma modalidade preferida, a célula apresentadora de antígeno é um microrganismo, mais preferivelmente um microrganismo selecionado no grupo que compreende *M. tuberculosis*,

M. bovis, *M. canettii*, *M. africanum* e *M. paratuberculosis*. A combinação de acordo com a presente invenção compreendendo uma célula bacteriana como um primeiro constituinte e essa célula apresentadora de antígeno ou o próprio antígeno como o segundo constituinte ou como um agente biologicamente ativo pode ser preferencialmente usada para a prevenção e/ou tratamento de tuberculose. De preferência, o antígeno é o antígeno 85.

[00132] Está dentro do âmbito da presente invenção que o primeiro constituinte da composição de acordo com a presente invenção em suas várias formas aqui apresentadas e, em particular, os microrganismos com um domínio de escape fagolisossômico em suas várias modalidades, como rBCG:Hly e rBCG Δ ureC: Hly, está agindo e pode, portanto, ser usado como um adjuvante, o que significa que é responsável pelo aumento do status imune de um paciente a ser tratado ou que necessite de tratamento, mais preferivelmente o status imune está relacionado a TH1 e, ainda mais preferivelmente, o status imune é caracterizado por um aumento na resposta TH1, em que essa resposta TH1 está aumentada em comparação com um indivíduo não tratado.

[00133] Conforme aqui exposto, o segundo constituinte é, de preferência, fisicamente diferente ou fisicamente separado do primeiro constituinte, contanto que seja o agente que proporciona uma resposta biológica, bioquímica, fisiológica ou médica específica do paciente. O fato de o primeiro e o segundo constituintes estarem fisicamente separados permite uma administração independente ou separada dos ditos dois constituintes. No caso de o agente biologicamente ativo ser uma célula geneticamente manipulada que expresse uma citocina e, mais preferivelmente, essa célula sendo uma célula de câncer, a resposta imune específica é dirigida para os antígenos introduzidos por essa célula geneticamente manipulada. Todavia, deve-se reconhecer que as citocinas, devido a seu modo de ação, proporcionam um efeito

benéfico global que poderia ser considerado como um efeito adjuvante, também como já proporcionado pelo primeiro constituinte.

[00134] Em um aspecto adicional, a presente invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo a combinação de acordo com a presente invenção e, opcionalmente, um veículo, diluente ou adjuvante farmaceuticamente aceitável ou outro(s) veículo(s). De preferência, esse veículo, diluente, adjuvante e veículos são inertes e não-tóxicos. A composição farmacêutica é, em suas várias modalidades, adaptada para administração de várias maneiras. Essa administração compreende administração sistêmica e local, assim como oral, subcutânea, parenteral, intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intratecal e intra-ocular. Uma composição farmacêutica preferida é um tampão aquoso ou fisiológico contendo tanto o primeiro, quanto o segundo constituinte.

[00135] Aqueles versados na técnica reconhecerão que a quantidade de composição farmacêutica a ser administrada depende do estado clínico do paciente individual, do local e método de administração, do cronograma de administração, idade, sexo, peso corporal do paciente e outros fatores conhecidos por médicos praticantes. A quantidade farmaceuticamente eficaz para fins de prevenção e/ou tratamento é determinada, portanto, por considerações como as conhecidas na técnica médica. De preferência, a quantidade é eficaz para obter uma melhora, incluindo, mas não limitadas a, melhorar o estado patológico ou proporcionar uma recuperação mais rápida, melhora ou eliminação dos sintomas e outros indicadores selecionados como medidas apropriadas por aqueles versados na técnica médica.

[00136] Em uma modalidade preferida, a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção pode compreender outros compostos farmaceuticamente ativos.

[00137] A composição farmacêutica é formulada, de preferência,

para proporcionar uma administração de dosagem única ou uma administração de múltiplas dosagens.

[00138] Em uma modalidade, o primeiro constituinte e o segundo constituinte, como estão ou como parte de uma composição farmacêutica ou como uma composição farmacêutica, são fornecidos simultaneamente, como uma formulação única ou como formulações separadas de cada um. No caso de uma formulação separada, a primeira formulação contém o primeiro constituinte, e a segunda formulação contém o segundo constituinte. A dita primeira e a dita segunda formulação, respectivamente, são, em modalidade preferidas, formuladas como qualquer uma das formulações farmacêuticas aqui descritas.

[00139] Também está dentro do âmbito da presente invenção que o primeiro e o segundo constituintes, respectivamente, sejam separadamente administrados. De preferência, a diferença de tempo entre o primeiro e o segundo constituintes, respectivamente, é de cerca de uma hora ou menos de uma hora, de preferência de cerca de 30 minutos ou menos, e mais preferivelmente de cerca de 15 minutos ou menos.

[00140] Deve-se reconhecer que também está dentro do âmbito da presente invenção que o primeiro ou o segundo constituinte ou ambos os constituintes possam, nas várias formas aqui descritas, ser usados para a prevenção de qualquer uma das doenças aqui descritas.

[00141] A presente invenção será adicionalmente ilustrada com referência às figuras e exemplos, dos quais características, modalidades e vantagens adicionais da invenção podem ser tiradas, em que:

[00142] A figura 1 mostra um diagrama representando a resposta imune expressada como células CD8 + Tet + T pela administração combinada de BKG e vacina, em comparação com controles;

[00143] As figuras 2 - 4 mostram esquemas de imunização para vacinação profilática com tumores;

[00144] As figuras 5 - 7 mostram esquemas de imunização para vacina terapêutica com tumores; e

[00145] As figuras 8 e 9 são diagramas representando o efeito de diferentes esquemas de imunização no número de células T CD8 INF-gama positivos pela estimulação com diferentes peptídeos.

Exemplo 1: Uso de BKG como adjuvante para uma vacina com tumor.

[00146] Neste exemplo, descrevem-se experimentos para determinar a adequação de BKG como adjuvante para uma vacina com tumor. BKG, conforme aqui citado, expressa o peptídeo de escape fagolisossômico de *Listeria monocytogenes* (Hly) e também é ureC deficiente. Esse BCG modificado também é aqui chamado de rBCG: delta ureC: Hly.

[00147] Basicamente, os pacientes e modelos animais, respectivamente, têm de ser vacinados por um protocolo de vacinação padronizado que também é chamado de protocolo de reforço primário. Subsequentemente, os animais são postos sob desafio de um tumor. Sob essas condições, animais com vacinação por BKG/células tumorais, após o desafio com tumor, não desenvolverão nenhum tumor ou suportarão o desafio com tumor mais tempo que o animal que foi vacinado com tumor sem BKG como adjuvante. Pacientes com vacinação por BKG/célula tumoral podem suportar seu tumor mais tempo em comparação com pacientes que receberam vacinação com tumor sem BKG como adjuvante.

[00148] Se não for indicado o contrário, foram usados os seguintes materiais e métodos.

Células:

[00149] Foram usadas as seguintes linhagens celulares: J558^{mOVA} (células J558 que expressam OVA e que está ligada à membrana celular), J558^{sOVA} (células J558 que expressam OVA e que a secretam

no ambiente) e EL-4^{OVA} (células EL-4 que expressam OVA). As culturas celulares foram inicialmente mantidas sob pressão de G418 durante 14 dias. Um teste de *Mycoplasma* foi negativo. Após passagens iniciais para aumentar o número de células, as três linhagens celulares foram congeladas em porções de 10×10^6 com DMSO e armazenadas em N₂ líquido durante pelo menos 7 dias antes do primeiro uso em um animal.

Bactérias:

[00150] As bactérias usadas são marcadas: BKG (rBCG delta ureC:Hly); também chamadas de “BKG”. BKG foi cultivada em meio 7H9 completo e congelada em 10% de glicerol/PBS. As bactérias podiam ser descongeladas e recongeladas uma vez (mais recongeladas apenas sem diluição prévia).

[00151] Para a vacinação primária e 2 vacinações de reforço seguintes, $19,3 \mu\text{L} = 1 \times 10^6$ BKG foram injetadas nos camundongos.

Preparação da vacina:

[00152] Células congeladas são descongeladas e lavadas duas vezes em meio DMEM estéril. Subsequentemente, as células foram ressuspensas em DMEM estéril e contadas. O volume de injeção total foi de 100 μL (preparado de acordo com a Tabela 1). Antes da injeção, as células foram irradiadas em uma seringa estéril (150 Gy de radiação gama). Controles in vitro: das células descongeladas antes da irradiação e depois da irradiação, respectivamente, uma alíquota por linhagem celular foi removida e colocada em cultura celular. Esses controles mostraram boa recuperação após o descongelamento (células não-irradiadas), e nenhuma proliferação celular por mais de 14 dias após a irradiação.

Camundongos:

[00153] Fêmeas C57/B6 de 12 semanas de idade (distribuídas na idade de 6 semanas e acomodadas no laboratório de teste durante 6

semanas); vacinadas s.c. com 100 µL; agulha 25G; base da cauda; após 7 dias, 0,3 mL de sangue para imunomonitorização (tetrâmero para OVA) removidos sob anestesia geral. O uso dos camundongos foi aceito pelas respectivas autoridades.

[00154] Cronograma de BKG exp. nº 1:

dia 0 vacinação primária (Primária)

7 dias 1ª coleta de sangue

28 dias 1ª vacina de reforço (1º reforço)

35 dias 2ª coleta de sangue

53 dias 2ª vacinação de reforço (2º reforço)

60 dias 3ª coleta de sangue

74 dias desafio com tumor

[00155] Os camundongos usados foram divididos em 2 grupos experimentais e um de controle:

- grupo de vacina mais BKG (n = 9): subgrupos nº 1.1, nº 1.3 e nº 1.5 (veja tabela 1)

- grupo de vacina menos BKG (n = 9): subgrupos nº 1.2, nº 1.4 e nº 1.6

- grupo de controle (n = 2): subgrupo nº 1.7

Tabela 1: Subgrupos e vacinas injetadas

Grupo exp.	Células	BKG	DMEM [µL]	BKG [n]	BKG [µL]	Células [n]	Células [µL]	n =
nº 1.1	J558 ^{mOVA}	+	-	1 x 10 ⁶	19,3	1 x 10 ⁶	80,7	3
nº 1.2	J558 ^{mOVA}	-	-	-	-	1 x 10 ⁶	100,0	3
nº 1.3	J558 ^{sOVA}	+	-	1 x 10 ⁶	19,3	1 x 10 ⁶	80,7	3
nº 1.4	J558 ^{sOVA}	-	-	-	-	1 x 10 ⁶	100,0	3
nº 1.5	EL-4 ^{OVA}	+	-	1 x 10 ⁶	19,3	1 x 10 ⁶	80,7	3
nº 1.6	EL-4 ^{OVA}	-	-	-	-	1 x 10 ⁶	100,0	3
nº 1.7	Cont.	-	100	-	-	-	-	2
								20

Alojamento dos animais:

[00156] Condições S2, gaiolas IVC, 2 gaiolas; intervalo de troca 3 - 4 dias.

Análise FACS:

[00157] Realizou-se uma FACS para detectar a quantidade de células T específicas para SIINFEKEL de maneira cega. Após classificar os componentes celulares, o plasma é congelado e armazenado para avaliação adicional a -80°C.

Experimentos in vitro paralelos:

Cultura celular:

geração das células para vacinação e desafio com tumor

Controles in vitro das células usados nos experimentos com animais

Culturas celulares das células usadas como controles nos experimentos FACS, produzindo os tetrâmeros

Vetorologia:

[00158] Foi projetado um vetor (SINvetor) recombinante para IL-2, IFN-gama e OVA. Esse vetor é usado para criar uma linhagem de células tumorais de camundongo correspondendo às células LNCaP-IL-2-IFNgama.

Resultados:

[00159] Os primeiros resultados da monitorização imunológica, conforme representados na figura 1, mostram que há uma tendência a uma quantidade mais elevada de células T capazes de reconhecer o peptídeo OVA no grupo de camundongos com BKG como adjuvante do que no grupo de animais que não tinham adjuvante. Isso sustenta que BKG é um adjuvante para vacinação com tumores que intensifica a resposta imunológica à vacina.

Exemplo 2: Otimização do regime de tratamento para vacinação com tumores usando BKG

[00160] A seguir, apresenta-se um protocolo para otimização do regime de administração do conceito terapêutico delineado no exemplo 1, para permitir que aqueles versados na técnica otimizem o regime de tratamento básico aqui exposto. Os materiais e métodos são conforme delineados com relação ao exemplo 1 acima, caso não haja indicação em contrário.

Regime 1:

[00161] Usando-se a linhagem celular J558 (H2K^b) triplamente transfectada de maneira estável que expressa IL-2, IFN-gama e ovalbumina, três doses diferentes dessas células são injetadas em camundongos (C57 BL/6 (H2K^b)), a saber 5×10^6 células, 10×10^6 células e 15×10^6 células. Para cada dosagem, o grupo de camundongos consiste em cinco animais, e seu esquema de injeção é o seguinte: imunização primária com três reforços a cada 30 dias; em que a injeção ocorre com ou sem BKG (1×10^6 UFC). Os animais são imunologicamente examinados se mostram ou não resposta imune específica para ovalbumina e, em particular, um aumento na resposta imune mediada por BKG.

Regime 2:

[00162] Esse ensaio consiste em uma série de Experimentos Preliminares (“Experimentos Preliminares 1 a 7”) e quatro experimentos maiores (“Experimentos 1 a 4”).

Experimento Preliminar 1: Descoberta da dosagem do tumor de vacinação com e sem BKG como adjuvante

[00163] Um total de 14 grupos de camundongos, cada um consistindo em cinco camundongos (C57 BL/6 (H2K^b)), são imunizados com dosagens crescentes do tumor de vacinação (cada 2 dos 14 grupos recebem a mesma dosagem de tumor de vacinação). O tumor de vacinação consiste em células tumorais J558 alogênicas que expressam ovalbumina irradiadas (H2K^b), que são injetadas s.c. BKG a

uma dosagem de 1×10^6 UFC é injetado juntamente com as células tumorais em sete grupos. Após uma semana, assim como em 5, 9 e 13 semanas, 0,5 mL de sangue é retirado dos animais, e a reação imune específica para ovalbumina é testada por meio de ELISA, coloração de citocina intracelular ou coloração de tetrâmero. Usa-se um total de sete dosagens de células diferentes dos tumores de vacinação com ou sem BKG. As respectivas dosagens são $0,1 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, $1,0 \times 10^6$, $5,0 \times 10^6$, $10,0 \times 10^6$, $50,0 \times 10^6$, 100×10^6 , em que os correspondentes ensaios clínicos em seres humanos usam dosagens com uma faixa preferida de 10×10^6 a 300×10^6 células. Camundongos no total de 2 grupos de controle não recebem nenhum tumor de vacinação. Um grupo de controle recebe uma injeção de BKG.

Experimento Preliminar 2: Descoberta da dosagem de tumor de teste melanoma B16_{OVA}

[00164] Nesse ensaio, quatro grupos de camundongos (C57 BL/6 (H2K^b)) recebem dosagens crescentes do tumor de teste (melanoma B16_{OVA} s.c.). O crescimento do tumor é monitorizado até que o volume do tumor atinja 2 cm. Uma vez que esse volume de tumor seja atingido, os camundongos são sacrificados, o sangue e o material tumoral são recuperados e armazenados para análise in vitro. Se não houver nenhum crescimento tumoral, os camundongos são sacrificados após 12 semanas. Mais uma vez, cada grupo consiste em cinco camundongos, em que se usam quatro dosagens de células diferentes do tumor de teste, a saber, $1,0 \times 10^6$ células, $5,0 \times 10^6$, $10,0 \times 10^6$ e $50,0 \times 10^6$ células.

Experimento Preliminar 3: Determinação da dosagem de adjuvante

[00165] Com base na dosagem identificada no Experimento Preliminar 1, varia-se a dosagem de BKG, em que a dosagem do adjuvante é variada por um fator de 10, 100 e 1.000 e 0,1, 0,01 e 0,001, em comparação com a dosagem que é usada no Experimento

Preliminar 1. Após uma semana, assim como em 5, 9 e 13 semanas, 0,5 mL de sangue é retirado dos animais, e a reação imune específica para ovalbumina é testada por meio de ELISA, coloração de citocina intracelular ou coloração de tetrâmero.

Experimento Preliminar 4: Estudos de modo de administração

[00166] A dosagem das células tumorais de vacinação determinada no Experimento Preliminar 1 e a dosagem de BKG determinada no Experimento Preliminar 3 são variadas com relação ao modo de administração. Os modos de administração são intravenosa, intradérmica, intraperitoneal e s.c. ipsilateralmente. Para cada modo de administração, a dosagem de BKG é uma vez, 0,1 vez ou 0,01 vez a dosagem definida no Experimento Preliminar 3. Os modos de administração aqui testados são similares a um uso clínico em potencial com seres humanos e diferem com relação ao compartimento do sistema imune que foi primeiro contatado com o adjuvante. Após uma semana, assim como em 5, 9 e 13 semanas, 0,5 mL de sangue são retirados dos animais, e a reação imune específica para ovalbumina é testada por meio de ELISA, coloração de citocina intracelular ou coloração de tetrâmero.

Experimento Preliminar 5: Estudos do esquema de imunização

[00167] Usando-se a dosagem de células tumorais de vacinação conforme definida no Experimento Preliminar 1 e a dosagem de BKG determinada no Experimento Preliminar 3, os seguintes esquemas de imunização são examinados:

1. Esquema de imunização 1: uma única co-injeção de tumor de vacinação e adjuvantes (grupos de controle).
2. Esquema de imunização 2: esse esquema corresponde à imunização profilática de algumas doenças, como sarampo, em que há uma imunização básica tripla e um reforço, em que a imunização básica é efetuada no início, depois de duas e quatro semanas, e o reforço é

administrado depois de mais seis semanas.

3. Esquema de imunização 3: esse esquema corresponde a um esquema que se mostrou essencial para vacinação terapêutica que ocorre juntamente com uma aplicação concomitante das vacinas em um intervalo de vacinação distinto. Mais especificamente, os seguintes três subesquemas podem ser definidos:

[00168] Esquema de imunização 3a: vacinação a cada 3 semanas (última amostragem de sangue e eutanásia após 12 semanas);

[00169] Esquema de imunização 3b: vacinação a cada 6 semanas (última amostragem de sangue e eutanásia após 25 semanas);

[00170] Esquema de imunização 3c: vacinação a cada 12 semanas (última amostragem de sangue e eutanásia após 43 semanas).

[00171] Todos os três esquemas de imunização são repetidos, em que a dosagem do adjuvante BKG é a dosagem determinada no Experimento Preliminar 3 ou sua dosagem de 10 vezes ou 0,1 vezes.

Experimento Preliminar 6: Descoberta da dosagem do tumor de vacinação (TRAMP) com e sem BKG

[00172] Um total de 12 grupos de camundongos TRAMP (Jackson Laboratory Linhagens nº 003135) são vacinados com 0,1 vez, 1 vez e 10 vezes a dosagem de células tumorais de vacinação TRAMP-C1 definidas na literatura (5×10^6 células). As células tumorais de vacinação são usadas sem nenhuma modificação genética (wtTRAMP) ou como células transfectadas com IL-2/IFN-gama. Os camundongos são imunizados por via s.c. usando-se 5×10^5 , 5×10^6 e 5×10^7 células TRAMP. Seis grupos recebem 1×10^6 CFU de BKG como adjuvante ativo, juntamente com as células tumorais. Uma semana após a imunização e subsequentemente após cada seis semanas, 0,5 mL de sangue é amostrado, e a reação imune específica para TRAMP-C1 é determinada por ELISA, coloração de citocina intracelular ou coloração de tetrâmero. A cada doze semanas, realiza-se uma CT para

monitorizar o progresso da doença. Camundongos TRAMP que experimentam uma doença de câncer de próstata não afetado têm de ser sacrificados com a idade de 32 a 35 semanas, para evitar sofrimento desnecessário. Para explorar se, devido à vacinação, uma alteração no progresso da doença pode ser observado, os camundongos devem ser observados até a 40ª semana.

Experimento Preliminar 7: Estudos da dosagem de adjuvante

[00173] A dosagem das células tumorais de vacinação no Experimento Preliminar 6 é variada com relação à dosagem de BKG (0,1 vez, 1 vez e 10 vezes a dosagem de BKG determinada no Experimento Preliminar 6). De maneira similar ao Experimento Preliminar 6, tanto células wtTRAMP-C1, quanto IL-2/IFN γ -TRAMP-C1 geneticamente manipuladas são testadas. Uma semana após a imunização e subsequentemente a cada seis semanas, amostras de 0,5 mL de sangue são recolhidas dos animais, e a reação imune específica para TRAMP-C1 é determinada por ELISA, coloração de citocina intracelular ou coloração de tetrâmero. A cada doze semanas, realiza-se uma CT para monitorizar o progresso da doença. A última amostragem de sangue e a eutanásia são realizadas na semana 40.

Experimento 1: Vacinação profilática com tumor usando o sistema de ovalbumina

[00174] Camundongos C57BL/6 (H2K^b) são imunizados usando-se células tumorais de vacinação, isto é, células tumorais J558 alogênicas que expressam ovalbumina irradiadas (H2K^b) com uma dosagem conforme definida no Experimento Preliminar 1. Alguns dos animais recebem o adjuvante ativo BKG (dosagem definida no Experimento Preliminar 3) juntamente com o tumor de vacinação. Após uma semana, 0,5 mL de sangue são retirados dos animais, e a reação imune específica para ovalbumina é determinada por ELISA, coloração de citocina intracelular ou coloração de tetrâmero. Após mais quatro semanas, a reatividade do sistema imune contra células tumorais vivas é determinada por meio de

injeção s.c. de células tumorais B16 que expressam ovalbumina e controle regular do crescimento tumoral com a dosagem das células tumorais correspondendo à determinada no Experimento Preliminar 2.

[00175] Além disso, o efeito de BKG sobre o aumento da reação imune específica para tumor é comparado a bactérias de BCG do tipo selvagem. Como modo de administração, o melhor modo, conforme determinado no Experimento Preliminar 4, é usado em combinação com os dois esquemas de imunização ótimos determinados no Experimento Preliminar 5, compreendendo o melhor esquema de primária-reforço e o melhor esquema de aplicação contínua.

Experimento 2: Vacina terapêutica com tumor usando o sistema de ovalbumina

[00176] Em contraste com a imunização profilática com tumor relatada no experimento 1, gera-se um crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 (H2K^b) por injeção s.c. de células tumorais de teste não-irradiadas, usando-se a dosagem identificada no Experimento Preliminar 2. Uma vez que o tumor tenha um diâmetro de 0,5 cm, os esquemas de vacinação descritos no Experimento 1 são testados. Os testes são interrompidos assim que o tumor tiver atingido um diâmetro de 2 cm. Entretanto, os animais são monitorizados durante um máximo de um ano. Para refletir os processos imunológicos que ocorrem, 0,5 mL de sangue é amostrado dos camundongos a cada quatro semanas, para determinar a resposta imune conforme definida no experimento 1.

Experimento 3: Vacinação profilática com tumor (TRAMP)

[00177] Camundongos TRAMP mostram primeiro neoplasia intra-epitelial na sexta para a sétima semana e acentuado quadro clínico de carcinoma de próstata começando na 15ª semana. Esse carcinoma de próstata é localmente limitado no início, mas, começando na semana 24 em diante, 10% dos animais desenvolvem metástase, e graves estados patológicos podem ser esperados começando nas semanas 32 a 35. A

vacinação profilática com tumor começa na 5ª semana em diante. Usa-se uma única injeção de células tumorais de vacinação sem adjuvante e com adjuvantes. Como células tumorais de vacinação, usam-se células TRAMP-C1 letalmente irradiadas, que é uma linhagem celular de carcinoma de próstata derivada de camundongos TRAMP. As células tumorais de vacinação são usadas sem serem geneticamente manipuladas (wtTRAMP) ou como células transfectadas com IL-2/IFN-gama. Além disso, os dois melhores esquemas de imunização (esquema primário-reforço e esquema de longo prazo), conforme determinado nos Experimentos Preliminares, são testados. Como controle do desenvolvimento de PCa, os animais devem ser submetidos a CT a cada doze semanas. Os seguintes grupos podem ser definidos:

- HV3.1 sem vacinação (grupo de controle)
- HV3.2 vacinação com tumor apenas (células wtTRAMP-C1) s.c.
- HV3.3 vacina BKG (células wtTRAMP-C1 + BKG) s.c.
- HV3.4 vacina BCG (células wtTRAMP-C1 + BCG) s.c.
- HV3.5 vacina com tumor apenas (wtTRAMP) como primário-reforço, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV3.6 vacina BKG (wtTRAMP) como primário-reforço, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV3.7 vacina BCG (wtTRAMP) como primário-reforço, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV3.8 vacinação com tumor apenas (wtTRAMP) como imunização de longo prazo, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV3.9 vacina BKG (wtTRAMP) como imunização de longo prazo, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV3.10 vacina BCG (wtTRAMP) como imunização de longo prazo, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV3.11 vacinação com tumor apenas (células IL2/IFN-gama-TRAMP-C1) s.c.

- HV3.12 vacina BKG (células IL2/IFN-gama-TRAMP-C1 + BKG) s.c.
- HV3.13 vacina BCG (células IL2/IFN-gama-TRAMP-C1 + BCG) s.c.
- HV3.14 vacinação com tumor apenas (IL2/IFN-gama-TRAMP) como primário-reforço, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV3.15 vacina BKG (IL2/IFN-gama-TRAMP) como primário-reforço, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV3.16 vacina BCG (IL2/IFN-gama-TRAMP) como primário-reforço, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV3.17 vacinação com tumor apenas (IL2/IFN-gama-TRAMP) como imunização de longo prazo, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV3.18 vacina BKG (IL2/IFN-gama-TRAMP) como imunização de longo prazo, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV3.19 vacina BCG (IL2/IFN-gama-TRAMP) como imunização de longo prazo, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- [00178] O esquema de imunização dos grupos HV3.2 a HV3.4 e HV3.11 a HV3.13 é representado como figura 2, com os números representando:
- 1: nascimento do camundongo; semana -5
 - 2: vacinação; tempo 0 (camundongo com a idade de 5 semanas)
 - 3: amostra de sangue após uma semana
 - 4: amostra de sangue após sete semanas
 - 5: amostra de sangue e CT após 13 semanas
 - 6: amostra de sangue após 19 semanas
 - 7: amostra de sangue e CT após 25 semanas
 - 8: amostra de sangue após 31 semanas
 - 9: amostra de sangue e CT após 37 semanas
 - 10: amostra de sangue após 40 semanas e eutanásia dos camundongos
- [00179] O esquema de imunização dos grupos HV3.5 a HV3.7 e HV3.14 a HV3.16 é representado como figura 3, com os números representando:

- 1: nascimento do camundongo; semana -2
- 2: vacinação; tempo 0 (primária I)
- 3: amostra de sangue após uma semana
- 4: vacinação após duas semanas (primária II)
- 5: vacinação após quatro semanas (primária III) (com a idade de 6 semanas)
- 6: amostragem de sangue após cinco semanas
- 7: vacinação após dez semanas (vacinação de reforço) (com a idade de 12 semanas)
- 8: amostragem de sangue e CT uma semana após a vacinação de reforço
- 9: amostragem de sangue sete semanas após a vacinação de reforço
- 10: amostragem de sangue e CT 13 semanas após a vacinação de reforço
- 11: amostragem de sangue 19 semanas após a vacinação de reforço
- 12: amostragem de sangue e CT 25 semanas após a vacinação de reforço
- 13: amostragem de sangue 28 semanas após a vacinação de reforço (com a idade de 40 semanas) e eutanásia dos camundongos

[00180] O esquema de imunização dos grupos HV3.8 a HV3.10 e HV3.17 a HV3.19 é representado como figura 4, com os números representando:

- 1: nascimento do camundongo; semana -2
- 2: primeira vacinação; tempo 0
- 3: amostragem de sangue após uma semana
- 4: segunda vacinação após seis semanas (intervalo de vacinação conforme determinado no Experimento Preliminar 5)
- 5: amostragem de sangue após uma semana
- 6: terceira vacinação após doze* semanas
- 7: amostragem de sangue e CT após uma semana

- 8: quarta vacinação após 18* semanas
- 9: amostragem de sangue após uma semana
- 10: quinta vacinação após 24* semanas
- 11: amostragem de sangue e CT após uma semana
- 12: sexta vacinação após 30* semanas
- 13: amostragem de sangue após uma semana
- 14: amostragem de sangue após seis semanas
- 15: amostragem de sangue após 40 semanas e eutanásia dos camundongos

*o intervalo de vacinação depende dos resultados do Experimento Preliminar 5

Experimento 4: Vacinação terapêutica com tumor (TRAMP)

[00181] Todos os camundongos TRAMP desenvolvem um tumor de próstata com a idade de 15 semanas, que está completamente desenvolvido na semana 32 e causa problemas clínicos para os animais. Consequentemente, os animais devem ser imunizados na semana 24. O experimento é interrompido uma vez que um dos critérios de parada tenha sido atendido. No máximo, os animais são monitorizados durante 40 semanas. Para monitorizar os processos imunológicos, uma amostra de sangue de 0,5 mL é retirada do camundongo a cada seis semanas, e a resposta imune é estudada conforme descrito com relação ao experimento 1, e se usa um procedimento de formação de imagem, como CT, a cada doze semanas. As mesmas células tumorais descritas com relação ao experimento 3 são usadas.

[00182] Os seguintes grupos são testados.

- HV4.1 sem vacinação (grupo de controle)
- HV4.2 vacinação com tumor apenas (células wtTRAMP-C1) s.c.
- HV4.3 vacina BKG (células wtTRAMP-C1 + BKG) s.c.
- HV4.4 vacina BCG (células wtTRAMP-C1 + BCG) s.c.

- HV4.5 vacina com tumor apenas (wtTRAMP) como primário-reforço, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV4.6 vacina BKG (wtTRAMP) como primário-reforço, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV4.7 vacina BCG (wtTRAMP) como primário-reforço, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV4.8 vacinação com tumor apenas (wtTRAMP) como imunização de longo prazo, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV4.9 vacina BKG (wtTRAMP) como imunização de longo prazo, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV4.10 vacina BCG (wtTRAMP) como imunização de longo prazo, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV4.11 vacinação com tumor apenas (células IL2/IFN-gama-TRAMP-C1) s.c.
- HV4.12 vacina BKG (células IL2/IFN-gama-TRAMP-C1 + BKG) s.c.
- HV4.13 vacina BCG (células IL2/IFN-gama-TRAMP-C1 + BCG) s.c.
- HV4.14 vacinação com tumor apenas (IL2/IFN-gama-TRAMP) como primário-reforço, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV4.15 vacina BKG (IL2/IFN-gama-TRAMP) como primário-reforço, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV4.16 vacina BCG (IL2/IFN-gama-TRAMP) como primário-reforço, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV4.17 vacinação com tumor apenas (IL2/IFN-gama-TRAMP) como imunização de longo prazo, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV4.18 vacina BKG (IL2/IFN-gama-TRAMP) como imunização de longo prazo, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- HV4.19 vacina BCG (IL2/IFN-gama-TRAMP) como imunização de longo prazo, conforme determinado no Experimento Preliminar 5
- [00183] A figura 5 mostra o esquema de imunização 1 para os grupos

HV4.2 - HV4.4 e HV4.11 - HV4.13, com os números representando:

- 1: nascimento do camundongo
- 2: amostragem de sangue após seis semanas
- 3: amostragem de sangue e CT após doze semanas
- 4: amostragem de sangue após 18 semanas
- 5: vacinação após 24 semanas
- 6: amostragem de sangue e CT após 25 semanas
- 7: amostragem de sangue após 30 semanas
- 8: amostragem de sangue e CT após 36 semanas
- 9: amostragem de sangue após 40 semanas e eutanásia dos camundongos

[00184] A figura 6 mostra o esquema de imunização 2 para os grupos HV4.5 a HV4.7 e HV4.14 a HV4.16, com os números representando:

- 1: nascimento do camundongo
- 2: amostragem de sangue após seis semanas
- 3: amostragem de sangue e CT após doze semanas
- 4: amostragem de sangue após 18 semanas
- 5: vacinação após 24 semanas (primária I)
- 6: amostragem de sangue e CT após 25 semanas
- 7: vacinação após 26 semanas (primária II)
- 8: vacinação após 28 semanas (primária III)
- 9: amostragem de sangue após 30 semanas
- 10: vacinação (vacinação de reforço) após 34 semanas
- 11: amostragem de sangue e CT após 36 semanas
- 12: amostragem de sangue após 40 semanas e eutanásia dos camundongos

[00185] A figura 7 mostra o esquema de imunização 3 para os grupos HV4.8 a HV4.10 e HV4.17 a HV4.19, com os números representando:

- 1: nascimento do camundongo
- 2: amostragem de sangue após seis semanas

- 3: amostragem de sangue e CT após doze semanas
- 4: amostragem de sangue após 18 semanas
- 5: vacinação após 24 semanas (primária I)
- 6: amostragem de sangue e CT após 25 semanas
- 7: vacinação após 30 semanas (primária II)
- 8: amostragem de sangue após 31 semanas
- 9: vacinação após 36 semanas (primária III)
- 10: amostragem de sangue e CT após 37 semanas
- 11: vacinação após 42 semanas (primária IV)
- 12: amostragem de sangue após 43 semanas e eutanásia dos camundongos

[00186] Os intervalos de vacinação dependem, de preferência, dos resultados do Experimento Preliminar 5.

Exemplo 3: Composição para tratamento de câncer de próstata

[00187] Uma composição que é adequada para o tratamento de câncer de próstata contém como um primeiro constituinte BCG que expressa o peptídeo de escape fagolisossômico de *Listeria monocytogenes* (Hly) e é, além disso, ure C-deficiente. Esse BCG modificado também é aqui chamado de rBCG: delta ureC: Hly. A composição contém, como segundo constituinte, células LNCap geneticamente manipuladas. Essas células são células de carcinoma de próstata recombinantes que expressam interleucina-2 (IL2) e interferon-gama (IFN-gama). De preferência, essas células LNCaP expressam ambas as citocinas de uma maneira aproximadamente equimolar. Esse tipo de células LNCaP são, por exemplo, descritas no pedido de patente internacional WO 94/18995. Essas células de câncer de próstata recombinantes foram irradiadas com raios gama para destruir sua capacidade de replicar antes do uso.

[00188] Ambos os constituintes são postos em suspensão em solução salina tamponada com fosfato e apresentados para administração a um paciente. A composição contém 1×10^6 células de BCG e 1×10^6 células

LNCaP contidas em 50 µL. A composição é injetada por via i.v. Para testar a eficácia, realiza-se uma análise ELISPOT. Essa análise ELISPOT é, por exemplo, descrita em Mollenkopf H. J., Dietrich G., Fensterle J. Grode L. Diehl K. D., Knapp B., Singh M., O'Hagan D. T., Ulmer J. B. e Kaufmann S. H. Enhanced protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine by adsorption onto cationic PLG microparticles. *Vaccine*. 29 de julho de 2004; 22(21-22):2690-5.

[00189] Em um regime de tratamento alternativo, a composição acima mencionada é administrada uma vez, seguida por administração adicional de apenas células LNCaP. Assim, é um princípio genérico da presente invenção que o primeiro e o segundo constituintes possam ser administrados a uma frequência diferente e segundo um padrão temporal diferente.

[00190] Em testes clínicos, registram-se a histologia e o estágio tumoral clínico, assim como o status de morte dos pacientes assim tratados. Um parâmetro substituto será, evidentemente, o nível de PSA e o número de pacientes com um curso favorável do nível de PSA.

[00191] Devido à combinação particular administrada ao paciente, será observado tanto um curso favorável do nível de PSA, quanto uma taxa de sobrevida melhorada, que são mais elevados em comparação com os efeitos observados sem o adjuvante, isto é, com administração de apenas células LNCaP.

Exemplo 4: Uso de BKG como adjuvante de uma vacina para HCMV

[00192] Este exemplo relata a combinação bem-sucedida de BKG como um adjuvante e corpos densos de HCMV conforme aqui descrita para induzir imunidade celular contra infecção com citomegalovírus humano. Mais particularmente, relata-se que a imunidade celular pode ser induzida em um curto período de tempo. Essa rápida indução de imunidade contra HCMV é particularmente importante em pacientes que sofram transplante de medula óssea, que se acompanha muito

frequentemente de infecção por HCMV com risco de vida. Para pacientes de transplante, há necessidade de uma rápida geração de imunidade celular, pois não há tempo para vacinação durante um período de tempo mais longo de acordo com a prática padronizada.

[00193] Usou-se o seguinte esquema de vacinação:

Antígeno: corpos densos

dosagem: 20 µg/animal

esquema de imunização: D: dia 0/7/21

C: dia 0/7

B: dia 0

Adjuvante: dosagem: 1 x 10⁶/animal

esquema de imunização: dia 0

Estrutura dos grupos:

Gr.	Número de animais	Vacinas (por animal) dia 0	Vacinas (por animal) dia 7	Vacinas (por animal) dia 21
A	4			
B1	6	20 µg de corpos densos		
B2	6	20 µg de corpos densos + 1 x 10 ⁶ BKG		
C1	6	20 µg de corpos densos	20 µg de corpos densos	
C2	6	20 µg de corpos densos + 1 x 10 ⁶ BKG	20 µg de corpos densos	
D1	6	20 µg de corpos densos	20 µg de corpos densos	20 µg de corpos densos
D2	6	20 µg de corpos densos + 1 x 10 ⁶ BKG	20 µg de corpos densos	20 µg de corpos densos

[00194] A preparação é feita a cada 8 e 9 dias, respectivamente, após a última imunização.

[00195] Os resultados são representados nas figuras 8 e 9, em que a figura 9 é um diagrama representando o número de células IFN-gama-positivas por 10⁵ composto de células T CD8+ com estimulação com uma

mistura peptídica específica para HCMV (da JPT Peptide Technologies GmbH, Berlim, Alemanha). As sequências são tiradas da proteína pp65 de HCMV. É uma mistura (Pepmix) de 138 peptídeos (15 aminoácidos cada) que mostra superposições de sequência de 11 aminoácidos. A figura 8 é um diagrama similar ao da figura 9, em que o respectivo número de células T CD8⁺ foi determinado por estimulação com um peptídeo de controle não específico. Conforme se pode observar nas ditas figuras, no caso de BKG ser usado como um adjuvante na vacinação inicial, em muitos casos, o número de células CD8 IFN-gama-positivas por 10⁵ células T CD8 aumentou significativamente. O aumento mais pronunciado pode ser observado nos grupos B2 e C2. Isso significa que uma vacinação básica com BKG em combinação com corpos densos, em que os corpos densos são administrados no dia 0 e após 7 dias, já é suficiente para aumentar significativamente o número de células IFN-gama-positivas. Isso confirma o surpreendente achado subjacente à presente invenção de que é possível induzir imunidade celular contra HCMV quando se combinam tanto corpos densos, quanto BKG.

Exemplo 5: Composição para o tratamento e prevenção de malária

[00196] Uma composição para o tratamento e prevenção de malária compreende como primeiro constituinte rBCG: delta ure C: Hly e, como segundo constituinte, o antígeno de malária gp190/MSP1. Deve-se reconhecer que o antígeno pode estar presente como um peptídeo ou ser parte de um peptídeo maior, polipeptídeo ou mesmo proteína.

[00197] A composição compreende 50 µg da proteína MSP1 e cerca de 1 x 10⁶ rBCG: delta ure C: Hly em 50 µL de um tampão PBS. A composição é administrada por via s.c. em camundongos. Após a imunização, o baço e o sangue dos camundongos imunizados serão coletados e usados em métodos analíticos.

[00198] O progresso do processo de vacinação é mais uma vez monitorizado usando-se a tecnologia ELISPOT (Mollenkopf H. J., supra)

e um ensaio de inibição da invasão de merozoítos (Blackman *et al.* 1990 J. Exp. Med. Volume 172 P: 379-382). É esperada uma estimulação imune e uma secreção de IFN-gama aperfeiçoadas após a estimulação com peptídeos específicos de MSP-1. Também espera-se uma inibição da invasão induzida pelos soros coletados de camundongos imunizados. Os resultados de ELISPOT de IFN-gama e de inibição de merozoítos são correlatos de proteções.

[00199] As características da presente invenção apresentadas no relatório, nas reivindicações, na listagem de sequência e/ou nos desenhos podem ser, tanto separadamente, quanto em qualquer de suas combinações, material para a realização da invenção em suas várias formas.

REIVINDICAÇÕES

1. Combinação compreendendo um primeiro constituinte e um segundo constituinte separado, caracterizada pelo fato de que o primeiro constituinte é uma célula de *Mycobacterium bovis* Bacilo Calmette-Guérin (BCG) deficiente em urease C que compreende pelo menos uma molécula de ácido nucléico recombinante que codifica a proteína de escape fagolisossômico de *Listeria*, listeriolisina (rBCG Δ ureC:Hly), e em que o segundo constituinte é um antígeno.

2. Combinação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o antígeno é selecionado a partir do grupo compreendendo um antígeno de parasita, um antígeno de tumor, um antígeno de vírus, uma célula tumoral imunogênica, uma célula eucariótica que expressa um antígeno associado a um tumor, uma célula eucariótica que expressa um antígeno específico de um tumor, uma célula que expressa um antígeno de parasita, um citomegalovírus humano e um corpo denso de HCMV.

3. Combinação de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o antígeno é a proteína gp190/MSP1 de *Plasmodium*, de preferência *Plasmodium falciparum*.

4. Combinação de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o antígeno é o citomegalovírus humano.

5. Combinação de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o antígeno é uma partícula viral ou uma multiplicidade da mesma, de preferência liberada após a infecção de células de mamíferos por citomegalovírus humano, em que as partículas (a) estão envolvidas por uma membrana lipídica em que as glicoproteínas virais estejam incrustadas, e (b) não contêm DNA nem capsídeos virais.

6. Combinação de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que as partículas contêm uma proteína de fusão

compreendendo uma ou mais partes do antígeno de células T pp65 (UL83) e uma ou mais partes de uma ou mais proteínas que não sejam pp65.

7. Combinação de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o antígeno de células T pp65 é fusionado a uma ou mais partes de uma glicoproteína do citomegalovírus humano, em que a glicoproteína é selecionada a partir do grupo que compreende a glicoproteína gH de HCMV, a proteína IE₁ (ppUL123) de HCMV e a glicoproteína gB de HCMV.

8. Combinação de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o antígeno de células T é fusionado a uma ou mais partes de uma proteína que seja parte de um patógeno humano diferente do HCMV.

9. Combinação de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o patógeno é selecionado a partir do grupo que compreende HIV-1, HBV, HCV e influenza.

10. Combinação de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 9, caracterizada pelo fato de que a(s) partícula(s) contém(êm) partes de pelo menos duas glicoproteínas que sejam variantes de uma glicoproteína particular de diferentes cepas de HCMV.

11. Combinação de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que uma das duas variantes da glicoproteína de HCMV particular é a variante da cepa Towne de HCMV, e a outra é a variante da cepa Ad169 de HCMV.

12. Combinação de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 11, caracterizada pelo fato de que as células de mamíferos são fibroblastos, de preferência fibroblastos de prepúcio.

13. Combinação de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 12, caracterizada pelo fato de que a partícula é um corpo denso.

14. Combinação de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o antígeno é um corpo denso de HCMV.

15. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma combinação como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 14 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

16. Método para a fabricação de uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- fornecer como primeiro constituinte uma célula de *Mycobacterium bovis* Bacilo Calmette-Guérin (BCG) deficiente em urease C que compreende pelo menos uma molécula de ácido nucléico recombinante que codifica a proteína de escape fagolisossômico de *Listeria*, listeriolisina (rBCG Δ ureC:Hly);

- fornecer como segundo constituinte separado um antígeno;

e

- formular o primeiro constituinte e segundo constituinte em uma composição farmacêutica.

17. Método para a fabricação de uma combinação farmacêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- fornecer como primeiro constituinte uma célula de *Mycobacterium bovis* Bacilo Calmette-Guérin (BCG) deficiente em urease C que compreende pelo menos uma molécula de ácido nucléico recombinante que codifica a proteína de escape fagolisossômico de *Listeria*, listeriolisina (rBCG Δ ureC:Hly);

- fornecer como segundo constituinte separado um antígeno;

e

- formular os primeiro e segundo constituintes separadamente.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o primeiro constituinte formulado e o segundo constituinte formulado são embalados em uma única embalagem.

19. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o primeiro constituinte formulado e o segundo constituinte formulado são embalados em embalagens separadas.

20. Método de acordo com a reivindicação 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que as embalagens são unidades de dosagem única ou compreendem múltiplas unidades de dosagem única.

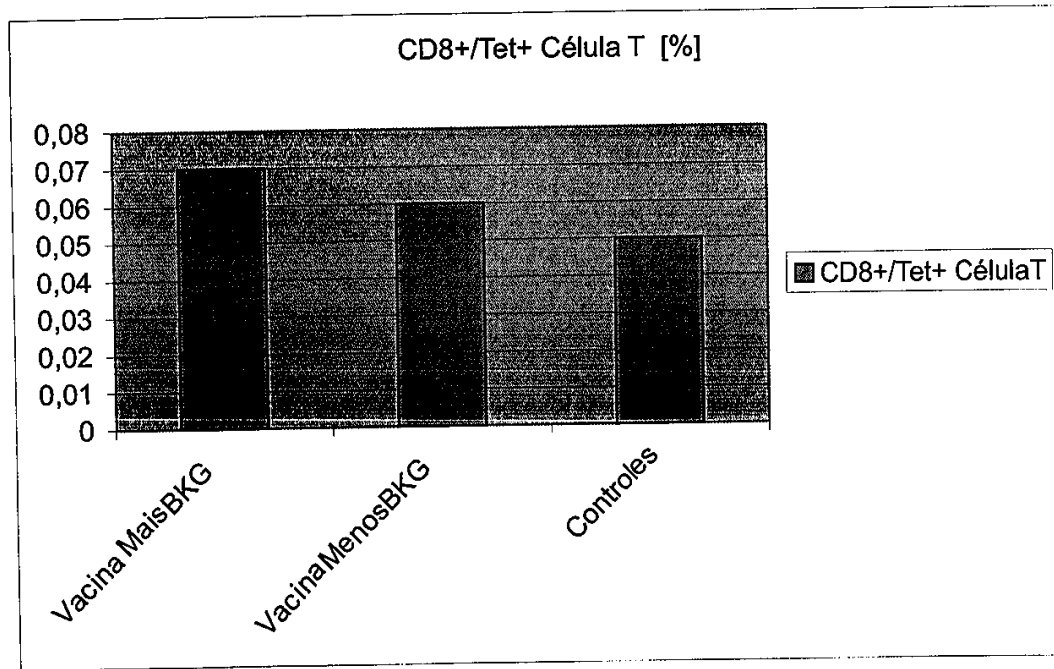


Fig. 1

Experimento 3: Esquema de imunização 1: Gr. HV3.2 - HV3.4 e HV3.11 - HV3.13



Fig. 2

Experimento 3: Esquema de imunização 2: Gr. HV3.5 - HV3.7 assim como HV3.14- HV3.16

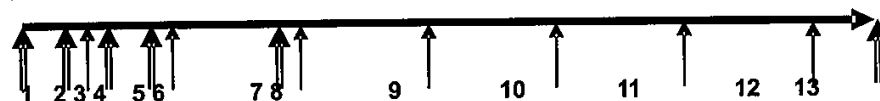


Fig. 3

Experimento 3: Esquema de imunização 3: Gr. HV3.8 - HV3.10 assim como HV3.17 - HV3.19

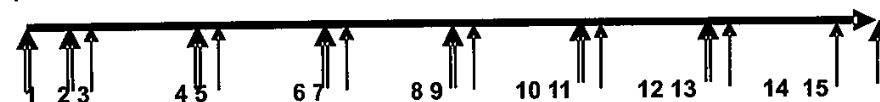


Fig. 4

Experimento 4: Esquema de imunização 1: Gr. HV4.2 - HV4.4 e HV4.11 - HV4.13

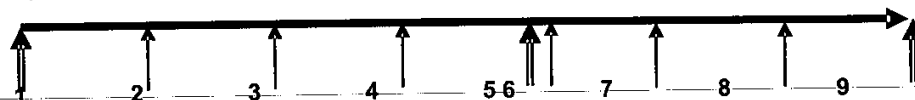


Fig. 5

Experimento 4: Esquema de imunização 2: Gr. HV4.5 – HV4.7 assim como HV4.14 – HV4.16

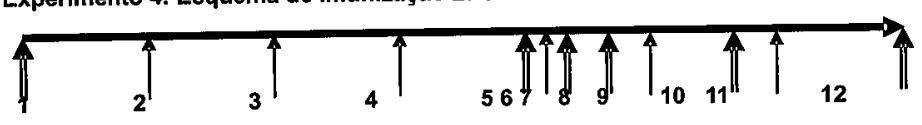


Fig. 6

Experimento 4: Esquema de imunização 3: Gr. HV4.8 – HV4.10 assim como HV4.17 – HV4.19

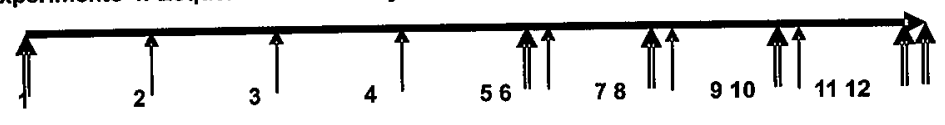


Fig. 7

- A: PBS
- ▲ B1: 1xDB
- ▼ B2: 1x(DB+Adj)
- C1: 2xDB
- C2: 1x(DB+Adj)+1xDB
- D1: 3xDB
- ▲ D2: 1x(DB+Adj)+2xDB

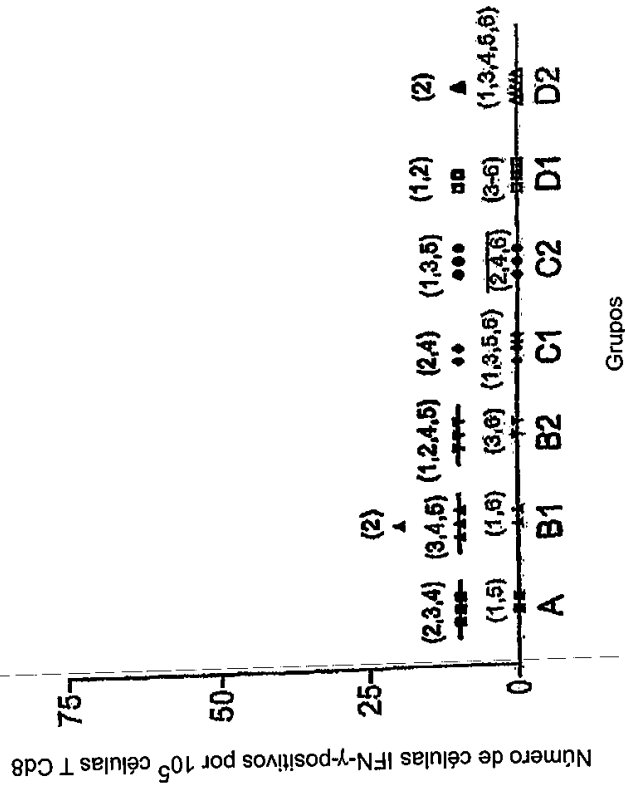


Fig. 8



Fig. 9