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

(11) PI 0920240-4 B1

(22) Data do Depósito: 15/10/2009

(45) Data de Concessão: 19/01/2021

(54) Título: COMPOSIÇÃO ADJUVANTE

(51) Int.Cl.: C07K 7/08; A61K 39/10; A61K 39/155; A61K 39/39; A61P 31/04; (...).

(30) Prioridade Unionista: 16/10/2008 US 61/196.226.

(73) Titular(es): UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN; THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA; DALHOUSIE UNIVERSITY; INTERNATIONAL VACCINE INSTITUTE.

(72) Inventor(es): SONG LEE; MI-NA KWEON; JASON KINDRACHUK; MELISSA ELLIOTT; ROBERT HANCOCK; SCOTT HALPERIN; JENNIFER KOVACS-NOLAN; GEORGE MUTWIRI; SYLVIA VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK; VOLKER GERDTS; ANDREW POTTER; LORNE BABIUK.

(86) Pedido PCT: PCT CA2009001463 de 15/10/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/043039 de 22/04/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 14/04/2011

(57) Resumo: FORMULAÇÃO DE ADJUVANTE DE COMBINAÇÃO A presente invenção se refere a métodos e composições para aumentar uma resposta imune para um antígeno selecionado. Os métodos são para o tratamento e prevenção de infecções microbiológicas, tais como infecções causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitas. Os métodos e composições incluem peptídeos de defesa do hospedeiro, polifosfazenos e seqüências imunioestimulatórias para aumentar a resposta imune de um antígeno co-administrado.

COMPOSIÇÃO ADJUVANTE

Campo Técnico

[0001] A presente invenção pertence geralmente a composições para aumentar a resposta imune. Em particular, a invenção se refere a composições adjuvantes de combinação incluindo um peptídeo de defesa do hospedeiro, uma seqüência imunoestimulatória e um polímero polianiônico, para uso como adjuvantes de vacina.

Antecedentes

[0002] Vacinas mortas ou de subunidades são muitas vezes pouco imunogênicas, e podem resultar em respostas fracas e transientes de T-célula, requerendo assim adjuvantes para aumentar a resposta imune. Entretanto, muitas vacinas atualmente disponíveis incluem adjuvantes que são sub-optimais em relação à qualidade e magnitude das respostas imune que elas induzem. Por exemplo, alúmen, o único adjuvante aprovado para uso em humanos nos Estados Unidos, induz boas respostas imunes tipo Th2, mas não é um adjuvante potente para respostas imune tipo Th1 (HogenEsch te al., *Vaccine* (2002) 20 Suppl 3:S34-39). Assim, existe uma necessidade de adjuvantes mais eficazes e seguros adicionais.

[0003] Existem duas grandes categorias de adjuvantes – sistemas de distribuição e adjuvantes imunoestimulatórios. Sistemas de distribuição incluem formulações particuladas como os lipossomas e micropartículas. O mecanismo de ação desses sistemas não é totalmente compreendido, mas acredita-se que envolva uma maior ingestão por células apresentando antígenos (APC) e/ou formação de um depósito no local da injeção. Adjuvantes imunoestimulatórios estimulam a imunidade inata resultando na secreção de citocinas e regulação de moléculas co-estimulatórias. Sabe-se agora que esses eventos desempenham um papel instrucional no desenvolvimento das respostas imune adaptativas.

[0004] Os adjuvantes imunoestimulatórios mais estudados são componentes microbiais, que são potentes moléculas de modulação imune. O DNA bacteriano, bem como oligonucleotídeos CpG sintéticos se ligam ao receptor celular Toll-Like Receptor 9 (TLR9) e estimulam uma cascata de eventos sinalizadores de células. Oligonucleotídeos CpG são seqüências de DNA contendo um dinucleotídeo CpG não-metilado, flanqueados por duas 5’

purinas e duas 3’ pirimidinas. Descobriu-se que oligonucleotídeos CpG estimulam as respostas imune inatas e desencadeiam a produção de citocinas tipo Th-1, incluindo IFN-γ, IL-6, IL-12, e TNF-α, via interação do motivo CpG com TLR9 em células dendríticas, macrófagos, e linfócitos B (Klinman et al., *Vaccine* (1999) 17:19-25; Klinman et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) 93:2879-2883; Krieg, A.M., *Nat Ver Drug Discov* (2006) 5:471-484; e Krieg et al., Nature (1995) 374:546-549). Descobriu-se que a co-imunização de antígenos de proteína com ODNs CpG sintéticos aumentam a produção de IgG antígeno-específico e direcionam a T-célula para um fenótipo Th1 (Ioannou et al., *Vaccine* (2002) 21:127-137). Os efeitos adjuvantes do CpG foram bem demonstrados com uma variedade de antígenos virais, bacterianos e protozoários em um número de espécies incluindo camundongos, gado, ovelhas, porcos, e humanos (Cooper et al., *Aids* (2005) 19:1473-1479; Alcon et al., *Vaccine* (2003) 21:1811-1814; Davis et al., *J. Immunol.* (1998) 160:870-876; Ioannou et al., *J. Virol.* (2002) 76:9002-9010; Ioannou et al., *Vaccine* (2002) 21:127-137).

[0005] TLR9 também pode se ligar e ser ativado por DNA não-CpG (Kindravhuk et al., *J. Biol. Chem.* (2007) 282: 13944-53; Lande et al., *Nature* (2007) 449: 564-9). Essa atividade, combinada com a catelicidina humana LL-37, indica que a especificidade desse receptor pode ser ampliada para moléculas de DNA microbianas ou hospedeiras que são capazes de localizar o endossomo (Lande et al., *Nature* (2007) 449: 564-9).

[0006] Componentes virais como RNA de cadeia dupla (ds) também demonstraram ter potentes propriedades imunoestimulatórias. O dsRNA, bem como o ácido-polyribocytidylic polyriboinosinic (poly(I:C)) análogo dsRNA sintético, são reconhecidos pelo TLR3 resultando em ativação do receptor (Alexopoulou et al., *Nature* (2001) 413: 732-8). A expressão de TLR3 demonstrou conferir receptividade ao dsRNA purificado e poli(I:C) em células cultivadas. Adicionalmente, camundongos TLR3-deficientes apresentaram respostas insuficientes a esses ligantes (Akira e Takeda *Nat Ver Immunol* (2004) 4: 499-511). Mais recentemente, o mRNA componente da célula hospedeira demonstrou ser imunoeatimulatório devido ao reconhecimento e ativação de TLR3 seguindo a liberação das células (Kariko et al., *J. Biol. Chem.* (2004) 26: 12542-12550). A ativação do TLR3 resulta na indução de NFkB e

IRF3, levando finalmente à produção das moléculas anti-virais como as IFN tipo I (Alexopoulou et al., *Nature* (2001) 413: 732-8). A ativação do TLR3 inicia cascatas de fosforilação e eventos de ativação transcricional que resultam na produção de numerosas citocinas inflamatórias que se acredita contribuírem para a imunidade inata (Takeda e Akira *J. Derm. Sci.* (2004) 34: 73-82).

[0007] Peptídeos antimicrobianos (AMPs), também chamados de "peptídeos de defesa do hospedeiro" representam elementos cruciais do sistema imune inato. AMPs podem ser classificados em dois grandes grupos de peptídeos cíclicos ou lineares que incluem uma ampla variedade de moléculas como lisozimas, lactoferrinas, inibidores da leucoprotease secretora, defensinas e catelicidinas. Tipicamente, AMPs são pequenas moléculas que muitas vezes apresentam uma forte carga catiônica. AMPs agem como moléculas efetoras de imunidade inata matando um amplo espectro de micróbios incluindo bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas, fungos, parasitas e vírus.

[0008] Defensinas e catelicidinas são as duas principais famílias de peptídeos anti-microbianos de mamíferos. As defensinas apresentam uma pletora de atividades imunomodulatórias, incluindo a capacidade de estimular a quimiotaxia de células dendríticas e T-células imaturas, produção de glucocorticóides, fagocitose de macrófagos, degranulação de mastócitos, ativação complementar e produção de IL-8 por células epiteliais (Yang et al., *Cell. Mol. Life Sci.* (2001) 58: 978-989). Assim, as defensinas representam uma ligação importante entre imunidade inata e adquirida e são potentes moduladores imune e adjuvantes para vacinas. Por exemplo, baixas concentrações de uma α-defensina humana (10-100 ng, administrada com KLH absorvido para alúmen) leva a um forte aumento de IgG1, IgG2a e IgG2b, indicativo de estimulação de ambas as respostas Th1 e Th2 (Tani et al., *Int. Immunol.* (2000) 12: 691-700; Lillard et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96: 651-656). Em contraste, α- e β-defensinas, co-distribuídas de forma intra-nasal, revelaram estimular primariamente uma resposta Th-2 (IgG1 e IgG2b, mas não IgG2a ou IgM) para ovalbumina (Brogden et al., *Int. J. Antimicrob. Agents* (2003) 22: 465-478). A imunização intradérmica de camundongos com uma construção de fusão codificando a glicoproteína 120 HIV e β-defensina 2 resultou em fortes respostas imune humorais e mucosais mediadas por células

contra o HIV e respostas imunes anti-tumores foram bastante aumentadas pela presença de defensinas.

[0009] Da mesma forma, as catelicidinas, outra classe de peptídeos de defesa do hospedeiro de mamíferos endógenos, revelaram exercer um número de funções imune-moduladoras. Além da sua bem documentada atividade anti-microbiana, as catelicidinas agem como fatores quimiotáticos, induzem citocinas e quimiocinas, alteram a expressão genética em células hospedeiras, e modulam a função da célula dendrítica (Bowdish et al., *Antimicrob. Agents Chemoter.* (2005) 49: 1727-1732; Brown et al., *Curr. Opin. Immunol.* (2006) 18: 24-30; Hancock, R.E., *Lancet Infect. Dis.* (2001) 1: 156-164). Evidências recentes também mostraram que a catelicidina humana LL-37 (An et al., Leuk. Res. (2005) 29: 535-543) e o peptídeo anti-microbiano cathelin-relacionado em camundongos (CRAMP) (Kurosawa et al., *J. Immunol.* (2005) 174: 6257-6265) foram capazes de aumentar as respostas imune adaptativas.

[0010] A indolicidina, um dos menores peptídeos de defesa do hospedeiro conhecidos, é um peptídeo 13-aminoácido linear encontrado em grânulos citoplásmicos de neutrófilos bovinos (Selsted et al., *J. Biol. Chem.* (1992) 267: 4292-4295). Descobriu-se que *in vitro* inibe a secreção de TNF-α LPS-induzida por células tipo macrófagos humanos, e induz a produção da quimiocina IL-8 em células epiteliais bronquiais humanas (Bowdish et al., *Antimicrob. Agents Chemoter.* (2005) 49: 1727-1732), entretanto a sua atividade como um adjuvante *in vivo* ainda não foi determinada.

[0011] Polifosfazenos são polímeros de alto peso molecular e solúveis em água, contendo uma espinha dorsal de átomos de fósforo e nitrogênio alternantes (Payne et al., *Vaccine* (1998) 16: 92-98). Descobriu-se que um dos mais investigados polieletrólitos de polifosfazeno, poli[di(sodio carboxilalatofenoxi)fosfazeno] (PCPP) exerce atividade adjuvante quando incorporado a um número de formulações de vacinas, incluindo influenza (Payne et al., *Vaccine* (1998) 16: 92-98), rotavírus humano (McNeal et al., *Vaccine* (1999) 17: 1573-1580), e vacinas do cólera (Wu et al., *Infect. Immun.* (2001) 69: 7695-7702). Similarmente, poli(di-4-oxifenilpropionato)fosfazeno (PCEP) mostrou aumentar as respostas imune antígeno-específicas para antígenos da influenza (Mutwiri et al., *Vaccine* (2007) 25: 1204-1213). A atividade adjuvante do polifosfazeno não parece ser devida à formação de um

depósito no local da injeção, mas sim pode estar ligada à capacidade do polímero de formar complexos não-covalentes e solúveis em água com antígenos, estabilizando-os e permitindo a eficiente apresentação a células imune (Andrianov et al., *Biomacromolecules* (2005) 5: 1999-2006; Payne et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* (1998) 31: 185-196).

[0012] A co-administração de PCPP com um oligonucleotído CpG mostrou aumentar respostas imune em camundongos imunizados com o antígeno de superfície da hepatite B (Mutwiri et al., *Vaccine* (2008) 26: 2680-2688). Adicionalmente, a imunização intranasal usando uma vacina do vírus respiratório sincicial bovino formalin-inativado (BRSV) co-formulada com um oligonucleotídeo CpG e PCPP resultou em uma maior proteção contra a desafio do BRSV (Mapletoft et al., *J. Gen. Virol.* (2008) 89: 250-260).

[0013] Apesar dos vários avanços na tecnologia de adjuvantes, permanece uma necessidade de métodos seguros e eficazes para evitar doenças infecciosas. Assim, a ampla disponibilidade de novos adjuvantes seria altamente desejável e poderia salvar um considerável número de vidas.

Sumário da Invenção

[0014] A presente invenção é baseada em parte, na surpreendente descoberta de que o uso de um sistema de distribuição incluindo um peptídeo de defesa do hospedeiro, em combinação com um polímero polianiônico como um polifosfazeno, e uma seqüência de ácido nucléico possuindo propriedades imunoestimulatórias (ISS), como uma molécula de oligodeoxinucleotídeo com ou sem um motivo CpG (uma citosina seguida por guanosina e unida por uma ligação de fosfato) ou o poli(I:C) análogo de dsRNA sintético, proporciona títulos de anticorpos mais altamente significativos a um antígeno co-administrado, do que aqueles observados sem esses sistemas de distribuição. O uso dessas combinações fornece uma abordagem segura e eficaz para aumentar a imunogenicidade de uma variedade de antígenos de vacina para uso em composições tanto profiláticas quanto terapêuticas.

[0015] Da mesma forma, em uma representação, a invenção é direcionada para uma composição adjuvante compreendendo um peptídeo de defesa do hospedeiro, uma seqüência imunoestimulatória e um polímero polianiônico, na qual a composição de adjuvante é capaz de aumentar uma resposta imune a um antígeno selecionado. Em determinadas representações,

a composição adjuvante compreende ainda o antígeno. Em representações adicionais, o antígeno, seja incluído ou separado da composição adjuvante, é de um vírus, bactéria, parasita ou fungo, por exemplo, de um vírus respiratório sincicial (RSV), como o de BRSV ou de *Bordetella*, como o de *B. pertussis*.

[0016] Em representações adicionais, o peptídeo de defesa do hospedeiro é uma defensina ou catelicidina. Em outras representações, o peptídeo de defesa do hospedeiro é um ou mais das SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 ou SEQ ID NO:27.

[0017] Em representações adicionais, o polímero polianiônico é poli[di(sódio carboxilalatofenoxi)fosfazeno] (PCPP), poli(di-4-oxifenilproprionato)fosfazeno (PCEP), ou um polímero PCPP compreendendo 90% de copolímero PCPP com 10% de grupos hidroxil (90:10 PCPP).

[0018] Em outras representações, a sequência imunoestimulatória é um oligonucleotídeo CpG, como um oligonucleotídeo CpG totalmente fosforotionado, por exemplo, um ou mais das SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 ou SEQ ID NO:12.

[0019] Em representações adicionais, a seqüência imunoestimulatória é SEQ ID NO:13.

[0020] Em ainda outras representações, a seqüência imunoestimulatória é poli(I:C).

[0021] Em representações adicionais, a invenção é direcionada a um método para aumentar a resposta imune a um antígeno selecionado. O método compreende administrar a um indivíduo qualquer uma das composições descritas acima. Em determinadas representações, o peptídeo de defesa do hospedeiro, a seqüência imunoestimuatória, o polímero polianiônico e o antígeno selecionado estão presentes na mesma composição. Em representações alternativas, pelo menos um ou do peptídeo de defesa do hospedeiro, da seqüência imunoestimulatória, do polímero polianiônico ou do antígeno selecionado está presente em uma composição diferente da dos outros.

[0022] Em outras representações, a invenção é direcionada a um peptídeo imunoestimulatório compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:7. Em representações adicionais, o peptídeo imunoestimulatório consiste de uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:7.

[0023] Essas e outras representações da invenção ocorrerão facilmente aos especialistas na matéria em vista do que é aqui divulgado.

Breve Descrição das Figuras

[0024] Figura 1 mostra compostos de polifosfazina representativos para uso nas presentes formulações.

[0025] Figuras 2A-2D mostram o esquema de síntese para PCPP. Figura 2A mostra uma reação de polimerização de abertura de anel (ROP) usada para converter hexaclorociclotrifosfazeno [$(N=PC1_2)_3$] para polidiclorofosfazeno (PDCP). Figura 2B mostra a primeira etapa da síntese de PCPP que converte PDCP em poli(p-di-n-propoxicarboxilalatofenoxi)-fosfazeno. Figura 2C mostra a conversão de poli(p-di-n-propoxicarboxilalatofenoxi)fosfazeno em 100% PCPP. Figura 2D mostra a conversão de 100% PCPP, sal de sódio para ácido poli(p-dicarboxilalatofenoxi)fosfazeno (PCPP-H).

[0026] Figura 3 mostra um esquema de produção para um polímero PCPP composto de 90% de copolímero PCPP com 10% de grupos hidroxil (90:10 PCPP).

[0027] Figuras 4A e 4B mostram o esquema de síntese para poli(di-4-oxifenilproprionato)fosfazeno (PCEP). Figura 4A mostra a conversão de PDCP em polidi(metil-3-(4-oxifenil)-proprionato)fosfazeno. Figura 4B mostra o esquema de conversão para polidi(metil-3-(4-oxifenil)-proprionato)fosfazeno para PCEP.

[0028] Figuras 5A-5D mostram IgG1 OVA-específico (Figuras 5A e 5C) e títulos de IgG2a (Figuras 5B e 5D) após uma imunização (Figuras 5A e 5B) ou duas imunizações (Figuras 5C e 5D) como descrito nos exemplos.

[0029] Figuras 6A e 6B mostram secreção de citocina antígeno-específica após imunização com OVA e formulações de vacinas selecionadas, como descrito nos exemplos.

[0030] Figuras 7A-7D mostram respostas de anticorpos ΔF-específicas em soros de camundongos imunizados. O soro total anti-ΔF de títulos de IgG foi medido pós uma (Figura7A) e duas (Figura7B) imunizações. Títulos de IgG1 (Figura 7C) e IgG2a (Figura 7D) foram medidos após duas imunizações. Cada ponto de dados representa um animal individual, e os valores médios são indicados por linhas horizontais. *, *P*<0,05; **, *P*<0,01; ***, *P*<0,001.

[0031] Figuras 8A e 8B mostram números de esplenócitos IFN-γ-secretores (Figura 8A) e IL-5 secretores (Figura 8B) em resposta a re-estimulação *in vitro* com ΔF. Os resultados são expressados como a diferença entre o número de células citocina-secretoras em poços ΔF-estimulados e poços de controle-médio por 10^6 células. Cada ponto de dados representa um animal individual, e valores médios são indicados por linhas horizontais. *, *P*<0,05; **, *P*<0,01; ***, *P*<0,001.

[0032] Figuras 9A-9D mostram uma comparação de respostas imune ΔF-específicas em camundongos C57BL/6 (símbolos sombreados) e Balb/c (símbolos abertos). Figura 9A mostra títulos IgG1; Figura 9B mostra títulos IgG2a; Figura 9C mostra os números de esplenócitos IFN-secretores; e Figura 9D mostra números de esplenócitos IL-5-secretores. Os resultados da re-estimulação *in vitro* são expressados na diferença entre o número de células citocina-secretoras em poços ΔF-estimulados e poços de controle-médio por 106 células. Cada ponto de dados representa um animal individual, e os valores médios são indicados por linhas horizontais. **, *P*<0,01: ***, *P*<0,001.

[0033] Figuras 10A-10D mostram respostas de soro IgG ΔF-específicas em camundongos como está detalhado nos exemplos. Figura 10A mostra a cinética das respostas de soro IgG ΔF-específicas após uma ou duas imunizações, e após desafio. Cada ponto de dados representa o valor médio de cada grupo. Figura 10B mostra IgG1 (círculos) e IgG2a (quadrados) ΔF-específicos após uma e duas imunizações. Cada ponto de dados representa um animal individual, e os valores médios são indicados por linhas horizontais. Figura 10C mostra IgG1 (círculos) e IgG2a (quadrados) ΔF-específicos após desafio. Cada ponto de dados representa um animal individual, e os valores médios são indicados por linhas horizontais. Figura 10D mostra títulos de anticorpos vírus-neutralizadores em soro após duas imunizações (barras vazias) a após desafio (barras sombreadas). Barras vazias indicam valores

obtidos de um pool de soros; barras sombreadas indicam valores médios dos títulos individuais dentro de cada grupo. ***, *P*<0,001.

[0034] Figuras 11A e 11B mostram respostas imune celulares em camundongos imunizados com ΔF sozinho ou ΔF/CpG/indol/PP. Figura 11A mostra os números dos esplenócitos IFN-γ-secretores em resposta a re-estimulação *in vitro* com ΔF em camundongos desafiodos com BRSV. Figura 11B mostra os números dos esplenócitos IL-5-secretores em resposta a re-estimulação *in vitro* com ΔF em camundongos desafiados com BRSV. Os resultados são expressados como a diferença entre o número de células citocina-secretoras em poços ΔF-estimulados e poços de controle médio por 106 células. Cada ponto de dados representa um animal individual, e os valores médios são indicados por linhas horizontais. **, *P*<0,01.

[0035] Figuras 12A-12C mostram a indução citocina/quimiocina e populações de células nos pulmões de camundongos imunizados com ΔF sozinho ou ΔF/CpG/indol/PP. Figura 12A mostra as concentrações de IL-5 em sobrenadantes homogeneizados de pulmão. Cada ponto de dados representa um animal individual, e os valores médios são indicados por linhas horizontais. Figura 12B mostra concentrações de eotaxina em sobrenadantes homogeneizados de pulmão. Cada ponto de dados representa um animal individual, e os valores médios são indicados por linhas horizontais. Figura 12C mostra células imune presentes nos pulmões após imunização e desafio. As barras representam percentual de tipo de célula por mínimo de 200 células. **, *P*<0,01.

[0036] Figura 13 mostra cópias de RNA viral em tecido pulmonar após imunização e desafio em camundongos imunizados com ΔF sozinho ou ΔF/CpG/indol/PP. Cada ponto de dados representa um animal individual, e os valores médios são indicados por linhas horizontais. **, *P*<0,01.

[0037] Figuras 14A 14B mostram respostas imune em gado a OVA vacinados com formulações de vacina selecionadas. Figura 14A mostra o total de soro de títulos de IgG. Figura 14B mostra números de células IFN-γ-secretoras. Cada ponto de dados representa um animal individual, e os valores médios são indicados por linhas horizontais. *, *P*<0,05; **, P<0,01; ***, *P*<0,001.

[0038] Figuras 15A-15C mostram os resultados de experimentos em que gado foi imunizado com várias composições como indicado. Figura 15A mostra total de soro de títulos de IgG anti-HEL após imunização primária. Figura 15B mostra total de soro de títulos de IgG anti-HEL após imunização secundária. Figura 15C mostra números de células IFN-γ-secretoras. Títulos de ELISA foram expressados como a recíproca da mais alta diluição resultante em uma leitura de dois desvios padrão acima do controle negativo. Resultados de ELISPOT foram expressados como a diferença entre o número de células citocina-secretoras em poços HEL-estimulados e poços de controle médio por 106 células. Valores representam média geométrica. *, *P*<0,05; **, *P*<0,01; ***, *P*<0,001.

[0039] Figuras 16A-16C mostram secreção de citocina *in vitro* por PBMCs bovinos estimulados por várias combinações de adjuvantes em várias concentrações. Figura 16A mostra níveis de IFN-α. Figura 16B mostra níveis de TFN-α. Figura 16B mostra níveis de IFN-γ. Os dados mostrados representam os valores médios para 8 bezerros. *, *P*<0,05; **, *P*<0,01; ***, *P*<0,001.

[0040] Figura 17 mostra resposta de IgG total a vacinação com toxóide pertussis seja sozinho ou co-formulado com vários adjuvantes como descrito nos exemplos. Os grupos de vacinas são os seguintes: 1-PBS-QUADRACEL; 3-1,0 µg PTd sozinho; 4-1,0 µg PTd + adjuvante triplo; 5-1,0 µg PTd + adjuvante triplo (duas doses); 6-0,2 µg PTd sozinho; 7-0,2 µg PTd + adjuvante triplo; 8-0,2 µg PTd + adjuvante triplo (duas doses).

[0041] Figura 18 mostra a cinética da resposta IgG anti-PTd a vacinação com toxóide pertussis (PTd) seja sozinho, ou co-formulado com vários adjuvantes como especificado. Dois grupos receberam duas vacinações da formulação – os grupos 1 µg PTD + adjuvante triplo e 0,2 µg PTd + grupos de adjuvante triplo.

[0042] Figura 19 mostra respostas individuais de IgG1 a vacinação com toxóide pertussis seja sozinho ou co-formulado com vários adjuvantes como descrito nos exemplos no dia 49. Os grupos de vacinas são os seguintes: 1-PBS-QUADRACEL; 3-1.0 µg PTd sozinho; 4-1,0 µg PTd + adjuvante triplo; 5-1,0 µg PTd + adjuvante triplo (duas doses); 6-0,2 µg PTd sozinho; 7-0,2 µg PTd + adjuvante triplo; 8-0,2 µg PTd + adjuvante triplo (duas doses).

[0043] Figura 20 mostra respostas individuais de IgG2a à vacinação com toxóide pertussis seja sozinho ou co-formulado com vários adjuvantes como descrito nos exemplos no dia 49. Os grupos de vacinas são os seguintes: 1-PBS-QUADRACEL; 3-1,0 µg PTd sozinho; 4-1,0 µg PTd + adjuvante triplo; 5-1,0 µg PTd + adjuvante triplo (duas doses); 6-0,2 µg PTd sozinho; 7-0,2 µg PTd + adjuvante triplo; 8-0,2 µg PTd + adjuvante triplo (duas doses).

[0044] Figura 21 mostra a cinética das respostas de IgG1 anti-PTd-específicas a vacinação com toxóide pertussis seja sozinho ou co-formulado com vários adjuvantes como especificado. Dois grupos receberam duas vacinações da formulação -- 1 µg PTD + adjuvante triplo, e 0,2 µg PTd + grupos de adjuvantes triplos.

[0045] Figura 22 mostra a cinética das respostas de IgG2a anti-PTd-específicas a vacinação com toxóide pertussis seja sozinho ou co-formulado com vários adjuvantes como especificado. Dois grupos receberam duas vacinações da formulação -- 1 µg PTD + adjuvante triplo e 0,2 µg PTd + grupos de adjuvantes triplos.

Descrição Detalhada da Invenção

[0046] A prática da presente invenção empregará, salvo indicação em contrário, métodos convencionais de microbiologia, química, técnicas de DNA recombinante e imunologia, dentro da especialidade da técnica. Essas técnicas são totalmente explicadas na literatura. Ver, ex., *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D>M> Weir e C.C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman e Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., edição atual); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick e N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.).

[0047] As seguintes abreviações de aminoácidos são usadas por todo o texto:

Alanina: Ala (A)	Arginina: Arg (R)
Asparagina: Asn (N)	Ácido Aspártico: Asp (D)
Cisteína: Cys (C)	Glutamina:Gln (Q)
Ácido Glutâmico: Glu (E)	Glicina: Gly (G)

Histidina: His (H)	Isoleucina: Ile (I)
Leucina: Leu (L)	Lisina: Lys (K)
Metionina: Met (M)	Fenilalanina: Phe (F)
Prolina: Pro (P)	Serina: Ser (S)
Treonina: Thr (T)	Triptofano: Trp (W)
Tirosina: Tyr (Y)	Valina: Val (V)
Dehidroalanina (Dha)	Deidrobutirina (Dhb)

As seguintes seqüências estão presentes aqui:

SEQ ID NO	SEQUENCIA	NOME
1	ILPWKWPWWPWRR	indolicidin
2	VFLRRIRVI VIR	JK1
3	VFWRRIRVWVIR	JK2
4	VQLRAIRVRVIR	JK3
5	VQLRRIRVWVIR	JK4
6	VQWRAIRVRVIR	JK5
7	VQWRRIRVWVIR	JK6
8	TCCATGACGTTCCTGACGTT	CpG 1826
9	TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT	CpG 2007
10	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	CpG 7909 ou 10103
11	GGGGACGACGTCGTGGGGGGG	CpG 8954
12	TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCCG	CpG 2395 ou 10101
13	AAAAAAGGTACCTAAATAGTATGTTTCTGAAA	non-CpG ISS
14	GRFKRFRKKFKKLFKKLSPVIPLLHLG	BMAP27
15	GGLRSLGRKILRAWKKYGPIIVPIIRIG	BMAP28
16	RLARIVVIRVAR	Bactenicin 2a (Bac2a)
17	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	human LL-37
18	VQLRIRVAVIRA	HH2
19	VQRWLIVWRIRK	1002
20	VRLIVAVRIWRR	1018
21	IWVIWRR	HH18
22	Ile-Dhb-Ala-Ile-Dha-Leu-Ala-Abu-Pro-Gly-Ala-Lys-Abu- Gly-Ala-Leu-Met-Gly-Ala-Asn-Met-Lys-Abu-Ala-Abu-AlaAsn-A la-Ser-Ile-Asn-Val-Dha-Lys	Nisin Z
23	V**R*IRV*VIR, * = qualquer amino acido	Motivo conservado
24	ILKWKWPWWPWRR	HH111
25	ILPWKKPWWPWRR	HH113
26	ILKWKWPWWKWRR	HH970
27	ILRWKWRWWRWRR	HH1010

I. Definições

[0048] Ao descrever a presente invenção, os seguintes termos serão empregados, e pretendem ser definidos como indicado abaixo.

[0049] Deve-se notar que, como usadas nesta especificação e nas reivindicações anexas, as formas singulares “um, uma” e “o, a” incluem os referentes no plural, salvo claramente especificado em contrário. Assim, por exemplo, a referência a “um oligonucleotídeo CpG” inclui uma mistura de dois ou mais CpGs, e assim por diante.

[0050] “Peptídeo de defesa do hospedeiro” ou “HDP” significa qualquer um dos vários peptídeos de defesa do hospedeiro que tem a capacidade de aumentar uma resposta imune a um antígeno co-administrado. O DNA e as várias seqüências de aminoácidos correspondentes para vários peptídeos de defesa do hospedeiro são conhecidos e descritos detalhadamente abaixo. Peptídeos de defesa do hospedeiro para uso nos presentes métodos incluem as proteínas de comprimento total (i.e., uma seqüência prepro se presente, toda a molécula prepro) ou proteínas de comprimento substancialmente total, bem como fragmentos biologicamente ativos, fusões ou mutantes das proteínas. O termo também inclui modificações de post-expressão do polipeptídeo, por exemplo, glicosilação, acetilação, fosforilação, e assim por diante. Além disso, para os propósitos da presente invenção, um “peptídeo de defesa do hospedeiro” se refere a uma proteína que inclui modificações, como supressões, adições e substituições (geralmente conservadoras em natureza), para a seqüência nativa, contanto que a proteína mantenha a atividade desejada. Essas modificações podem ser deliberadas, como através de mutagênese sítio-direcionada, ou pode ser acidental, como através de mutações de hospedeiros que produzem as proteínas ou erros devido à amplificação do PCR. É claramente aparente que os peptídeos de defesa do hospedeiro podem dessa forma compreender uma seqüência líder inteira, a seqüência madura, fragmentos, seqüências truncadas e parciais, bem como formas análogas, muteínas e precursoras da molécula. O termo também significa supressões, adições e substituições da seqüência de referência, contanto que a molécula mantenha a atividade biológica desejada.

[0051] “Oligonucleotídeo CpG” ou ODN CpG” significa um ácido nucléico imunoestimulatório contendo pelo menos uma seqüência de dinucleotídeo

citosina-guanina (i.e., um ‘5 citidina seguido por ‘3 guanosina e unido por uma ligação de fosfato) e que ativa o sistema imune. Um “oligonucleotídeo CpG não-metilado” é uma molécula de ácido nucléico que contém uma seqüência de dinucleotídeo citosina-guanina Nnão-metilada (i.e., um ‘5 citidina não-metilado seguido por ‘3 guanosina e unido por uma ligação de fosfato) e que ativa o sistema imune. Um “oligonucleotídeo CpG metilado” é um ácido nucléico que contém uma seqüência de dinucleotídeo citosina-guanina metilada (i.e., 5’ citidina metilada seguida por 3’ guanosina e unida por uma ligação de fosfato) e que ativa o sistema imune. Oligonucleotídeos CpG são bastante conhecidos e descritos, ex., em U.S Pat. Nos. 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116; e 6.339.068; Publicação PCT No. WO 01/22990; Publicação PCT No. WO 03/015711; Publicação US No. 20030139364.

[0052] “Poli(I:C) oligonucleotídeo” ou “poli(I:C)” significa um ácido ribonucléico imunoestimulatório de cadeia dupla tipo-viral sintético contendo cadeias de ácido poliriboinosínico e ácido poliribocitidílico que são mantidos juntos por ligações de hidrogênio entre bases de purina e pirimidina nas cadeias. Descobriu-se que poli I:C tem um forte efeito interferon-indução *in vitro* e é assim de significativo interesse para a pesquisa das doenças infecciosas.

[0053] “Polifosfazeno” é um polímero solúvel em água, de alto peso molecular, contendo uma espinha dorsal de átomos de fósforo e nitrogênio alternantes e grupos laterais orgânicos ligados a cada átomo de fósforo. Ver, ex., Payne et al., *Vaccine* (1998) 16: 92-98; Payne et al., *Adv. Drug. Deliv. Ver.* (1998) 31: 185-196. Uma quantidade de polifosfazenos é de amplo conhecimento e está descrita mais detalhadamente abaixo.

[0054] “Antígeno” ou “imunógeno” significa uma molécula que contém um ou mais epitopos (definidos abaixo) que irão estimular um sistema imune do hospedeiro para provocar uma resposta imune antígeno-específica celular quando o antígeno é apresentado, ou uma resposta de anticorpo humoral. Os termos denotam tanto agentes de subunidade, i.e., proteínas que são separadas e distintas de um organismo todo com o qual o antígeno é associado por natureza, como também bactérias, vírus, parasitas ou outros micróbios mortos, atenuados ou inativos. Anticorpos como os anticorpos anti-idiotípicos, ou seus fragmentos, e mimotopes de peptídeos sintéticos, que podem imitar um antígeno ou determinante antigênico, também estão incluídos

sob a definição de antígeno como é usada aqui. Similarmente, um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo que expressa uma proteína terapêutica ou imunogênica, ou determinante antigênico *in vivo*, como nas aplicações de terapia genética e imunização de ácido nucléico, também estão incluídos na definição de antígeno aqui. Também, para os propósitos da presente invenção, os antígenos podem ser derivados de qualquer um dos vários vírus, bactérias, parasitas ou fungos conhecidos, bem como qualquer um dos vários antígenos tumorais.

[0055] O termo “derivado de” é usado para identificar a fonte original de uma molécula (ex., bovina ou humana) mas não pretende limitar o método através do qual a molécula é feita, que pode ser, por exemplo, por meio de síntese química ou recombinante.

[0056] Os termos “análogo” e “muteína” se referem a derivativos biologicamente ativos da molécula de referência, que mantém a atividade desejada como descrito aqui. Em geral, o termo “análogo” se refere a compostos com uma seqüência e estrutura de polipeptídeo nativa com uma ou mais adições de aminoácidos, substituições (geralmente conservadoras por natureza) e/ou supressões, relativas à molécula nativa, contanto que as modificações não destruam a atividade e que sejam “substancialmente homólogas” à molécula de referência como definido abaixo. O termo “muteína” se refere a peptídeos com um ou mais imitadores de peptídeos (“peptóides”), que são aqueles descritos na International Publication No. WO 91/04282. Preferivelmente, o análogo ou muteína tem pelo menos a mesma atividade desejada que a molécula nativa. Métodos para produzir análogos e muteínas de polipeptídeos são bem conhecidos e estão descritos mais abaixo.

[0057] Os termos também abrangem mutações propositais que são feitas à molécula de referência. Análogos particularmente preferíveis incluem substituições que são conservadoras por natureza, i.e., aquelas substituições que acontecem dentro de uma família de aminoácidos que são relacionadas em suas cadeias laterais. Especificamente, aminoácidos são geralmente divididos em quatro famílias: (1) acidífera – aspartato e glutamato; (2) básica – lisina, arginina, histidina; (3) não-polar – alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano; e (4) polar não-carregada – glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Fenilalanina,

triptofano e tirosina são algumas vezes classificados como aminoácidos aromáticos. Por exemplo, é razoavelmente previsível que uma substituição isolada de lecina por isoleucina ou valina, um aspartato por um glutamato, uma treonina por uma serina, ou uma substituição conservadora similar de um aminoácido por um aminoácido estruturalmente relacionado, não terá um grande efeito na atividade biológica. Por exemplo, a molécula de interesse pode incluir até cerca de 5-10 substituições de aminoácidos conservadoras ou não-conservadoras, ou mesmo até cerca de 15-20 substituições de aminoácidos conservadoras ou não-conservadoras, ou qualquer número entre 5-20, contanto que a função desejada da molécula permaneça intacta. Um especialista na matéria pode facilmente determinar regiões da molécula de interesse que podem tolerar mudanças com referência aos diagramas de Hopp/Woods e Kyte-Doolittle, já bastante conhecidos.

[0058] “Fragmento” significa uma molécula consistindo de apenas uma parte da seqüência e estrutura do polipeptídeo de comprimento total intacto. O fragmento pode incluir uma supressão C-terminal, uma supressão N-terminal, e/ou uma supressão interna do polipeptídeo nativo. Um fragmento incluirá geralmente pelo menos cerca de 5-10 resíduos de aminoácidos contíguos da molécula de comprimento total, preferivelmente pelo menos cerca de 15-25 resíduos de aminoácidos contíguos da molécula de comprimento total, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 20-50 ou mais resíduos de aminoácidos contíguos da molécula de comprimento total, ou qualquer número entre 5 aminoácidos e a seqüência completa, contanto que o fragmento em questão mantenha a capacidade de produzir a resposta biológica desejada.

[0059] “Fragmento imunogênico” significa um fragmento de uma molécula matriz que inclui um ou mais epitopos e assim pode modular uma resposta imune ou pode agir como um adjuvante para um antígeno co-administrado e/ou é capaz de induzir uma resposta imune adaptativa. Tais fragmentos podem ser identificados usando qualquer número de técnicas de mapeamento de epitopos, bastante conhecidas. Ver, ex., *Epitope Mapping Protocols* em Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Por exemplo, epitopos lineares podem ser determinados por, ex., grande número de peptídeos simultaneamente sintetizados em suportes sólidos, os peptídeos

correspondendo a porções da molécula de proteína, e reagindo com anticorpos enquanto os peptídeos ainda estão ligados aos suportes. Tais técnicas são conhecidas e estão descritas em, ex., U.S Patent No. 4.708.871; Geysen et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3998-4002; Geysen et al. (1986) *Molec. Immunol.* 23: 709-715.

[0060] Similarmente, epitopos conformacionais são facilmente identificados através da determinação da sua conformação espacial de aminoácidos como por, ex., cristalografia por raio-X e ressonância magnética nuclear bi-dimensional. Ver, ex., *Epitope Mapping Protocols, supra*. Regiões antigênicas de proteínas também podem ser identificadas usando diagramas padrão de antigenicidade e hidropatia, como aquelas calculadas usando, por ex., o programa de software 1.0 versão Omiga do Oxford Molecular Group. Esse programa de computador emprega o método Hopp/Woods, Hopp et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1981) 78: 3824-3828 para determinar perfis de antigenicidade, e a técnica Kyte-Doolitle, Kyte et al., *J. Mol. Biol.* (1982) 157: 105-132 para diagramas de hidropatia.

[0061] Fragmentos imunogênicos, para os propósitos da presente invenção, serão geralmente de pelo menos 2 aminoácidos de comprimento, mais preferivelmente cerca de 5 aminoácidos de comprimento, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 10 a 15 aminoácidos de comprimento. Não existe limite crítico superior para o comprimento do fragmento, que pode compreender praticamente o comprimento total da seqüência da proteína, ou mesmo uma proteína de fusão compreendendo dois ou mais epitopos da proteína em questão.

[0062] O termo epitopo se refere ao local em um antígeno ou hapteno ao qual as células B específicas e células T respondem. O termo também é usado de modo intercambiável com “determinante antigênico” ou “local determinante antigênico”. Anticorpos que reconhecem o mesmo epitopo podem ser identificados em um simples imunoteste mostrando a capacidade de um anticorpo de bloquear a ligação de outro anticorpo a um antígeno alvo.

[0063] Uma “resposta imunológica” a uma composição é o desenvolvimento no hospedeiro de uma resposta imune celular e/ou anticorpo-mediada à composição ou vacina de interesse. Usualmente, uma “resposta imunológica” inclui, mas não está limitada a um ou mais dos seguintes efeitos:

a produção de anticorpos, células B, células T auxiliares, células T supressoras, e/ou células T citotóxicas e/ou células T γδ, direcionadas especificamente a um antígeno ou antígenos incluídos na composição ou vacina de interesse. Preferivelmente, o hospedeiro apresentará uma resposta imunológica protetora ao microorganismo em questão, ex., o hospedeiro protegerá de uma subseqüente infecção pelo patógeno e essa proteção será demonstrada ou por uma redução ou falta dos sintomas normalmente apresentados por um hospedeiro infectado ou por um tempo mais rápido de recuperação.

[0064] O termo molécula “imunogênica” se refere a uma molécula que provoca uma resposta imunológica como descrito acima. Uma proteína ou polipeptídeo “imunogênico”, como usado aqui, inclui a seqüência completa da proteína em questão, incluindo as formas precursora e madura, seus análogos, ou seus fragmentos imunogênicos.

[0065] Uma composição adjuvante compreendendo um peptídeo de defesa do hospedeiro, um polifosfazeno e uma seqüência imunoestimulatória “aumenta” ou “reforça” a resposta imune, ou apresenta imunogenicidade “aumentada” ou “reforçada” vis-a-vis um antígeno selecionado quando ele possui uma maior capacidade de provocar uma resposta imune do que a resposta imune provocada por uma quantidade equivalente do antígeno quando distribuído sem a composição adjuvante. Essa imunogenicidade aumentada pode ser determinada através da administração do antígeno e composição adjuvante, e controles de antígenos a animais e comparando títulos de anticorpos contra testes padrão usados como radioimunotestes e ELISAs, bastante conhecidos.

[0066] “Substancialmente purificado” geralmente se refere ao isolamento de uma substância (composto, polinucleotídeo, proteína, polipeptídeo, composição de polipeptídeo) de modo que a substância compreenda a maior parte do percentual da amostra na qual ela reside. Tipicamente em uma amostra, um componente substancialmente purificado compreende 50%, preferivelmente 80%-85%, mais preferivelmente 90%-95% da amostra. Técnicas para purificar polinucleotídeos e polipeptídeos de interesse são bastante conhecidas e incluem, por exemplo, cromatografia por troca de íon, cromatografia por afinidade, cromatografia por quelação de metal,

cromatografia de fase reversa, cromatografia por interação hidrofóbica, sedimentação de acordo com a densidade.

[0067] “Isolada” significa que a molécula indicada é separada e distinta do organismo todo com o qual a molécula é encontrada na natureza ou está presente na ausência substancial de outras macro-moléculas biológicas do mesmo tipo. O termo “isolado” com relação a um polinucleotídeo é uma molécula de ácido nucléico desprovida, no todo ou em parte, de seqüências normalmente associadas a ela por natureza, mas tendo seqüências heterólogas em associação com ela; ou uma molécula desassociada de um cromossomo.

[0068] “Homologia” se refere ao percentual de identidade entre dois polinucleotídeos ou duas metades de polipeptídeos. Dois ácidos nucléicos ou duas seqüências de polipeptídeos são “substancialmente homólogas” umas às outras quando as seqüências exibem pelo menos cerca de 50%, preferivelmente pelo menos cerca de 75%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 80%-85%, preferivelmente pelo menos cerca de 90%, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 95%-98% de identidade seqüencial por um comprimento definido de moléculas. Como é usado aqui, substancialmente homólogo também se refere a seqüências mostrando completa identidade com a seqüência especificada.

[0069] Em geral, “identidade” se refere a uma correspondência exata nucleotídeo-a-nucleotídeo ou aminoácido-a-aminoácido de duas seqüências de polinucleotídeos ou polipeptídeos, respectivamente. O percentual de identidade pode ser determinado por uma comparação direta da informação de seqüência entre duas moléculas (a seqüência de referência e uma seqüência com percentual de identidade desconhecido com a seqüência de referência) alinhando as seqüências, contando o número exato de semelhantes entre as duas seqüências alinhadas, dividindo pelo comprimento da seqüência de referência, e multiplicando o resultado por 100. Programas de computador facilmente disponíveis podem ser usados para auxiliar na análise, tais como ALIGN, Dayhoff, M.O. em *Atlas of Protein Sequence and Structure* M.O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta o algoritmo de homologia local de Smith e Waterman *Advances in Appl. Math.* 2: 482-489, 1981 para análise de

peptídeos. Programas para determinar a identidade da seqüência de nucleotídeos estão disponíveis no Wisconsin Sequence Analysis Package, Versão 8 (disponível em Genetics Computer Group, Madison, WI) por exemplo, os programas BESTFIT, FASTA e GAP, que também se baseiam no algoritmo de Smith e Waterman. Esses programas são facilmente utilizados com os parâmetros padrão recomendados pelo fabricante e descritos no Wisconsin Sequence Analysis Package mencionado acima. Por exemplo, o percentual de identidade de uma determinada seqüência de nucleotídeo com uma seqüência de referência pode ser determinado usando o algoritmo de homologia de Smith e Waterman com uma tabela padrão de pontuação e uma sanção de lacuna de seis posições de nucleotídeos.

[0070] Outro método para estabelecer o percentual de identidade no contexto da presente invenção é usando o pacote de programas MPSRCH registrado pela University of Edinburgh, desenvolvido por John F. Collins e Shane S. Sturrok, e distribuído por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). A partir desse conjunto de pacotes o algoritmo Smith-Waterman pode ser empregado onde os parâmetros padrão são usados para tabela de pontuação (por exemplo, sanção de lacuna aberta de 12, sanção de extensão de lacuna de um, e uma lacuna de seis). A partir dos dados gerados o valor de “Semelhança” reflete a “identidade de seqüência”. Outros programas adequados para calcular a identidade percentual ou similaridade entre seqüências são geralmente conhecidos, por exemplo, outro programa de alinhamento é o BLAST, usados com parâmetros padrão. Por exemplo, BLASTN e BLASTP podem ser usados com os seguintes parâmetros padrão: código genético = padrão; filtro = nenhum; cadeia = ambas; corte = 60; expectativa = 10; Matriz = BLOSUM62; descrições = 50 sequências; classificado por = HIGH SCORE; Bancos de dados = não redundante, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS traduções + proteína suíça + spupdate + PIR. Detalhes desses programas estão facilmente disponíveis.

[0071] Alternativamente, a homologia pode ser determinada por hibridização de polinucleotídeos sob condições que formam duplos estáveis entre regiões homólogas, seguido pela digestão com nuclease(s) específica de cadeia-única, e determinação do tamanho dos fragmentos digeridos. Seqüências de DNA que são substancialmente homólogas podem ser

identificadas em um experimento de hibridização sulista sob, por exemplo, condições rigorosas, como definido para esse sistema em particular. A definição das condições adequadas de hibridização está dentro do âmbito dos conhecimentos acerca do assunto. Ver, ex., Sambrook et al., *supra; DNA Cloning, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra.*

[0072] “Recombinante” como é usado aqui para descrever uma molécula de ácido nucléico significa um polinucleotídeo de origem genômica, cDNA, viral, semi-sintética ou sintética que, em virtude de sua origem ou manipulação não está associada com o todo ou uma porção do polinucleotídeo com o qual é associada por natureza. O termo “recombinante” como usado em relação a uma proteína ou polipeptídeo significa um polipeptídeo produzido por expressão de um polinucleotídeo recombinante. Em geral, o gene de interesse é clonado e então expressado em organismos transformados, como descrito mais abaixo. O organismo hospedeiro expressa o gene estranho para produzir a proteína sob condições de expressão.

[0073] Os termos “quantidade eficaz” ou “quantidade farmaceuticamente eficaz” de uma composição, ou um componente da composição, se refere a uma quantidade não-tóxica mas suficiente da composição ou componente para proporcionar a resposta desejada, como a imunogenicidade aumentada, e, opcionalmente, um efeito terapêutico correspondente. A quantidade exata requerida irá variar de indivíduo para indivíduo, dependendo da espécie, idade, e condição geral do indivíduo, a severidade do problema sendo tratado, e os componentes de interesse em particular, modo de administração, e assim por diante. Uma quantidade “eficaz” apropriada em qualquer caso individual pode ser determinada por qualquer especialista usando experimentação rotineira.

[0074] “Indivíduo vertebrado” significa qualquer membro da subphylum chordata, incluindo, sem limitação, humanos e outros primatas, incluindo primatas não-humanos como chimpanzés e outras espécies de macacos; animais de fazenda como gado ovelhas, porcos, cabras e cavalos; mamíferos domésticos como cães e gatos; animais de laboratório incluindo roedores como camundongos, ratos e porquinhos da índia; aves, incluindo aves domésticas, selvagens e de caça como galinhas, perus e outras aves galináceas, patos, gansos, e assim por diante. O termo não denota uma idade determinada. Assim, tanto indivíduos adultos quanto recém nascidos estão incluídos. A

invenção descrita aqui pretende ser usada em qualquer das espécies vertebradas acima, já que os sistemas imune de todos esses vertebrados operam similarmente.

[0075] O termo “tratamento” como é usado aqui se refere a (1) a prevenção da infecção ou re-infecção (profilaxia), ou (2) a redução ou eliminação dos sintomas da doença de interesse (terapia).

II. Modos de Realizar a Invenção

[0076] Antes de descrever a presente invenção em detalhes, deve-se compreender que essa invenção não está limitada a formulações em particular ou parâmetros de processo que podem, naturalmente, variar. Também deve-se compreender que a terminologia aqui usada tem o objetivo de descrever representações particulares da invenção apenas, e não pretende ser limitadora.

[0077] Embora uma quantidade de métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser utilizados na prática da presente invenção, os materiais e métodos preferidos estão descritos aqui.

[0078] A presente invenção é baseada na descoberta de que composições incluindo uma seqüência imunoestimulatória, como oligonucleotídeos CpG ou não-CpG, ou poli(I:C), um polímero polianiônico como um polifosfazeno e um peptídeo de defesa do hospedeiro aumentam as respostas imune a um antígeno co-administrado e conferem proteção contra infecções em modelos de desafio animal confiáveis.

[0079] Assim, os adjuvantes de combinação da presente invenção são úteis para a prevenção e tratamento de doenças infecciosas causadas por uma variedade de microorganismos infecciosos incluindo doenças causadas por bactérias, fungos, parasitas e vírus em humanos e outros animais.

[0080] As composições adjuvantes da invenção podem ser introduzidas em um indivíduo usando qualquer uma das várias técnicas de distribuição, descritas mais detalhadamente abaixo. As composições adjuvantes podem ser usadas com um ou múltiplos antígenos ou imunógenos incluindo polipeptídeos, polinucleotídeos, polissacarídeos, ou antígenos ou imunógenos de lipídios, bem como com patógenos inativados ou atenuados, para produzir uma resposta imune no indivíduo ao qual as composições são distribuídas. A resposta imune pode servir para proteger contra futuras infecções, ou pode ser

usada para a produção de anticorpos, tanto policlonais quanto monoclonais, para uso em diagnósticos, reagentes de imunopurificação e assim por diante.

[0081] De modo a promover uma compreensão da invenção, uma discussão mais detalhada é fornecida abaixo com relação a peptídeos de defesa do hospedeiro, seqüências imunoestimulatórias, polímeros polianiônicos e imunógenos para uso nas suas composições e métodos.

Peptídeos de Defesa do Hospedeiro

[0082] Como explicado abaixo, os métodos e composições da presente invenção incluem peptídeos de defesa do hospedeiro. Mais de 400 dessas proteínas anti-microbianas foram identificadas em plantas, insetos e animais. Ver, ex., Boman, H.G., *Annu. Rev. Immunol.* (1995) 13: 61-92; Boman, H.G., *Scand. J. Immunol.* (1998) 48: 15-25; Boroekaert et al., *Plant. Physiol.* (1995) 108: 1353-1358; Steiner et al., *Nature* (1981) 292: 246-248; Ganz et al., *Curr. Opin. Immunol.* (1994) 4: 584-589; Lehrer et al., *Curr. Opin. Immunol.* (1999) 11: 23-27. As duas principais famílias de peptídeos de defesa do hospedeiro de mamíferos são as defensinas e catelicidinas. Ver, ex., Ganz et al., *Curr. Opin. Immunol.* (1994) 4: 584-589; Lehrer et al., *Curr. Opin. Immunol.* (1999) 11: 23-27; Ouellette et al., *FASEB J.* (1996) 10: 1280-1289; Zanetti et al., *FEBS Lett.* (1995) 374: 1-5.

[0083] As defensinas de mamíferos são uma família de proteínas catiônicas que contem seis resíduos de cisteína altamente conservados que formam três pares de ligações intracadeia-dissulfeto. Defensinas de mamíferos são classificadas em três sub-famílias, α-, β-, e θ-defensinas, com base nos padrões das suas pontes intracadeia-dissulfeto, (Ganz et. al., *Curr. Opin. Immunol.* (1994) 4: 584-589; Lehrer et al., *Curr. Opin. Immunol.* (1999) 11: 23-27; Tang et al., *Science* (1999) 286: 498-502). A sub-família da θ-defensina inclui uma molécula cíclica com seus resíduos de cisteína ligando C1 a C6, C2 a C5, e C3 a C4 (Tang et al., *Science* (1999) 286: 498-502). As três ligações de dissulfeto de α-defensinas são casadas C1 a C6, C2 a C4, e C3 a C5 (Ganz et. al., *Curr. Opin. Immunol.* (1994) 4: 584-589; Ouellette et al., *FASEB J.* (1996) 10: 1280-1289; Zhang et al., *Biochemistry* (1992) 31: 11348-11356). As ligações de dissulfeto das β-defensinas são C1 a C5, C2 a C4, e C3 a C6 (Ganz et. al., *Curr. Opin. Immunol.* (1994) 4: 584-589; Tang et al., *J. Biol. Chem.* (1993) 268: 6649-6653).

[0084] Mais de 50 membros da família das defensinas foram identificados em espécies mamíferas. Em humanos, pelo menos seis α-defensinas e três β-defensinas foram identificadas (Ganz et. al., *Curr. Opin. Immunol.* (1994) 4: 584-589; Lehrer et al., *Curr. Opin. Immunol.* (1999) 11: 23-27; Ouellette et al., *FASEB J.* (1996) 10: 1280-1289; Ganz et al., *J. Clin. Invest.* (1985) 76: 1427-1435; Wilde et al., *J. Biol. Chem.* (1989) 264: 11200-11203; Mallow et al., *J. Biol. Chem.* (1996) 271: 4038-4045; Bensch et al., *FEBS Lett.* (1995) 368: 331-335; Larrick et al., *Infect. Immun.* (1995) 63: 1291-1297). Exemplos não-limitadores de defensinas humanas incluem α-defensinas humanas 1, 2, 3 e 4, também chamadas de peptídeos de neutrófilos humanos (HNP) 1, 2, 3, e 4; α-defensinas humanas 5 e 6 (HD5 e 6); e β-defensinas humanas (HDB) 1, 2 e 3.

[0085] Catelicidinas são uma família de proteínas anti-microbianas com um peptídeo de sinal N-terminal putativo, um domínio de catelina altamente conservada (catepsina L inibidor)-tipo no meio, e um domínio anti-microbiano, C-terminal, menos conservado (Lehrer et al., *Curr. Opin. Immunol.* (1999) 11: 23-27; Zanetti et al., *FEBS Lett.* (1995) 374: 1-5). Cerca de 20 membros das catelicidinas foram identificados em mamíferos, com pelo menos uma catelicidina de humanos (Zanetti et al., *FEBS Lett.* (1995) 374: 1-5; Larrick et al., *Infect. Immun.* (1995) 63: 1291-1297; Cowland et al., *FEBS Lett.* (1995) 368: 173-176; Agerberth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92: 195-199). A divisão da catelicidina humana (hCAP18) libera seu domínio anti-microbiano, C-terminal, um peptídeo chamado LL-37, com dois resíduos de leucina N-terminal. LL-37 é 37 resíduos de aminoácidos em comprimento (Zanetti et al., *FEBS Lett.* (1995) 374: 1-5; Gudmundsson et al., *Eur. J. Biochem.* (1996) 238: 325-332).

[0086] Outro grupo de peptídeos de defesa do hospedeiro contém uma alta percentagem de aminoácidos específicos, tais como os peptídeos bovinos prolina-/arginina-ricos, Bac2a, Bac5 e Bac7 (Gennaro et al., *Infect. Immun.* (1989) 57: 3142-3146) e o peptídeo suíno PR-39 (Agerberth et al., *Eur. J. Biochem.* (1991) 202: 849-854); e indolicidina que é um peptídeo de defesa do hospedeiro de 13-aminoácidos com a seqüência ILPWKWPWWPWRR (SEQ ID NO: 1).

[0087] Outros peptídeos de defesa do hospedeiro representativos são apresentados na Tabela 1 e nos exemplos, como os peptídeos 1002, 1018 e HH2, bem como os peptídeos JK1 (VFLRRIRVIVIR; SEQ ID NO: 2); JK2 (VFWRRIRVWVIR; SEQ ID NO: 3); JK3 (VQLRAIRVRVIR; SEQ ID NO: 4); JK4 (VQLRRIRVWVIR; SEQ ID NO: 5; JK5 (VQWRAIRVRVIR; SEQ ID NO: 6); E JK6 (VQWRRIRVWVIR; SEQ ID NO: 7).

[0088] Qualquer um dos peptídeos acima, bem como mos seus fragmentos e análogos, que apresentam a atividade biológica apropriada, como a capacidade de modular uma resposta imune, tal como aumentar uma resposta imune a um antígeno co-distribuído, encontrará uso nos presentes métodos.

[0089] Os peptídeos de defesa do hospedeiro para uso aqui podem incluir uma seqüência prepro, uma pró-proteína sem a pré-seqüência, ou a proteína madura sem a seqüência prepro. Se uma seqüência de sinal está presente, as moléculas podem incluir, por exemplo, a seqüência de sinal nativo, juntamente com uma pró seqüência ou a seqüência madura. Alternativamente, um peptídeo de defesa do hospedeiro para uso aqui pode incluir uma pró seqüência ou seqüência madura com uma seqüência de sinal heteróloga. Alternativamente, o peptídeo de defesa do hospedeiro para uso aqui pode incluir apenas a seqüência da proteína madura, contanto que a molécula mantenha a atividade biológica. Além disso, os peptídeos de defesa do hospedeiro para uso aqui podem ser moléculas biologicamente ativas que apresentem homologia substancial à molécula matriz, como definido acima.

[0090] Assim, os peptídeos de defesa do hospedeiro para uso com a presente invenção podem incluir, por exemplo, a molécula matriz inteira, ou seus fragmentos biologicamente ativos, tais como os fragmentos incluindo seqüências de aminoácidos contíguas compreendendo pelo menos cerca de 5-10 até cerca de 50 do comprimento total da molécula em questão, ou qualquer número entre eles. A molécula incluirá tipicamente um ou mais epitopos. Esses epitopos são facilmente identificáveis usando técnicas bastante conhecidas, tais como usando diagramas padrão de antigenicidade e hidropatia, por exemplo aqueles calculados usando, ex., o programa de software Omiga versão 1.0 disponível no Oxford Molecular Group. Esse programa de computador emprega o método Hopp/Woods, Hopp et al., *Proc. Natl Acad. Sci*

USA (1981) 78: 3824-3828 para determinar perfis de antigenicidade, e a técnica Kyte-Doolitle, Kyte et al., *J. Mol. Biol.* (1982) 157: 105-132 para diagramas de hidropatia. Esse programa pode ser usado com os seguintes parâmetros: determinar a média dos resultados em uma janela de 7; determinar a probabilidade de superfície de acordo com Emini; flexibilidade de cadeia de acordo com Karplus-Schulz; índice de antigenicidade de acordo com Jameson-Wolf; estrutura secundária de acordo com Garnier-Osguthorpe-Robson; estrutura secundária de acordo com Chou-Fasman; e identificar os locais de glicosilação previstos. Qualquer especialista pode usar facilmente a informação obtida em combinação com os ensinamentos da presente especificação para identificar regiões antigênicas que devem ser incluídas nas moléculas para uso com a presente invenção.

[0091] Atividade aumentada de adjuvante apresentada por um peptídeo de defesa do hospedeiro pode ser elucidada determinando-se se a composição de interesse quando co-distribuída com o imunógeno de interesse, possui uma maior capacidade de provocar uma resposta imune do que a resposta imune provocada por uma quantidade equivalente da composição distribuída sem o peptídeo de defesa do hospedeiro co-administrado. Essa imunogenicidade aumentada pode ser determinada pela administração da composição de interesse com e sem a co-administração do peptídeo de defesa do hospedeiro, e comparando títulos de anticorpos ou resposta imune celular produzida usando testes padrão como radioimunoteste, ELISAs, testes de linfoproliferação, e assim por diante, bastante conhecidos.

[0092] Os peptídeos de defesa do hospedeiro para uso com a presente invenção podem ser obtidos usando técnicas padrão. Por exemplo, como os peptídeos de defesa do hospedeiro são tipicamente pequenos, eles podem ser convenientemente sintetizados quimicamente, por qualquer uma das várias técnicas conhecidas na ciência dos peptídeos. Em geral, esses métodos empregam a adição seqüencial de um ou mais aminoácidos a uma cadeia de peptídeos crescente. Normalmente, o grupo amino ou carboxila do primeiro aminoácido é protegido por um grupo protetor apropriado. O aminoácido protegido ou derivatizado pode então ser ou ligado a um suporte sólido inerte ou utilizado em solução adicionando o próximo aminoácido na seqüência tendo o grupo complementar (amino ou carboxila) adequadamente protegido, sob

condições que permitam a formação de uma ligação de amido. O grupo protetor é então removido do resíduo do aminoácido recém adicionado e o aminoácido seguinte (adequadamente protegido) é então adicionado, e assim por diante. Após os aminoácidos desejados terem sido ligados à seqüência apropriada, quaisquer grupos protetores remanescentes (e qualquer suporte sólido, se técnicas de síntese de fase sólida forem utilizadas) são removidos sequencialmente ou simultaneamente, para produzir o polipeptídeo final. Pela simples modificação desse procedimento geral, é possível adicionar mais de um aminoácido de uma vez a uma cadeia crescente, por exemplo, unindo (sob condições que não racemize centros quirais) um tripeptídeo protegido com um dipeptídeo adequadamente protegido para formar, após a desproteção, um pentapeptídeo. Ver, ex., J.M. Stewart e J.D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Co., Rockford, IL 1984) e G. Barany e R.B. Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, editors E. Gross e J. Meienhofer, Vol. 2, (Academic Press, New York, 1980), pp. 3-254, para técnicas de síntese de peptídeos de fase sólida; e M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, (Springer-Verlag, Berlim 1984) e E. Gross e J. Meienhofer, Eds., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol 1, para síntese de solução clássica.

[0093] Típicos grupos protetores incluem t-butiloxicarbonil (Boc), 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) benziloxicarbonil (Cbz); p-toluenosulfonil (Tx); 2,4-dinitrofenil; benzil (Bzl); bifenilisopropiloxicarboxila-carbonil, t-amiloxicarbonil, isoborniloxicarbonil, o-bromobenziloxicarbonil, ciclohexil, isopropil, acetil, o-nitrofenilsulfonil e assim por diante. Típicos suportes sólidos são suportes poliméricos cruzados. Esses podem incluir polímeros baseados em estireno-cruzado divinilbenzeno, por exemplo, copolímeros de divinilbenzeno-hidroximetilestireno, copolímeros de divinilbenzeno-clorometilestireno e copolímeros de divinilbenzeno-benzidrilaminopoliestireno.

[0094] Os peptídeos de defesa do hospedeiro da presente invenção também podem ser quimicamente preparados por outros métodos como o método de síntese de peptídeo múltipla simultânea. Ver, ex., Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82: 5131-5135; Patente US No. 4.631.211.

[0095] Alternativamente, os peptídeos de defesa do hospedeiro podem ser produzidos por técnicas recombinantes. Ver, ex., Zhang et al., *FEBS Lett.*

(1998) 424: 37-40; Zhang et al., *J. Biol. Chem.* (1999) 274: 24031-24037; Shi et al., *Infect. Immun.* (1999) 67: 3121-3127. Os peptídeos de defesa do hospedeiro podem ser produzidos recombinantemente, ex., obtendo uma molécula de DNA de uma biblioteca ou vetor de cDNA incluindo a mesma, ou de tecido hospedeiro usando extração por fenol. Alternativamente, a codificação do peptídeo de defesa do hospedeiro desejado pode ser sintetizada, juntamente com um códon de iniciação ATG. A seqüência de nucleotídeo pode ser projetada com os códons apropriados para aquela seqüência de aminoácidos desejada. Em geral, seleciona-se códons preferidos para o hospedeiro pretendido no qual a seqüência é expressada. A seqüência completa é geralmente montada com oligonucleotídeos sobrepostos preparados por métodos padrão e montada em uma seqüência codificadora completa. Ver, ex., Edge, *Nature* (1981) 292: 756; Nambair et al., *Science* (1984) 223: 1299; Jay et al., *J. Biol. Chem.* (1984) 259: 6311. Técnicas sintéticas automatizadas como a síntese de fase sólida de fosforamida, podem ser usadas para gerar a seqüência de nucleotídeos. Ver, ex., Beaucage, S.L. et al., *Tet. Lett.* (1981) 22: 1859-1862; Matteucci, M.D. et al., *J. Am. Chem. Soc.* (1981) 103: 3185-3191. Em seguida o DNA é clonado em um vetor apropriado, seja procariótico ou eucariótico, usando métodos convencionais. Numerosos vetores de clonagem são conhecidos dos especialistas, e a seleção de um vetor de clonagem apropriado é uma questão de escolha. Vetores adequados incluem, mas não estão limitados a, plasmídeos, fagos, transposons, cosmídeos, cromossomos ou vírus que são capazes de replicação quando associados aos elementos de controle adequados. A seqüência codificadora é então colocada sob o controle de elementos de controle adequados, dependendo do sistema a ser usado para a expressão. Assim, a seqüência codificadora pode ser colocada sob o controle de um promotor, local de ligação de ribossoma (para expressão bacteriana) e, opcionalmente, um operador, de modo que a seqüência de DNA de interesse seja transcrita em RNA por um transformante apropriado. A seqüência codificadora pode ou não conter um peptídeo de sinal ou seqüência líder que pode posteriormente ser removida pelo hospedeiro em processamento pós-translacional. Ver, ex., U.S. Patent Nos. 4.431.739; 4.425.437; 4.338.397. Se presente, a seqüência de sinal pode ser o líder nativo encontrado em associação com o peptídeo de interesse.

[0096] Em adição às seqüências de controle, pode ser desejável acrescentar seqüências reguladoras que permitem a regulação da expressão das seqüências relativas ao crescimento da célula hospedeira. Seqüências reguladoras são conhecidas dos especialistas e exemplos incluem aquelas que causam a expressão de um gene a ser ligado ou desligado em resposta a um estímulo químico ou físico, incluindo a presença de um composto regulador. Outros tipos de elementos reguladores também podem estar presentes no vetor. Por exemplo, elementos de intensificação podem ser usados aqui para aumentar os níveis de expressão das construções. Exemplos incluem o intensificador de gene precoce SV40 (Dijkema et al. (1985) *EMBO J.* 4: 761), o intensificador/promotor derivado da longa repetição de terminal (LTR) do Rous Sarcoma Vírus (Gorman et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6777) e elementos derivados de CMV humano (Boshart et al. (1985) *Cell* 41: 521), tais como elementos incluídos na seqüência A intron CMV (U.S. Patent No. 5.688.688). O cassete de expressão pode ainda incluir uma origem de replicação para replicação autônoma em uma célula hospedeira apropriada, um ou mais marcadores selecionáveis, um ou mais locais de restrição, um potencial para alto número de cópia e um forte promotor.

[0097] Um vetor de expressão é construído de modo à seqüência codificadora em particular ser localizada no vetor com as seqüências reguladoras apropriadas, o posicionamento e orientação da seqüência codificadora em relação às seqüências de controle sendo tal que a seqüência codificadora seja transcrita sob o “controle” das seqüências de controle (i.e., RNA polimerase que liga à molécula de DNA nas seqüências de controle transcreve a seqüência codificadora). A modificação das seqüências codificando a molécula de interesse pode ser desejável pra alcançar esse fim. Por exemplo, em alguns casos pode ser necessário modificar a seqüência de modo que ela possa ser unida ás seqüências de controle na orientação apropriada; i.e., para manter a estrutura de leitura. As seqüências de controle e outras seqüências reguladoras podem estar ligadas à seqüência codificadora antes da inserção em um vetor. Alternativamente, a seqüência codificadora pode ser clonada diretamente em um vetor de expressão que já contem as seqüências de controle e um local de restrição apropriado.

[0098] Como explicado acima, também pode ser desejável produzir mutantes ou análogos dos peptídeos de interesse. Mutantes ou análogos dos peptídeos de defesa do hospedeiro para uso nas composições do objeto podem ser preparados através da supressão de uma parte da seqüência codificando a molécula de interesse, pela inserção de uma seqüência, e/ou pela substituição de um ou mais nucleotídeos dentro da seqüência. Técnicas para modificar as seqüências de nucleotídeos, como a mutagênese sítio-direcionada, e assim por diante, são bastante conhecidas. Ver, ex., Sambrook et al., supra; Kunkel, T.A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82: 448; Geisselsoder et al. (1987) *BioTechniques* 5: 786; Zoller e Smith (1983) *Methods Enzymol.* 100: 468; Dalbie-McFarland et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6409.

[0099] As moléculas podem ser expressadas em uma ampla variedade de sistemas, incluindo sistemas de expressão de insetos, mamíferos, bacterianos virais e levedura, todos bastante conhecidos. Por exemplo, sistemas de expressão de células de insetos, tais como sistemas de baculovirus, são conhecidos dos especialistas e descritos em, ex., Summers e Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555* (1987). Materiais e métodos para sistemas de expressão de células de baculovirus/inseto estão comercialmente disponíveis em forma de kit de, entre outros, Invitrogen, San Diego CA (kit “MaxBac”). Similarmente, sistemas de expressão de células mamíferas e bacterianas são bastante conhecidas e descritas em, ex., Sambrook et al., supra. Sistemas de expressão de levedura também são conhecidos e descritos em, ex., *Yeast Genetic Engeneering* (Barr et al., eds. 1989) Butterworths, London.

[0100] Uma quantidade de células hospedeiras apropriadas para uso com os sistemas acima também são conhecidas. Por exemplo, linhas de células de mamíferos são conhecidas e incluem linhas de células imortalizadas disponíveis em American Type Culture Collection (ATCC), tais como, mas não limitado a, células de ovários de hamsters chineses, (CHO), células HeLa, células de rins de bebês hamster (BHK), células de rins de macacos (COS), células renais embriônicas humanas, células de carcinoma hepatocelular humanas (ex., Hep G2), células renais bovinas de Madin-Darby (“MDBK”), bem como outras. Similarmente, hospedeiros bacterianos como *E. coli, Bacillus*

subtilis, e *Streptococcus spp*, encontrarão uso nas presentes construções de expressão. Células de levedura úteis na presente invenção incluem entre outras, *Saccharomyces cerevisiae, Cândida albicans, cândida maltosa, Hansenula polymorpha, Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces lactis, Pichia guillerimondii, Pichia pastoris, Schizosaccharomyces pombe* e *Yarrowia lipolytica*. Células de insetos para uso com vetores de expressão de baculovirus incluem, entre outras, *Aedes aegypti, Autographa californica, Bombyx mori, Drosophila melanogaster, Spodoptera frugiperda*, e *Trichoplusia ni*.

[0101] Moléculas de ácido nucléico compreendendo seqüências de nucleotídeos de interesse podem ser estavelmente integradas em um genoma de célula hospedeira ou mantidas em um elemento episomal estável em uma célula hospedeira apropriada usando várias técnicas de distribuição de gene bastante conhecidas. Ver por exemplo, Patente US No. 5.399.346.

[0102] Dependendo do sistema de expressão e hospedeiro selecionado, as moléculas são produzidas através do crescimento de células hospedeiras transformadas por um vetor de expressão descrito acima sob condições pelas quais a proteína é expressada. A proteína expressada é então isolada das células hospedeiras e purificada. Se o sistema de expressão secreta a proteína em meio de crescimento, o produto pode ser purificado diretamente do meio. Se não for secretada, pode ser isolada dos lisados celulares. A seleção das condições de crescimento apropriadas e métodos de recuperação estão dentro da especialidade.

[0103] Os peptídeos de defesa do hospedeiro, sejam produzidos recombinantemente ou sinteticamente, são formulados em composições e usados em métodos como detalhado aqui. Quantidades típicas de peptídeos de defesa do hospedeiro a serem administradas nas composições adjuvantes são de cerca de 0,01 a cerca de 8000 µg/kg, tipicamente de cerca de 0,05 a cerca de 500 µg/kg, como de 1 a 100 µg/kg, ou 5 a 50 µg/kg, ou qualquer número entre esses valores.

Seqüências Imunoestimulatórias

[0104] O DNA bacteriano é conhecido por estimular respostas imune em mamíferos. Ver, ex., Krieg et al., *Nature* (1995) 374: 546-549. Essa capacidade imunoestimulatória foi atribuída à alta freqüência das moléculas de ácido

nucléico imunoestimulatórias (ISSs), como os dinucleotídeos CpG não-metilados presentes no DNA bacteriano. Oligonucleotídeos contendo motivos CpG não-metilados mostraram induzir a ativação de B células, NK células e células apresentando antígenos (APCs), tais como monócitos e macrófagos. Ver por exemplo, Patente US No. 6.207.646.

[0105] A presente invenção faz uso de adjuvantes que incluem componentes derivados de ISSs. ISS inclui um oligonucleotídeo que pode ser parte de uma maior construção de nucleotídeo como DNA plasmídeo ou bacteriano. O oligonucleotídeo pode ser linearmente ou circularmente configurado, ou pode conter segmentos lineares e circulares. O oligonucleotídeo pode incluir modificações como, mas não limitado a, modificações do grupo 3'OH ou 5'OH, modificações da base do nucleotídeo, modificações do componente de açúcar, e modificações do grupo de fosfato. O ISS pode compreender ribonucleotídeos (contendo ribose como o único ou principal componente de açúcar), ou deoxiribonucleotídeos (contendo deoxiribose como o principal componente de açúcar). Açúcares modificados ou análogos de açúcar também podem ser incorporados ao oligonucleotídeo. Exemplos de metades de açucares que podem ser usadas incluem ribose, deoxiribose, pentose, deoxipentose, hexose, deoxihexose, glucose, arabinose, xilose, lixose, e um grupo ciclopentil análogo do açúcar. O açúcar pode ser em piranosil ou em uma forma furanosil. Um derivado do fósforo (ou grupo de fosfato modificado) pode ser usado e pode ser um monofosfato, difosfato, trifosfato, alkilfosfato, alkanefosfato, fosforotioatos, fosforoditioatos, e assim por diante. Bases de ácido nucléico que são incorporadas á base do oligonucleotídeo do ISS podem ser bases de purina e pirimidina ocorrendo naturalmente, ou seja, uracil ou timina, citosina, inosina, adenina e guanina, bem como modificações sintéticas dessas bases ocorrendo naturalmente. Além disso, um grande número de nucleosídeos não-naturais compreendendo várias bases heterocíclicas e várias metades de açucares (e análogos de açúcar) estão disponíveis e são bastante conhecidos.

[0106] Estruturalmente, a raiz de oligonucleotídeo do ISS é uma seqüência de nucleotídeo contendo-CG, que pode ser palindrômica. A citosina pode ser metilada ou não metilada. Exemplos de moléculas de ISS em

particular para uso na presente invenção incluem moléculas CpG, CpY e CpR, e assim por diante, já conhecidas.

[0107] Moléculas preferíveis são aquelas derivadas da família CpG de moléculas, dinucleotídeos CpG e oligonucleotídeos sintéticos que compreendem motivos CpG (ver, ex., Krieg et al., *Nature* (1995) 374: 546 e Davis et al., *J. Immunol.* (1998) 160: 870-876), assim como qualquer dos vários oligonucleotídeos CpG imunoestimulatórios divulgados nas Patentes US Nos. 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116; 6.339.068, Publicacação US No. 20030139364; Publicação PCT No. WO 01/22990; Publicação PCT No.; e WO 03/015711. Esses oligonucleotídeos CpG geralmente compreendem pelo menos de 8 até 100 nucleotídeos, preferivelmente 8 a 40 nucleotídeos, mais preferivelmente 15-35 nucleotídeos, preferivelmente 15-25 nucleotídeos, e qualquer número de nucleotídeos entre esses valores. Por exemplo, oligonucleotídeos compreendendo o consenso motivo CpG, representado pela fórmula 5'X_1CGX_2-3', onde X_1 e X_2 são nucleotídeos e C é não-metilado, encontrarão uso como moléculas CpG imunoestimulatórias. Geralmente, X1 é A, G ou T, e X_2 é C ou T. Outras moléculas CpG úteis incluem aquelas capturadas pela fórmula 5'-X_1X_2CGX_3X_4, onde X_1 e X_2 são uma seqüência como GpT, GpG, GpA, ApA, ApT, ApG, CpT, CpA, CpG, TpA, TpT ou TpG, e X_3 e X_4 sãoTpT, CpT, ApT, ApG, CpG, TpC, ApC, CpC, TpA, ApA, GpT, CpA, ou TpG, onde "p" significa uma ligação de fosfato. Preferivelmente, os oligonucleotídeos não incluem uma seqüência GCG em ou perto do terminus 5'- e/ou 3'. Adicionalmente, o CpG é preferivelmente ladeado na sua terminação 5' com duas purinas (preferivelmente um dinucleotídeo GpA) ou com uma purina e uma pirimidina (preferivelmente, GpT), e ladeado na sua terminação 3' com duas pirimidinas, preferivelmente um dinucleotídeo TpT ou TpC. Assim, as moléculas preferidas compreenderão a seqüência GACGTT, GACGTC, GTCGTT ou GTCGCT, e essas seqüências serão ladeadas por vários nucleotídeos adicionais, assim como 1-20 ou mais nucleotídeos, preferivelmente 2 a 10 nucleotídeos e mais preferivelmente, 3 a 5 nucleotídeos, ou qualquer número entre esses limites determinados. Os nucleotídeos fora da área do núcleo central parecem ser extremamente retificáveis para mudar.

[0108] Além disso, os oligonucleotídeos ISS para uso aqui podem ser de dupla-fita ou de única-fita. As moléculas de dupla-fita são mais estáveis *in vivo* enquanto que as moléculas de única-fita apresentam atividade imune aumentada. Adicionalmente, a espinha dorsal de fosfato pode ser modificada, assim como fosforoditioato-modificada, de modo a aumentar a aumentar a atividade imunoestimulatória da molécula ISS. Como está descrito na Patente US No. 6.207.646, as moléculas CpG com espinhas dorsais de fosforotioato preferencialmente ativam B-células, enquanto que aquelas com espinhas dorsais de fosfodiéster preferencialmente ativam células monocíticas (macrófagos, células dendríticas e monócitos) e células NK.

[0109] Diferentes classes de ácidos nucléicos CpG foram descritas. Uma classe é potente para ativar B células mas é relativamente fraca em induzir a ativação de células IFN-α e NK. Essa classe foi chamada de classe B. Os ácidos nucléicos CpG da classe B são totalmente estabilizados e incluem um dinucleotídeo CpG não-metilado dentro de certos contextos de base preferidos. Ver, por exemplo, Patentes US Nos. 6.194.388; 6.207.646; 6.218.371; 6.239.116; e 6.339.068. Outra classe é potente para induzir a ativação de células IFN-α e NK mas é relativamente fraca para estimular B células; essa classe foi chamada de classe A. Os ácidos nucléicos CpG da classe A tipicamente tem seqüências poli-G estabilizadas nas terminações 5’ e 3’ e uma seqüência contendo dinucleotídeo CpG de fosfodiéster palindrômico de pelo menos 6 nucleotídeos. Ver, por exemplo, Publicação PCT No. WO 01/22990. Outra classe ainda de ácidos nucléicos CpG ativa B células e células NK e induz IFN-α; essa classe foi chamada de classe-C. Os ácidos nucléicos CpG da classe-C tipicamente são totalmente estabilizados, incluem uma seqüência tipo-classe B e um palíndromo ou quase palíndromo GC-rico. Essa classe foi descrita na Publicação PCT No. WO 03/015711.

[0110] Moléculas de ISS podem facilmente ser testadas em relação à sua capacidade de estimular uma resposta imune usando técnicas padrão, bastante conhecidas. Por exemplo, a capacidade da molécula de estimular uma resposta imune humoral e/ou celular é facilmente determinada usando os imunotestes descritos aqui. Além disso, as composições adjuvantes e antígenos podem ser administrados com ou sem o ISS para determinar se uma resposta imune é aumentada.

[0111] Exemplos não-limitadores de oligonucleotídeos para uso nas presentes composições incluem 5'TCCATGACGTTCCTGACGTT3' (SEQ ID NO:8), chamado CpG ODN 1826, um CpG classe B; 5'TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT3' (SEQ ID NO:9), chamado de CpG ODN 2007, um CpG classe B; 5'TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT3' (SEQ ID NO:10, chamado de CPG 7909 ou 10103, um CpG classe B; 5'GGGGACGACGTCGTGGGGGGG3' (SEQ ID NO:11), chamado de CpG 8954, um CpG classe A; e 5'TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCCG3' (SEQ ID NO:12), também chamado de CpG 2395 ou CpG 10101, um CpG classe C. Todas as moléculas classe B e C anteriores são totalmente fosforotioatadas. Oligonucleotídeos não-CpG para uso na presente composição incluem o ácido poliriboinosinico:ácido poliribocitidílico de dupla fita, também chamado poli(I:C); e um oligonucleotídeo não-CpG 5'AAAAAAGGTACCTAAATAGTATGTTTCTGAAAA3' (SEQ ID NO:13).

[0112] Como foi explicado acima, o ISS pode ser administrado ou anteriormente, ou simultaneamente, ou subsequentemente à distribuição do antígeno, o peptídeo de defesa do hospedeiro e o polifosfazeno. Se administrado antes da imunização com o antígeno e/ou os outros componentes adjuvantes, o ISS pode ser administrado até 5-10 dias antes da imunização, preferivelmente 3-5 dias antes da imunização e mais preferivelmente 1-3 ou 2 dias antes da imunização. Se administrado separadamente, o ISS pode ser distribuído ou para o mesmo sítio de distribuição do antígeno e/ou composições adjuvantes ou para um sítio de distribuição diferente. Se for desejada a distribuição simultânea, o ISS pode ser incluído com o antígeno e/ou composições adjuvantes.

[0113] Geralmente cerca de 0,01 a cerca de 1000 µg/kg, tipicamente de cerca de 0,05 a cerca de 500 µg/kg, como de 1 a 100 µg/kg, ou 5 a 50 µg/kg, ou qualquer quantidade entre esses limites, do ISS por dose, encontrará uso com os presentes métodos.

Polímeros Polianiônicos

[0114] Um polímero polianiônico da presente invenção é um polímero que, quando presente na composição adjuvante é negativamente-carregado devido à presença de unidades de repetição constitucionais aniônicas (por exemplo, unidades contendo sulfato, Y sulfonato, carboxilalato, fosfato e

grupos borato). Uma unidade de repetição constitucional ou I monômero se refere à unidade estrutural mínima de um polímero. O polímero polianiônico pode ser um heteropolímero polianiônico, compreendendo duas ou mais unidades diferentes de repetição constitucional aniônicas, ou pode ser um homopolímero polianiônico, consistindo de uma única unidade de repetição constitucional aniônica. Nem todo monômero/unidade de repetição precisa ser negativamente carregado.

[0115] O polímero polianiônico para uso nas composições adjuvantes pode ser um polímero químico e pode compreender unidades de repetição constitucionais aniônicas obtidas de um grupo como, mas não limitado a, ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido etilsulfônico, ácido vinil sulfúrico, ácido vinil sulfônico, ácido c estirenosulfoni, ácido I sulfúrico vinilfenil, ácido sulfônico 2-metacriloiloxi, ácido 3-metacriloiloxi-2 hidroxipropanosulfônico, ácido 3-metacril amido-3-metilbutanóico, ácido acrilamidometilpropanosulfônico, ácido vinilfosfórico, ácido 4-vinilbenzóico, ácido 3 vinil oxipropano-I-sulfônico, ácido N-vinilsucinimídico, e sais dos anteriores.

[0116] Alternativamente, o polímero polianiônico da invenção pode ser um oligo-ou-poli-sacarídeo como o dextran.

[0117] Adicionalmente, o polímero polianiônico pode ser um oligopeptídeo ou um polipeptídeo. Esses peptídeos podem ser D- ou L-peptídeos, e podem compreender unidades de repetição constitucionais aniônicas (ou monômeros) tais como ácido L-aspártico, ácido D-aspártico, ácido L-glutâmico, ácido D-glutâmico, ácidos amino aniônicos não-naturais (ou sais ou seus derivados químicos aniônicos).

[0118] Em certas representações, o polímero polianiônico pode ser um polímero polimetil metacrilato, bem como um polímero derivado de poli(lactídeos) e poli(lactídeo-co-glicolídeos), conhecido como PLG. Ver, ex., Jeffery et al., *Pharm. Res.* (1993) 10: 362-368; e McGee et al., *J. Microencap.* (1996).

[0119] Em representações particularmente preferíveis, o polímero polianiônico é um polifosfazeno. Polifosfazenos são polímeros de alto peso molecular e solúveis em água, contendo uma espinha dorsal de átomos de fósforo e nitrogênio alternantes e grupos laterais orgânicos ligados a cada

átomo de fósforo. Ver, ex., Payne et al., *Vaccine* (1998) 16: 92-98; Payne et al., *Adv. Drug. Deliv. Rev.* (1998) 31: 185-196. Polifosfazenos podem formar complexos não-covalentes quando misturados com compostos de interesse, como antígenos e outros adjuvantes, aumentando a sua estabilidade e permitindo a apresentação multimérica. Mais de 700 polifosfazenos são conhecidos propriedades químicas e físicas variáveis. Para um exame, ver Mark et al., em “Inorganic Polymers, 2nd edition”, Oxford University Press, 2005. Tipicamente, polifosfazenos para uso com as presentes composições adjuvantes ou tomarão a forma de um polímero em solução aquosa ou uma micropartícula de polímero, com ou sem substâncias encapsuladas ou absorvidas como antígenos ou outros adjuvantes.

[0120] Por exemplo, o componente de polifosfazeno das composições adjuvantes pode ser um polifosfazeno solúvel, como um polieletrólito de polifosfazeno com grupos pendentes ionizados ou ionizáveis que contem, por exemplo, ácido carboxílico, ácido sulfônico ou metades de hidroxil, e grupos pendentes que são suscetíveis a hidrólise sob condições de uso para transmitir propriedades biodegradáveis ao polímero. Esses polieletrólitos de polifosfazeno são bastante conhecidos e estão descritos em, por exemplo, Patentes US Nos. 5.494.673; 5.562.909; 5.855.895; 6.015.563; e 6.261.573.

[0121] Alternativamente, polímeros de polifosfazeno na forma de micropartículas cruzadas também encontrarão uso nas presentes composições adjuvantes. Essas micropartículas de polímero de polifosfazeno cruzadas são bastante conhecidas e estão descritas em, por exemplo, Patentes US Nos. 5.053.451; 5.149.543; 5.308.701; 5.494.682; 5.529.777; 5.807.757; 5.985.354; e 6.207.171.

[0122] Polímeros de polifosfazeno particularmente preferíveis para uso nos presentes métodos e composições são mostrados na Figura 1 e incluem poli[di(sódio carboxilalatofenoxi)fosfazeno] (PCPP) e poli(di-4-oxifenilproprionato)fosfazeno (PCEP), em várias formas, como o sal de sódio, ou formas acídicas, bem como um polímero composto de várias percentagens de polímeros de PCPP ou PCEP com grupos hidroxil, tais como 90:10 PCPP/OH. Métodos para sintetizar esses compostos são conhecidos e estão descritos nas patentes mencionadas acima, bem como em Adrianov et al., *Biomacromolecules* (2004) 5: 1999; Andrianov et al., *Macromolecules* (2004)

37: 414; Mutwiri et al., *Vaccine* (2007) 25: 1204; e os exemplos aqui (ver Figuras 2-4).

[0123] Assim como os componentes adjuvantes descritos acima, o polifosfazeno pode ser administrado ou anteriormente a, ou simultaneamente a, ou subseqüente à distribuição do antígeno, e outros componentes. Se administrado antes da imunização com o antígeno e/ou os outros componentes adjuvantes, o polifosfazeno pode ser administrado até 5-10 dias antes da imunização, preferivelmente 103 ou 2 dias antes da imunização. Se administrado separadamente, o polifosfazeno pode ser distribuído ou para o mesmo sítio de distribuição do antígeno e/ou composições adjuvantes ou a um diferente sítio de distribuição. Se for desejada a distribuição simultânea, o polifosfazeno pode ser incluído com o antígeno e/ou composições adjuvantes.

[0124] Quantidades típicas de polifosfazeno a serem administradas nas composições adjuvantes são de cerca de 0.01 a cerca de 2500 µg/kg, tipicamente de cerca de 0.05 a cerca de 500 µg/kg, assim como de 0.5 a 100 µg/kg, ou 1 a 50 µg/kg, ou qualquer número entre esses valores.

Imunógenos

[0125] Como foi explicado acima, as composições da invenção são úteis como adjuvantes a serem fornecidos em combinação com imunógenos ou vacinas, de modo a aumentar uma resposta imune, assim como uma resposta imune célula-mediada ou humoral, ao antígeno co-distribuído. Imunógenos para uso com as composições adjuvantes incluem, mas não estão limitados a, imunógenos de origem viral, bacteriana, microbacteriana, fúngica, ou parasitária.

[0126] Por exemplo, as composições adjuvantes da invenção podem ser usadas em combinação com imunógenos para tratar ou prevenir uma grande variedade de infecções causadas por bactérias, incluindo bactérias gram-negativas e gram-positivas.

[0127] Exemplos não limitadores de patógenos bacterianos dos quais os imunógenos podem ser derivados incluem tanto bactérias gram-negativas quanto bactérias gram-positivas. Bactérias gram-positivas incluem, mas não estão limitadas a, Pasteurella species, Staphylococci species, and Streptococcus species. Bactérias gram-negativas incluem, mas não estão limitadas a, Escherichia coli, Pseudomonas species, e Salmonella species.

Exemplos específicos de bactérias infecciosas incluem, mas não estão limitados a: *Helicobacter pylori, Borelia burgdorferi, Legionella pneumophilia, Mycobacteria* sp. (e.x. *M. tuberculosis, M. avium, M. intracellular, M. kansaii, M. gordonae*), *Staphylococcus aureus, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Listeria monocytogenes, Streptococcus pyogenes* (Grupo A Streptococcus), *Streptococcus agalactiae* (Grupo B Streptococcus), *Streptococcus* (grupo *viridans*), *Streptococcusfaecalis, Streptococcus bovis, Streptococcus* (*anaerobic* sp.), *Streptococcus pneumoniae, Campylobacter* spp. patogênico, *Enterococcus* sp., *Haemophilus infuenzae, Bacillus antracis, Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae, Clostridium perfringers, Clostridium tetani, Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Pasturella multocida, Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum, Streptobacillus moniliformis, Treponema pallidium, Treponema pertenue, Leptospira, Rickettsia*, e *Actinomyces israelii*.

[0128] Por exemplo, as composições adjuvantes da presente invenção podem ser usadas com qualquer das várias espécies de *Bordetella* incluindo *B. pertussis, B. parapertussis, B. bronhiseptica*, e outros; várias espécies *Neisserial*, incluindo *N. meningitidis, N. gonorrhoeae*, etc.; vários Enterobacteriaceae tais como mas não limitado a *Salmonella*, como *S. typhimurium, S. enteritidis, Shigella*, como a *S. flexneri, Escherichia*, como a *E. coli 0157.H7, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Proteus, Morganella, Providencia, Yersinia*, como a *Y. enterocolitica, Listeria*, como a *L. monocytogene, Staphylococcus*, como a *S. aureus*; várias espécies de *Pseudomonas*, tais como *P. aeruginosa; Stretococcal* species, tais como *S. suis, S. uberis, S. agalactiae, S. dysgalactiae, S. pneumoniae, S. pyogenes*, e outras; várias espécies de *Actinobacillus*, incluindo mas não limitado a *A. Pleuropneumoniae, A. suis, A. pyogenes,* etc.

[0129] As composições adjuvantes podem ser usadas em combinação com imunógenos para tratar ou prevenir doenças causadas por mau manuseio dos alimentos, bem como doenças causadas por patógenos de origem alimentar, tais como, mas não limitado a Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, Escherichia coli 0157:H7, Yersinia enterocolitica, Shigella flexneri, Listeria monocytogene, e Staphylococcus aureus. Adicionalmente, as composições adjuvantes também são úteis em combinação com imunógenos

contra patógenos que causam infecções hospitalares, tais como, mas não limitado a patógenos que produzem β-lactamases de espectro estendido (ESBL) e assim tem a capacidade de inativar antibióticos β-lactam. Essas enzimas são produzidas por várias bactérias, incluindo *Klebsiella pneumoniae, E. coli* e *Proteus mirabilis.* Adicionalmente, as composições adjuvantes podem ser usadas em combinação com imunógenos para tratar ou prevenir doenças causadas pela biocontaminação da pele por microorganismos patogênicos tais como *Staphylococcus aureus, S. epidermitidis, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter spp., Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, E. coli, Proteus spp.* e fungos como o *Candida albicans.*

[0130] As composições adjuvantes também podem ser usadas em combinação com imunógenos para tratar ou prevenir problemas respiratórios como aquelas causadas por *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae,* e *Pseudomonas aeruginosa,* bem como as doenças sexualmente transmitidas, incluindo mas não limitado a infecções por Chlamydia, como as causadas por *Chlamydia trachomatis* e infecções gonocócicas, como as causadas por *Neisseria gonorrhoeae*.

[0131] Adicionalmente, as composições adjuvantes podem ser usadas com imunógenos para tratar ou prevenir uma quantidade de doenças virais, tais como mas não limitado àquelas doenças causadas por membros das famílias Picornaviridae (e.x., polioviruses, etc.); Caliciviridae; Togaviridae (e.x., vírus da rubéola, vírus da dengue, etc.); Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae; Birnaviridae; Rhabodoviridae (e.x., vírus da raiva, etc.); Filoviridae; Paramyxoviridae (e.g., vírus da caxumba, vírus do sarampo, vírus sincicial respiratório, etc.); Orthomyxoviridae (e.x., vírus da influenza tipos A, B and C, etc.); Bunyaviridae; Arenaviridae; Ver, e.x. *Virology*, 3rd Edition (W.K. Joklik ed. 1988); *Fundamental Virology*, 2nd Edition (B.N. Fields e D.M. Knipe, eds. 1991), para uma descrição dessas e de outros vírus. Outros exemplos em particular de vírus incluem a família de vírus do vírus do herpes, por exemplo o vírus do herpes bovino (BHV) e vírus herpes simplex humano (HSV) tipos 1 e 2, tais como BHV-1, BHV-2, HSV-1 e HSV-2, o vírus da varicella zoster (VZV), o vírus Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV), HHV6 e HHV7; doenças causadas pelos vários vírus da hepatite, tais como HAV, HBV, e HCV; doenças causadas por papiloma vírus e rotavírus, etc.

[0132] Exemplos não limitadores de patógenos virais que afetam vertebrados humanos e/ou não-humanos dos quais os imunógenos podem ser derivados, ou que podem ser fornecidos na forma atenuada ou inativada incluem retrovírus, vírus de RNA e vírus de DNA. O grupo de retrovírus inclui tanto retrovírus simples quanto retrovírus complexo. Os retrovírus simples incluem os subgrupos de retrovírus tipo-B, retrovírus tipo-C e retrovírus tipo-D. Um exemplo de um retrovírus tipo-B é o vírus de tumor mamário em camundongos (MMTV). Os retrovírus tipo-C incluem subgrupos tipo-C grupo A (incluindo o vírus do sarcoma de Rous, o vírus da leucemia aviária (ALV), e o vírus da mieloblastose aviária (AMV) e tipo-C grupo B (incluindo o vírus da leucemia murina (MLV), o vírus da leucemia felina (FeLV), o vírus do sarcoma murino (MSV), o vírus da leucemia do macaco gibbon (GALV), o vírus da necrose do baço (SNV), o vírus da reticuloendoteliose (RV) e o vírus do sarcoma símio (SSV). Os retrovírus tipo-D incluem o vírus de macaco Mason-Pfizer (MPMV) e o retrovírus símio tipo 1 (SRV-1). Os retrovírus complexos incluem os subgrupos de lentivírus, vírus de leucemia de célula-T e vírus espumoso. Os lentivírus incluem HIV-1, HIV-2, SIV, vírus Visna, vírus de imunodeficiência felina (FIV), e vírus de anemia infecciosa eqüina (EIAV). Os vírus de leucemia de célula-T incluem HTLV-1, HTLV-II, o vírus de leucemia de célula-T símio (STLV), e o vírus da leucemia bovina (BLV). Os vírus espumosos incluem o vírus espumoso humano (HFV), o vírus espumoso símio (SFV) e o vírus espumoso bovino (BFV).

[0133] Exemplos de outros vírus de RNA dos quais os imunógenos podem ser derivados incluem, mas não estão limitados aos seguintes: membros da família Reoviridae, incluindo o gênero Orthoreovirus (múltiplos serótipos de retrovírus mamífero e aviário), o gênero Orbivirus (vírus Bluetongue, vírus Eugenangee, vírus Kemerovo, vírus da doença do cavalo africano, e vírus da Febre do Carrapato do Colorado), o gênero Rotavirus (rotavírus humano, vírus da diarréia do bezerro do Nebraska, rotavírus murino, rotavírus símio, rotavírus bovino ou ovino, rotavírus aviário); a família Picornaviridae, incluindo o gênero Enterovirus (poliovírus, vírus Coxsackie A e B, vírus órfãos humanos citopáticos entéricos (ECHO), vírus da hepatite A, enterovírus símios, vírus da encefalomielite murina (ME), poliovírus muris, enterovírus bovino, enterovírus suíno, o gênero Cardiovirus (vírus da

encefalomiocardite (EMC), mengovírus), o gênero Rhinovirus (rinovírus humano incluindo pelo menos 113 subtipos; outros rinovírus), o gênero Apthovirus (febre aftosa (FMDV); a família Calciviridae, incluindo exantema vesicular do vírus suíno, vírus do leão marinho de São Miguel, picornavirus felino e vírus Norwalk; a família Togaviridae, incluindo o gênero Alphavirus (vírus da encefalite eqüina oriental, vírus da floresta Semliki, vírus Sindbis, vírus Chikungunya, vírus O'Nyong-Nyong, vírus do rio Ross, vírus da encefalite eqüina venezuelana, vírus da encefalite eqüina ocidental), o gênero Flavivirus (vírus da febre amarela transmitida por mosquitos, vírus da dengue, vírus da encefalite japonesa, vírus da encefalite de St. Louis, vírus da encefalite de Murray Valley, vírus do Nilo ocidental, vírus Kunjin, vírus transmitido por carrapato da Europa central, vírus transmitido por carrapato do extremo oriente, vírus da floresta de Kyasanur, vírus Louping III, vírus Powassan, vírus da febre hemorrágica de Omsk), o gênero Rubivirus (vírus da rubéola), o gênero Pestivirus (vírus da doença da mucosa BVDV, vírus do cólera Hog, vírus da doença de Border); a família Bunyaviridae, incluindo o gênero Bunyvirus (Bunyamwera e vírus relacionados, vírus do grupo da encefalite da Califórnia), o gênero Phlebovirus (vírus siciliano da febre Sandfly, vírus da febre de Rift Valley), o gênero Nairovirus (vírus da febre hemorrágica de Crimean-Congo, vírus da doença de ovelhas de Nairóbi), e o gênero Uukurirus (Uukuniemi e vírus relacionados); a família Orthomyxoviridae, incluindo o gênero do vírus da Influenza (vírus da Influenza tipo A, vários subtipos humanos); vírus da influenza suína, e vírus da influenza aviária e eqüina ; influenza tipo B (vários subtipos humanos), e influenza tipo C (possível gênero separado); a família paramyxoviridae, incluíndo o gênero Paramyxovirus (vírus da Parainfluenza tipo 1, vírus Sendai, vírus Hemadsorção, vírus da Parainfluenza tipos 2 a 5, vírus da doença de Newcastle, vírus da caxumba), o gênero Morbillivirus (vírus do sarampo, vírus da panencefalite esclerosante subaguda, vírus da cinomose, vírus Rinderpest), o gênero Pneumovirus (vírus respiratório sincicial (RSV), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) e vírus da pneumonia em camundongos); vírus da floresta, vírus Sindbis, vírus Chikungunya, vírus O'Nyong-Nyong, vírus do rio Ross, vírus da encefalite eqüina venezuelana, vírus da encefalite eqüina ocidental), o gênero Flavirius (vírus da febre amarela transmitido pelo mosquito, vírus da dengue, vírus da encefalite japonesa, vírus

da encefalite de St. Louis, vírus da encefalite de Murray Valley, vírus do Nilo ocidental, vírus Kunjin, vírus transmitido por carrapato da Europa central, vírus transmitido por carrapato do extremo oriente, vírus da floresta de Kyasanur, vírus Louping III, vírus Powassan, vírus da febre hemorrágica de Omsk), o gênero Rubivirus (vírus da rubéola), o gênero Pestivirus (vírus da doença mucosal, vírus do cólera Hog, vírus da doença da fronteira); a família Bunyaviridae, incluindo Bunyvirus (vírus Bunyamwera e vírus relacionados, vírus do grupo de encefalite da Califórnia), o gênero Phlebovirus (vírus siciliano da febre de Sandfly, vírus da febre de Rift Valley), o gênero Nairovirus (vírus da febre hemorrágica de Criméia-Congo, vírus da doença das ovelhas de Nairobi), e o gênero Uukuvirus (vírus Uukuniemi e vírus relacionados); a família Orthomyxoviridae, incluindo o gênero do vírus da Influenza (vírus da influenza tipo A, muitos subtipos humanos); vírus da influenza, e vírus da influenza aviária eqüina; vírus da influenza tipo B (muitos subtipos humanos), e influenza tipo C (possível gênero separado); a família paramyxoviridae, incluindo o gênero Paramyxovirus (vírus da Parainfluenza tipo 1, vírus Sendai, vírus de hemadsorção, vírus da Parainfluenza tipos 2 a 5, vírus da doença de Newcastle, vírus da caxumba), o gênero Morbillivirus (vírus do sarampo, vírus da pancefalite esclerosante subaguda, vírus da cinomose, vírus de Rinderpest), o gênero Pneumovirus (vírus respiratório sincicial (RSV), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) e vírus da pneumonia em camundongos); a família Rhabdoviridae, incluindo o gênero Vesiculovirus (VSV), vírus Chandipura, vírus de Flanders-Hart Park), o gênero Lyssavirus (vírus da raiva), Rhabdoviruses do peixe, e dois prováveis Rhabdoviruses (vírus Marburg e vírus Ebola); a família Arenaviridae, incluindo vírus da coriomeningite linfócita (LCM), complexo do vírus Tacaribe, e vírus Lassa; a família Coronoaviridae, incluindo o vírus SARS, vírus da bronquite infecciosa (IBV), vírus da hepatite em camundongos, coronavirus entérico humano, e peritonite infecciona felina (coronavirus felino).

[0134] Vírus de DNA ilustrativos dos quais os imunógenos podem ser derivados incluem, mas não estão limitados a: a família Poxviridae, incluindo o gênero Orthopoxvirus (varíola maior, varíola menor, monkeypox, Vaccinia, varíola bovina, buffalopox, rabbitpox, Ectromelia), o gênero Leporipoxvirus (Mixoma, Fibroma), o gênero Avipoxvirus (varíola aviária, e outros poxvirus aviários), o gênero Capripoxvirus (varíola de ovinos, varíola de caprinos), o

gênero Suipoxvirus (swinepox), o gênero Parapoxvirus (vírus da dermatite postular contagiosa, pseudocowpox, vírus da estomatite papular bovina); a família Iridoviridae (vírus da febre suína africana, vírus das rãs 2 e 3, vírus Lymphocystis em peixes); a família Herpesviridae, incluindo o alpha-Herpesviruses (Herpes Simples vírus Tipos 1 e 2, Varicella-Zoster, vírus de aborto eqüino, vírus de herpes eqüino 2 e 3, vírus da pseudo-raiva, vírus da ceratoconjuntivite infecciosa bovina , vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina, vírus da rinotraqueíte felina, vírus da laringotraqueíte infecciosa) os Beta-herpesvirus (citomegalovirus humano e citomegalovirus de suínos, macacos e roedores); os gamma-herpesvirus (vírus Epstein-Barr (EBV), vírus da doença de Marek, Herpes saimiri, Herpesvirus ateles, Herpesvirus sylvilagus, herpes vírus do porquinho da índia, vírus do tumor de Lucke); a família Adenoviridae, incluindo o gênero Mastadenovirus (subgrupos humanos A,B,C,D,E e não-agrupados; adenovirus de símios (pelo menos 23 serótipos), hepatite canina infecciosa, e adenovirus de gado, porcos, ovelhas, rãs e muitas outras espécies, o gênero Aviadenovirus (adenovirus aviários); e adenovirus não-cultiváveis; a família Papoviridae, incluindo o gênero Papillomavirus (papilomavírus humano, papilomavírus bovino, papilomavírus de coelho Shope, e vários papilomavírus patogênicos de outras espécies), o gênero Polyomavirus (polyomavirus, agente vacuolating de símio (SV-40), agente vacuolating de coelho (RKV), vírus K, vírus BK, vírus JC, e outros vírus polyoma de primatas tais como vírus Lymphotrophic papilloma); a família Parvoviridae incluindo o gênero de vírus Adeno-associados, o gênero Parvovirus (vírus da panleucopenia felina, parvovírus bovino, parvovírus canino, vírus da doença aleutiana do vison, etc). Finalmente, os vírus de DNA podem incluir vírus que não se encaixam nas famílias acima tais como vírus das doenças de Kuru e Creutzfeldt- Jacob e agentes neuropáticos infecciosos crônicos (vírus CHINA).

[0135] Similarmente, as composições adjuvantes da invenção encontrarão uso contra uma variedade de parasitas, tais como mas não limitados a *Plasmodium*, tais como *P. malariae, P. yoelii, P. falciparum, P. ovale, e P. vivax, Toxoplasma gondii, Schistosoma japonicum, Leishmania major, Trypanosoma cruzi*, e assim por diante.

[0136] Adicionalmente, as composições adjuvantes encontram uso para aumentar uma resposta imune, contra um número de patógenos fúngicos, tais como mas não limitado àqueles fungos que causam *Candidiasis, Cryptococcosis, Asperigillosis, Zygomycosis, Blastomycosis, Coccidioidomycosis, Histoplasmosis, Paracoccidiodomycosis, Sporotrichosis*. Exemplos particulares não-limitadores de fungos infecciosos dos quais os imunógenos podem ser derivados incluem: *Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatitidis, Chlamydia trachomatis, Candida albicans*.

[0138] Outros microorganismos medicalmente relevantes foram extensivamente descritos na literatura. Ver, ex., C.G.A. Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Great Britain 1983.

[0139] Além do tratamento de doenças humanas infecciosas, os métodos da invenção são úteis para tratar infecções de animais. Por exemplo, aves, gado, cavalos e outros animais de fazenda são suscetíveis a infecções. As doenças que afetam esses animais podem produzir severas perdas econômicas. Assim, as composições e métodos da invenção podem ser usados para proteger contra infecções em animais de criação, como vacas, cavalos, porcos, ovelhas, e cabras. Por exemplo, as composições e métodos podem ser usados para proteger contra febre de transporte, vírus da diarréia viral bovina (BVDV), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) vírus de cólera do porco (HOCV), vírus da doença fronteiriça da ovelha (BDV), herpesvirus eqüino (EHV), e visna-maedi. Os gatos, tanto os domésticos quanto os selvagens, também são suscetíveis a infecções com uma variedade de microorganismos. Assim, a invenção também é útil para proteger animais de estimação contra, por exemplo, peritonite infecciosa felina (FIP), vírus da leucemia felina (FeLV), vírus do sarcoma felino (FeSV), oncornavírus endógeno tipo C (RD-114), vírus de formação cincicial felino (FeSFV), e lentivírus T-linfotrópico felino (também chamado de imunodeficiência felina).

[0140] Como é mostrado nos exemplos, o uso de antígenos de vírus sincicial respiratório, como o BRSV, em combinação com as composições adjuvantes da invenção, proporciona imunidade a um subseqüente desafio do BRSV. Antígenos úteis nesse aspecto incluem antígenos RSV, tais como a proteína de fusão (F), a proteína de ligação (G), e/ou a proteína matriz (M).

Essas proteínas são bastante conhecidas e podem ser obtidas na descrição da U.S Patent No. 7.169.395. Assim, as vacinas RSV contendo uma, duas, ou todas essas proteínas encontrarão uso aqui.

[0141] Fica evidente que adjuvantes encontrarão uso para a distribuição de uma ampla variedade de imunógenos para organismos humanos ou não-humanos para prevenir ou tratar uma grande variedade de doenças.

[0142] Esses imunógenos podem ser fornecidos como composições de vacinas atenuadas, inativadas ou de sub-unidade. Adicionalmente, os imunógenos podem ser fornecidos em construções de ácido nucléico para imunização de DNA. Técnicas para preparar imunógenos de DNA são bastante conhecidas e estão descritas em, exemplo, Patentes US Nos. 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466.

[0143] As composições adjuvantes da invenção são úteis em combinação com vacinas, de modo a aumentar uma resposta imune, como uma resposta imune célula-mediada ou humoral, ao antígeno co-distribuído. Por exemplo, as composições adjuvantes podem ser co-administradas com vacinas animais e humanas comercialmente disponíveis, incluindo mas não limitado a vacinas pertussis e vacinas de combinação, tais como as várias vacinas de células inteiras (wP) e acelulares (aP). Exemplos não-limitadores de tais vacinas incluem as vacinas conhecidas como TRIPEDIA, TRIPACEL, QUADRACEL, TETRAVAL, TETRACT-Hib, PENTACT-Hib, PENTACEL, PENTAVAC, e HEXAVAC (Aventis, Bridgewater, NJ); INFANRIX e PEDIARIX (GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC); CERTIVA (North American Vaccine, Beltsville, MD); BIOTHRAX; TICE BCG; MYCOBAX; HiBTITER; PEDVAXHIB; ACTHIB; COMVAX; HAVRIX; VAQTA; TWINRIX; RECOMBIVAX HB; ENGERIX-B; FLUMIST; FLUVIDRIN; FLUZONE; JE-VAX; ATTENUVAX; M-M-VAX; M-M-R II; MENUMONE-A/CΛ7W-135; MUMPSVAX; PNEUMOVAX 23; PREVNAR; POLIOVAX; IPOL; IMOVAX; RABAVERT; MERUVAX II; DRYVAX; TYPHIM Vi; VIVOTIF; VARIVAX; YF-VAX.

[0144] Os imunógenos podem ser administrados anteriormente a, simultaneamente com, ou subsequentemente aos vários componentes das composições adjuvantes. Se administrados simultaneamente, os imunógenos podem ser administrados na mesma ou em uma diferente composição. Se

fornecidos em uma composição diferente, os imunógenos podem ser administrados no mesmo ou em um diferente local de administração.

[0145] Os imunógenos para uso com a presente invenção podem ser preparados usando técnicas padrão, bastante conhecidas. Por exemplo, os imunógenos podem ser isolados diretamente do organismo de interesse, ou pode ser produzido recombinantemente ou sinteticamente, usando técnicas descritas acima.

Formulações e Administração

[0146] Os componentes adjuvantes acima podem ser formulados em composições, sejam sozinhos ou em combinação com antígenos, como descrito acima, para distribuição a pacientes para aumentar uma resposta imune ao antígeno ou combinação de antígenos co-administrados. Cada um dos componentes, ou seja, o ISS, o polifosfazeno e o peptídeo de defesa do hospedeiro pode ser formulado junto em uma única composição, ou pode ser administrado separadamente em uma composição individual. Dessa forma, por exemplo, o peptídeo de defesa do hospedeiro pode ser combinado em uma única composição com o ISS e/ou o polifosfazeno. Da mesma forma, o polifosfazeno pode ser administrado separadamente ou combinado com um ou com ambos o peptídeo de defesa do hospedeiro e/ou o ISS. O imunógeno pode estar presente em qualquer uma dessas combinações ou pode ser administrado separadamente. Métodos para preparar essas formulações são descritos em, ex., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 18ª Edição, 1990.

[0147] As composições da presente invenção podem ser preparadas como injetáveis, seja em soluções líquidas ou suspensões. Formas sólidas para solução ou suspensão em veículos líquidos anteriormente à injeção também podem ser preparadas. A preparação também pode ser emulsificada ou o ingrediente ativo encapsulado em veículos de lipossomas. O ingrediente imunogênico ativo é geralmente misturado com um veículo farmacêutico compatível, tais como, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol, e assim por diante, e suas combinações. Além disso, se desejado, o veículo pode conter quantidades menores de substâncias auxiliares como agentes umedecedores ou emulsificadores e agentes tamponadores de pH.

[0148] Adjuvantes adicionais que aumentam a eficácia da composição também podem ser acrescentados à formulação. Adjuvantes podem incluir por exemplo, dipeptídeos muramyl, avridine, hidróxido de alumínio, brometo de amônio dimetildioctadecil (DDA), óleos, emulsões óleo-em-água, saponinas, citocinas, e outras substâncias conhecidas.

[0149] Os componentes individuais das composições também podem ser ligados a um transportador de modo a aumentar a sua imunogenicidade. Transportadores apropriados incluem grandes e lentamente metabolizadas macromoléculas como proteínas, incluindo albuminas séricas, keyhole limpet hemocianina, moléculas de hemoglobina, tiroglobulina, ovalbumina, e outras proteínas bastante conhecidas; polissacarídeos, tais como sefarose, agarose, celulose, grânulos de celulose e assim por diante; aminoácidos poliméricos como ácido poliglutâmico, polilisina, e outros; copolímeros de aminoácidos; e partículas de vírus inativos.

[0150] Os vários componentes das composições podem ser usados na sua forma nativa ou o conteúdo do seu grupo funcional pode ser modificado, por exemplo, por succinilação de resíduos de lisina ou reação com Cys-thiolactone. Um grupo sulfidrila também pode ser incorporado, por exemplo, por reação de funções amino com 2-iminothiolane ou o N-hydroxysuccinimide ester of 3-(4-dithiopyridyl propionate. Transportadores apropriados também podem ser modificados para incorporar braços espaçadores (tais como hexametileno diamina ou outras moléculas bifuncionais de tamanho similar) para ligação de peptídeos. Outros transportadores apropriados incluem polipeptídeos de rotavirus VP6, ou seus fragmentos funcionais, como divulgado na Patente US No. 5.071.651. Igualmente útil é um produto de fusão de uma proteína viral e os imunógenos do objeto feitos através de métodos divulgados na Patente US No. 4.722.840. Ainda outros transportadores apropriados incluem células, como as células dendríticas ou linfócitos, já que a apresentação nessa forma imita o modo natural de apresentação no indivíduo, o que faz surgir o estado imunizado. Métodos para formar pares de peptídeos com proteínas ou células são bastante conhecidos pelos especialistas no assunto.

[0151] Além disso, os vários componentes (ou seus complexos) podem ser formulados em composições tanto em sua forma neutra quanto em forma de sal. Sais farmaceuticamente aceitáveis incluem os sais de adição ácidos

(formados com os grupos livres amino dos polipeptídeos ativos) e que são formados com ácidos inorgânicos como, por exemplo, ácidos clorídricos ou fosfóricos ou ácidos orgânicos como o acético, oxálico, tartárico, mandélico, e assim por diante. Sais formados de grupos livres carboxila também podem ser derivados de bases inorgânicas como, por exemplo, sódio, potássio, amônio, cálcio, ou hidróxidos férricos, e bases orgânicas como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, e assim por diante.

[0152] Formulações injetáveis conterão uma “quantidade farmaceuticamente eficaz” do ingrediente ativo, ou seja, uma quantidade capaz de alcançar a resposta desejada em um indivíduo ao qual a composição é administrada. Na terapia e prevenção do pertussis, por exemplo, uma “quantidade farmaceuticamente eficaz” seria preferivelmente uma quantidade que reduza ou melhore os sintomas da doença em questão. A quantidade exata é facilmente determinada por qualquer especialista usando testes padrão. A quantidade a ser administrada depende do animal a ser tratado, da capacidade do sistema imune do animal de sintetizar anticorpos, e do grau de proteção desejada. Dosagens eficazes podem ser facilmente estabelecidas por qualquer especialista através de testes de rotina estabelecendo curvas de resposta à dosagem.

[0153] A composição pode ser administrada parenteralmente, ex., por injeção intratraqueal, intramuscular, subcutânea, intraperitoneal ou intravenosa, ou por distribuição mucosalmente, ou seja, intranasal, ou por distribuição diretamente aos pulmões. A administração ao indivíduo deve ser de pelo menos uma dose da composição. Além disso, o animal pode receber tantas doses quanto for requerido para produzir o efeito biológico desejado.

[0154] Formulações adicionais que são apropriadas para outros modos de administração incluem supositórios e, em alguns casos, formulações em aerossol, intranasais, orais, e formulações de liberação prolongada. Para os supositórios, a composição veículo incluirá tradicionais conectores e transportadores, tais como, polialcalino glicóis, ou triglicerídeos. Esses supositórios podem se formados por misturas contendo o ingrediente ativo no alcance de cerca de 0.5% a cerca de 10% (w/w), preferivelmente cerca de 1% a cerca de 2%. Veículos orais incluem excipientes normalmente empregados como, por exemplo, graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, celulose

de sacarina sódica, carbonato de magnésio, e assim por diante. Essas composições orais de vacina podem ser tomadas na forma de soluções, suspensões, tabletes, pílulas, cápsulas, formulações de liberação prolongada, ou pós, e contém de cerca de 10% a cerca de 95% do ingrediente ativo, preferivelmente cerca de 25% a cerca de 70%.

[0155] Formulações intranasais incluirão normalmente veículos que não causem maiores irritações à mucosa nasal nem prejudiquem substancialmente a função ciliar. Diluentes como a água, solução salina aquosa ou outras substâncias conhecidas podem podem ser empregadas com a invenção. As formulações nasais também podem conter preservativos tais como, mas não limitado a, clorobutanol e cloreto de benzalcônio. Um sufactante pode estar presente para aumentar a absorção das proteínas pela mucosa nasal.

[0156] Formulações de liberação controlada ou prolongada são feitas através da incorporação de proteínas a transportadores ou veículos como lipossomas, polímeros impermeáveis não-reabsorvíveis como copolímeros de etilenovinil acetato e copolímeros HYTREL, polímeros expansíveis como os hidrogéis, polímeros reabsorvíveis como o colágeno e certos poliácidos ou poliésters como aqueles usados para fazer suturas reabsorvíveis, polifosfazenos, alginato, micropartículas, nanosferas de gelatina, nanopartículas de quitosana, e assim por diante. As composições também podem ser distribuídas usando mini-bombas implantáveis, bastante conhecidas.

III. Experimental

[0157] Abaixo estão exemplos de representações específicas para realizar a presente invenção. Os exemplos são oferecidos apenas com propósitos ilustrativos, e não pretendem limitar o escopo da presente invenção de forma alguma.

[0158] Foram feitos esforços para assegurar a exatidão em relação aos números usados (ex., quantidades, temperaturas, etc.), mas alguns erros experimentais e desvios, naturalmente, devem ser levados em consideração.

Exemplo 1

Produção de Peptídeos de Defesa do Hospedeiro em Formulações de Adjuvante de Combinação.

[0159] Inicialmente, três painéis de HDPs foram produzidos usando métodos padrão de síntese de proteína. O primeiro painel incluiu as catelicidinas bovinas BMAP27 (GRFKRFRKKFKKLFKKLSPVIPLLHLG; SEQ ID NO: 14), BMAP28 (GGLRSLGRKILRAWKKYGPIIVPIIRIG; SEQ ID NO: 15), Bactenicin 2a (Bac2a) (RLARIVVIRVAR, SEQ ID NO: 16), Indolicidin (ILPWKWPWWPWRR (SEQ ID NO: 1) e LL-37 humano (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES, SEQ ID NO: 17). Esses peptídeos foram usados para o teste de atividade inicial em PBMCs murinos, suínos e humanos, usando métodos rotineiros.

[0160] Dois painéis de 7-12 peptídeos catiônicos lineares de aminoácidos foram produzidos. Um painel de 20 peptídeos (os peptídeos classe-HH) foi baseado na seqüência de Bac2a, que é uma variante linear do peptídeo bactenecin encontrado em neutrófilos bovinos. Esses peptídeos foram descritos na Publicação PCT No. WO 2006050611. Esses peptídeos foram testados para indução de quimiocinas e citocinas em PBMCs humanos. PBMCs humanos estimulados com 20 e 100 µg/ml de peptídeos de defesa do hospedeiro foram avaliados em relação a várias citocinas e quimiocinas em um ponto no tempo de 24 horas com ELISA (eBiosciences). A produção de três quimiocinas, MCP1, MCP3 e Gro-α foram identificadas como as respostas mais robustas e foram usadas em testes posteriores. Os peptídeos HH2 e HH18 (Tabela1) foram identificados como os peptídeos mais ativos. A atividade desses peptídeos foi ainda confirmada em células mononucleares do sangue do cordão humano, representando respostas das células de monócitos de um recém-nascido. Outro painel de 50 peptídeos foi então projetado com base nas seqüências dos peptídeos mais ativos do primeiro painel usando combinações de misturas de seqüências, substituições de seqüências e supressões de seqüências (ver, Publicação PCT No. WO 2008022444). Os principais peptídeos candidatos 1002 e 1018 foram selecionados com base em dois critérios; primeiro, a capacidade de induzir quimiocinas em PBMCs humanos, e segundo, citotoxidade mínima avaliada por liberação de LDH em PBMCs humanos e hemólise de glóbulos vermelhos humanos. Além disso a nisina lantibiotic (nisinA, nisinZ) foi selecionada como um peptídeo catiônico natural com atividade imunomodulatória (ver, pedido provisório US 60/929086). Peptídeos que demonstraram superior atividade imunomodulatória e mínima

citotoxidade foram avaliados em relação às capacidades protetoras *in vivo* contra *S. aureus*. Subsequentemente, peptídeos de defesa do hospedeiro selecionados foram examinados em relação à atividade protetora *in vivo*. Em resumo, camundongos BALB/c receberam peptídeos (8 mg/kg) por administração i.p. 4 horas antes da infecção. Os camundongos foram infectados com 8.4x107 de *S. aureus* em 5% de mucina por administração i.p. As contagens bacterianas na lavagem peritoneal foram determinadas em 24 horas após o início da infecção.

[0161] Os peptídeos HH2, 1002, 1018 e a nisina Z lantibiotic demonstraram as propriedades mais desejáveis e todos ofereceram proteção nos desafios animais contra *S. aureus* (Tabela 1; WO 2006050611, WO 2008022444, US pedido provisório 60/929086).

Tabela 1: Indução de quimiocina por peptídeos sintéticos e a nisina Z lantibiotic em PBMC humano. nd.: não determinado

		Indução quimiocina (pg/ml)					
		MCP-1		MCP-3		Gro-α	
		(Concentração Peptídeo)		(Concentração Peptídeo)		(Concentração Peptídeo)	
Nome	Sequência	20 µg/ml	100 µg/ml	20 µg/ml	100 µg/ml	20 µg/ml	100 µg/ml
HH2	VQLRIRVAVIRA (SEQ ID NO:18)	4882	10235	86	283	867	2693
1002	VQRWLIVWRIRK (SEQ ID NO:19)	2472	5566	13	141	1032	2117
1018	VRLIVAVRIWRR (SEQ ID NO:20)	8774	13041	156	604	826	2692
HH18	IWVIWRR(SEQIDNO:21)	1111	9608	32	431	865	2964
Nisina Z	Ile-Dhb-Ala-Ile-Dha-Leu-Ala-Abu-Pro-Gly-Ala-LysAbu-Gly-Ala-Leu-Met-GlyAla-Asn-Met-Lys-Abu-Ala-Abu-Ala-Asn-Ala-Ser-Ile-Asn-Val-Dha-Lys (SEQ ID NO:22)	434	7329	nd	nd	62	5811

[0162] A atual modelagem de Relação Quantitativa Estrutura-Atividade (QSAR) está sendo empregada para analisar os princípios estruturais que governam as atividades biológicas entre os peptídeos de defesa do hospedeiro (HDPs) (Jenssen et al., *J Pept Sci* (2008) 14: 110 e Jenssen et al., *Chem Biol Drug Des* (2007) 70: 134). Usando essa metodologia um motivo de seqüência

conservado foi identificado com base nos múltiplos alinhamentos de seqüência dos peptídeos imunomodulatórios mais ativos da seguinte forma:

[0163] V**R*IRV*VIR (SEQ ID NO:23), onde * indica qualquer aminoácido. Um conjunto de 6 novos peptídeos que abrangem ligeiras variações desse motivo central (L-, D-, e RI-derivados) foi produzido com as seguintes seqüências:

TABELA 2

Nome	Seqüência	SEQ ID	Concentração de Peptídeo (µg/ml)	Indução quimiocina (pg/ml)	
				MCP-1	Gro-α
JK1	VFLRRIRVIVIR	2	20	663	377
			100	1226	105
JK2	VFWRRIRVWVIR	3	20	414	150
			100	286	43
JK3	VQLRAIRVRVIR	4	20	873	430
			100	747	320
JK4	VQLRRIRVWVIR	5	20	655	245
			100	557	80
JK5	VQWRAIRVRVIR	6	20	673	317
			100	529	123
JK6	VQWRRIRVWVIR	7	20	721	254
			100	671	68

[0164] Esses peptídeos, bem como seus correspondentes enantioméricos e retroinverso foram sintetizados usando técnicas padrão e foi demonstrado que esses peptídeos induziram a liberação de MCP-1 e Gro-α em PBMCs humanos. Interessantemente, as versões retroinverso e enantiométricas desses peptídeos imunomodulatórios ativos foram superiores aos seus análogos L-aminoácidos.

[0165] Mais um painel de peptídeos foi produzido como derivados de indolicidina (Tabela 3; WO 2008022444). Com base na sua atividade superior em testes *ex vivo* com PBMCs humanos, quatro desses peptídeos foram selecionados para posterior análise *in vivo* em camundongos. Esse estudo demonstrou que HH1010 tinha propriedades de adjuvante *in vivo* quando combinado com CpG ODN em comparação com a indolicidina.

Tabela 3. Derivados de Indolicidina

Nome	Seqüência	Concentração de Peptídeo	Indução quimiocina (pg/ml)	
			MCP-1	Gro-α
Indolicina	ILPWKWPWWPWRR (SEQ ID NO:1)	20	245	84
		100	3120	846
HH111	ILKWKWPWWPWRR (SEQ ID NO:24)	20	905	328
		100	346	409
HH113	ILPWKKPWWPWRR (SEQ ID NO:25)	20	253	163
		100	1615	491
HH970	ILKWKWPWWKWRR (SEQ ID NO:26)	20	780	149
		100	1133	256
HH1010	ILRWKWRWWRWRR (SEQ ID NO:27)	20	3487	281
		100	3494	918

Exemplo 2

Produção de Polifosfazinas para uso em Formulações de Adjuvante de Combinação

[0166] As polifosfazinas mostradas na Figura 1 foram sintetizadas usando técnicas descritas ((Andrianov et al., *Biomacromolecules* (2004) 5: 1999; Andrianov et al., *Macromolecules* (2004) 37:414; Mutwiri et al., *Vaccine* (2007) 25: 1204). Em particular, o hexaclorociclotrifosfazeno [$(N=PCL_2)_3$] foi convertido em polidiclorofosfazeno (PDCP) usando polimerização de abertura de anel (ROP). Ver, Figura 2A. De modo a isso ser realizado, $(N=PCL_2)_3$ foi sublimado, transferido para um tubo de vidro e vedado a chama sob alto vácuo, como descrito em Singler et al., *J. Poly. Sci Polym. Chem. Ed*. (1974) 12:433; Allcock, H.R., Phosphorus-Nitrogen Compounds, Academic: New York, 1972; Gleria et al., *Top. Curr. Chem*. (2005) 250:165; De Jaeger et al., *Prog. Polym. Sci* (1998) 23:179. A reação ROP e suas condições afiliadas destroem virtualmente quaisquer contaminantes orgânicos introduzidos durante a preparação do reagente. O tempo de reação variou de 24 a 48 horas a 250°C. O polímero linear PDCP é formado durante esse processo. O PDCP foi isolado através da precipitação do polímero em hexanos.

[0167] O PDCP foi então usado para produzir poli(p-dicarboxilatofenoxi)fosfazeno (PCPP) usando técnicas essencialmente como descrito em Andrianov et al., *Biomacromolecules* (2004) 5_: 1999; Andrianov et al., *Macromolecules* (2004) 37:414; and Mutwiri et al., Vaccine (2007) 25:1204) com as seguintes modificações. A Figura 2B mostra a primeira etapa da técnica de síntese do PCPP. Ao contrário da técnica descrita nas referências acima, o anidro tolueno fornecido como uma mistura 50:50 de diglima e tolueno foi usada para dissolver o PDCP. Essa solução de PDCP foi adicionada diretamente a uma solução de sódio propil parabeno aquecida por cânula e aquecida para refluxo (aproximadamente 115°C) com agitação mecânica, resultando na produção de poli(p-di-n-propoxicarboxilatofenoxi) fosfazeno. Isso foi então usado para produzir 100% PCPP, 100% PCPP-H, 90: 10 PCPP e PCEP da seguinte forma.

A. <u>Produção de 100% PCPP e 100% PCPP-H</u>

[0168] A Figura 2C mostra a reação de saponificação usada para produzir 100% PCPP. De modo a produzir 100% PCPP como o sal de sódio, um método baseado no hidróxido de potássio foi usado (Andrianov et al., Biomacromolecules (2004) 5: 1999; Andrianov et al., Macromolecules (2004) 37:414). A solução de reação da etapa 1 acima foi resfriada a aproximadamente 90°C, e uma solução aquosa de aproximadamente 16M KOH foi adicionada e agitada. Após ser agitada por 20-30 minutos, a viscosidade da solução aumentou dramaticamente e o agitador mecânico foi colocado a aproximadamente 1200 rpm. É necessário cuidado durante essa etapa porque o polímero adere às paredes do frasco. Tolueno adicional foi usado para diminuir a viscosidade. Após um período de tempo, o polímero quebrou em pedaços menores e eventualmente em flocos brancos. Depois disso, a solução foi resfriada até a temperatura ambiente e o polímero precipitado para o fundo do frasco. O solvente orgânico foi decantado e o precipitado dissolvido em uma solução de cloreto de sódio aquosa saturada. Água livre de endotoxina foi adicionada quando necessário. O polímero foi novamente precipitado e enxaguado diversas vezes com etanol.

[0169] O precipitado foi dissolvido em água livre de endotoxina e transferido para um copo de vidro estéril. Foi usada filtração para remover massas de polímero insolúveis da solução aquosa. As soluções do polímero

foram filtradas através de um filtro de seringa Whatman GF/D 2.7 µm (ou 5.0 µm) usando uma seringa estéril. A solução filtrada foi adicionada diretamente em um frasco Erlenmeyer estéril, seguido de autoclave por 20 minutos. A solução de polímero de sal PCPP foi precipitada em etanol. Os sólidos foram coletados e secados em um forno a vácuo a cerca de 110°C e purgado com argon.

[0170] 100% PCPP-H, que é o PCPP acidificado, foram feitos como mostrado na Figura 2D. Em particular, o polímero de sal PCPP aquoso acima foi precipitado com água acídica limpa (ácido clorídrico aquoso) resultando em ácido poli(p-dicarboxilatofenoxi)fosfazeno (PCPP-H).

B. Produção de 90:10 PCPP/OH

[0171] A Figura 3 mostra o esquema de produção para um polímero PCPP compreendendo 90% de copolímero PCPP com 10% de grupos hidroxila (90:10 PCPP/OH). De modo a produzir 90:10 PCPP/OH, a solução da etapa 1 acima, contendo uma mistura 50:50 de diglima e tolueno, foi aquecida para refluxo (aproximadamente 115°C) até que 90% de substituição fosse obtida (menos de seis horas). A solução foi resfriada a aproximadamente 90°C, e uma solução aquosa de 16M KOH foi adicionada. O polímero se precipitou lentamente da solução (30-60 minutos). Se uma quantidade excessiva do polímero aderisse às paredes do frasco, mais água livre de endotoxina era adicionada. A reação foi interrompida pelo resfriamento da mistura de reação com um banho de gelo. O polímero precipitado (ou solução) pode assentar e o solvente orgânico decantar. O precipitado foi dissolvido com uma solução aquosa de cloreto de sódio saturado e precipitado da solução por etanol. O precipitado foi lavado várias vezes mais com etanol.

[0172] O precipitado foi dissolvido com água livre de endotoxina e transferido para um copo de vidro estéril. As soluções de polímero foram filtradas através de um filtro de seringa Whatman GF/D 2.7 µm (ou 5.0 µm) usando uma seringa estéril. A solução de poímero de sal 90:10 PCPP foi precipitada em etanol. Os sólidos foram coletados e secados em um forno a vácuo a cerca de 110°C e purgados com argon.

C. Produção de PCEP

[0173] As Figuras 4A e 4B mostram as etapas de produção do poli(di-4-oxifenilproprionat)fosfazeno (PCEP). Os procedimentos anteriores para o

PCPP foram seguidos para a sintese do PCEP. Na primeira etapa, o substituinte (ligante) usado foi o éster metil-protegido do hidroxihidrocinmato (metil-3-[4-oxifenil]-proprionato). Ver Figura 4A. Assim, o caminho sintético anterior para 100% PCPP foi usado para fazer o 100% PCEP. Ver Figura 4B.

Exemplo 3

Imunização de Camundongos Usando Formulações de Adjuvante de Combinação

[0174] De modo a avaliar a eficácia dos vários compostos adjuvantes, foram feitos os seguintes experimentos em camundongos.

A. Materiais e Métodos

[0175] Fêmeas com seis a oito semanas de idade de camundongos C57BL/6 (Charles River, Montreal, Quebec) foram imunizadas duas vezes subcutaneamente a intervalos de 3 semanas com 100 µL de vacina contendo 0.5 µg ΔF de BRSV (uma forma truncada da proteína BRSV F projetada para não ter o domínio transmembrana (aal-522 apenas), seja sozinha, ou co-formulada com o oligonucleotídeo 1826 CpG (CpG ODN), indolicidina (indol), e/ou polifosfazeno (PP). CpG ODN, indolicidina e polifosfazeno foram dados em doses de 10 µg, 20 µg, e 50 µg, respectivamente. Animais controle negativos foram imunizados com buffer (placebo). O CpG ODN 1826 (TCCATGACGTTCCTGACGTT) (SEQ ID NO:8) foi fornecido por Merial (Lyon, France), e continha uma espinha dorsal fosforotioato-modificada. A indolicidina (ILPWKWPWWPWRR) (SEQ ID NO:1) foi quimicamente sintetizada em um sintetizador de peptídeos de fase sólida Pioneer (PerSeptive Biosystems, Foster City, CA) usando a química 9-fluorenilmetoxi carbonila (Fmoc). O polimero de polifosfazeno, 90:10 PCPP/OH está descrito acima. O antígeno ΔF é uma versão truncada da proteína BRSV F (aal-522) sem o domínio transmembrana. Uma comparação das respostas imune da proteína ΔF, sozinha e formulada com CpG ODN, indolicidina, e polifosfazeno (ΔF/CpG/indol/PP) em camundongos C57BL/6 e Balb/c foi realizada seguindo o protocolo de imunização descrito acima.

[0176] A vacina composta de ΔF formulada com CpG ODN, indolicidina e polifosfazeno (ΔF/CpG/indol/PP) foi ainda avaliada em relação à sua capacidade de aumentar a proteção contra BRSV. Seis a oito fêmeas de camundongos Balb/c (Charles River) foram imunizadas duas vezes

subcutaneamente a intervalos de 3 semanas com 0,5 µg de ΔF sozinha ou combinada com CpG ODN 1826, indolicidina e polifosfazeno (ΔF/CpG/indol/PP). Animais de controle negativo foram imunizados apenas com buffer (placebo). Duas semanas após a segunda imunização, os camundongos foram desafiados intranasalmente com 10^7 p.f.u. da cepa BRSV 375, em um volume final de 50 µL. Animais desafiados “mock” receberam 50 µL de solução salina intranasalmente. Quatro dias após o desafio, foram coletados os pulmões de metade dos camundongos para detecção do RNA viral, e IL-5 e produção de cotaxina. Seis dias após o desafio, foram coletados baços dos camundongos remanescentes para análise por teste immunospot ligado a enzima (ELISPOT). Fluidos de lavagem broncoalveolar foram coletados de cada grupo e coagulados. Slides de cytospin foram preparados usando 1 x 10^5 e 5 x 10^4 células, e tingidos com corante Wright-Giemsa (Bayer HealthCare, Toronto, Ontário). Os números dos macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos para cada grupo foram determinados através do exame de pelo menos 200 células. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes do Canadian Council for Animal Care.

[0177] Análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). As diferenças entre os grupos foram determinadas usando um U teste Mann-Whitney.

B. Resultados

Co-formulação de OVA com CpG, indolicidina, e polifosfazeno

[0178] A atividade adjuvante da combinação de CpG ODN e indolicidina foi examinada pela co-formulação de CpG, indolicidina e polifosfazeno. Camundongos foram imunizados com uma dose sub-optimal de OVA (10 µg), seja sozinha ou co-formulada com CpG ODN (CpG), indolicidina (indol), e/ou polifosfazeno (PP), em doses de 10 µg, 10 nmoles e 50 µg, respectivamente. Camundongos controle foram imunizados com buffer (placebo).

[0179] Títulos IgG totais séricos foram medidos por ELISA após uma imunização (Figura 5A), e novamente duas semanas mais tarde após a segunda imunização (Figura 5B). A combinação de OVA com CpG ODN complexada com indolicidina induziu títulos IgG totais séricos significativamente maiores do que nos camundongos imunizados ou com apenas CpG ODN ou

apenas indolicidina, após uma (P<0.05 e P<0.01) e duas (P<0.001) imunizações.

[0180] A inclusão do polifosfazeno na formulação aumentou significativamente os títulos IgG após apenas uma imunização. Após duas imunizações, títulos IgG induzidos por OVA formulado ou com CpG + indol (P<0.001) ou CpG + PP (P<0.05 e P<0.001) foram significativamente maiores do que aqueles induzidos pelos adjuvantes individuais, entretanto não foi observada significância entre os títulos nesses dois grupos e aqueles induzidos pela combinação de todos os três adjuvantes, CpG + indol + PP.

[0181] Outra análise da resposta imune anti-OVA humoral induzida por cada uma das formulações foi realizada através da medição dos títulos sub-classe IgG1 e IgG2 séricos após duas imunizações, uma tendência similar àquela observada para os títulos IgG totais foi observada para IgG1, com títulos IgG1 maiores observados em camundongos imunizados com CpG + indol, CpG + PP, e CpG + indol + PP (Figura 5C). Níveis significativamente maiores de IgG2a foram observados em grupos imunizados com CpG + indol e CpG + indol + PP (Figura 5D), sugerindo que a combinação de CpG e indolicidina pode sustentar a indução de uma resposta imune equilibrada.

[0182] Para ainda caracterizar a resposta imune induzida por cada uma das formulações, respostas imunes celulares foram examinadas por esplenócitos preparados re-estimulantes com OVA ou o peptídeo SIINFEKL classe I-restrito MHC OVA-derivado. Após a re-estimulação com OVA, números significativamente maiores de células IFN-γ-secretoras foram observados em camundongos imunizados com antígeno co-formulado com todos os três adjuvantes (CpG + indol + PP) quando comparado IFN-γ-secreção por esplenócitos de todos os outros grupos de vacinas, incluindo aquelas formuladas com as duas combinações de adjuvantes (P<0.01) (Figura 6A). Todas as formulações que não continham CpG ODN resultaram em frequências significativamente mais altas de células IL-5 secretoras quando comparado com formulações OVA com CpG ODN (Figura 6B). Além disso, a imunização com OVA co-formulado com CpG + indol + PP aumentou significativamente IFN-γ-secreção em resposta ao epitopo SIINFEKL, indicando que a co-formulação de OVA com CpG ODN, indolicidina e polifosfazeno também aumentou as respostas celulares CD8 T antígeno-específicas. Esses

resultados sugerem que ao mesmo tempo em que a combinação de CpG ODN e indolicidina foi capaz de aumentar os títulos de anticorpos anti-OVA, ela não aumentou tão eficazmente as respostas imunes celulares. A co-formulação de OVA com CpG ODN, indolicidina, e polifosfazeno, no entanto, levou a aumentos significativos tanto nas respostas imunes humorais quanto celulares, com uma tendência Th1.

Respostas imune humorais e célula-mediadas após imunização com ΔF formulada com CpG ODN, indolicidina e polifosfazeno.

[0183] CpG ODN 1826, indolicidina, e polifosfazeno foram examinados quanto à sua capacidade de aumentar respostas imune antígeno-específicas quando administrados com a proteína ΔF, seja sozinha, ou co-formulada com CpG, indolicidina, e/ou PP. CpG ODN, indolicidina e polifosfazeno foram dados em doses de 10 µg, 20 µg, e 50 µg, respectivamente. Animais controle negativos foram imunizados com buffer (placebo). De modo a examinar a eficácia de cada um dos compostos adjuvantes, vacinas foram formuladas com uma quantidade sub-optimal da proteína ΔF (0,5 µg/dose), uma dose havia sido estabelecida em um estudo dose-titulação anterior. Camundongos foram imunizados duas vezes subcutaneamente, e os títulos IgG anti-ΔF totais séricos foram medidos após cada imunização por ELISA. Um camundongo no grupo ΔF/PP morreu e foi excluído da análise.

[0184] Enquanto os títulos IgG totais produzidos por todos os adjuvantes foram significativamente maiores do que aqueles de grupos imunizados somente com ΔF após uma imunização (Figura 7A), camundongos imunizados com ΔF/CpG/indol também desenvolveram títulos significativamente maiores do que os correspondentes dos grupos de vacinas de componente único. Além disso, camundongos imunizados com ΔF/CpG/PP ou ΔF/CpG/indol/PP tiveram títulos maiores do que os grupos correspondentes não imunizados com CpG. Após duas imunizações os títulos IgG de todos os grupos, com exceção daqueles imunizados com ΔF/indol e ΔF/indol/PP, foram significativamente maiores do que os dos grupos imunizados somente com ΔF (Figura 7B). Títulos induzidos por imunização com ΔF/indol ou ΔF/indol/PP não foram significativamente maiores do que somente com ΔF, e foram significativamente mais baixos do que aqueles produzidos por todos os outros grupos adjuvantes.

[0185] A determinação dos títulos sub-classe IgG1 e IgG2a séricos revelou que todas as fromulações de vacinas foram capazes de produzir títulos de anticorpos IgG1, com os maiores títulos observados nos grupos imunizados com ΔF/CpG/PP e ΔF/CpG/indol/PP (Figura 7C). Entretanto, formulações contendo CpG também resultaram em títulos IgG2a que foram significativamente maiores do que aqueles observados nos grupos não imunizados com CpG ODN (Figura 7D), sugerindo que a indução de uma resposta imune Th1-tendenciosa.

[0186] A secreção ΔF-induzida de IFN-γ e IL-5 esplenócitos re-estimulados *in vitro* foi medida após a segunda imunização, de modo a avaliar ainda a resposta imune induzida pela proteína ΔF quando co-formulada com os diferentes componentes adjuvantes. Um aumento marcante na freqüência de células IFN-γ-secretoras foi observado em camundongos imunizados com ΔF/CpG/indol/PP quando comparado com a secreção IFN-γ em todos os outros grupos de vacinas (Figura 8A). Uma quantidade significativamente menor de células IL-5-secretoras foi observada em todos os grupos imunizados com formulações contendo CpG (Figura 8B).

[0187] Esses resultados sugerem que a proteína ΔF sozinha induziu uma resposta imune Th2-tendenciosa. Entretanto, a inclusão de CpG ODN nas formulações das vacinas resultou em uma alteração em direção a uma resposta imune Th1 ou equilibrada. Por outro lado, indolicidina e polifosfazeno, na ausência de CpG ODN, parecem manter a resposta imune tipo-2 induzida por ΔF. Apenas a combinação de todos os três adjuvantes, ΔF/CpG/indol/PP, demonstrou um aumento significativo em ambas as respostas imune humoral e celular ΔF-específicas, e consequentemente foi selecionada para posterior caracterização como uma potencial candidata a vacina BRSV.

Comparação de respostas imune em camundongos C57BL/6 e Balb/c

[0188] Camundongos Balb/c são permissivos à infecção RSV, e consequentemente são mais comumente utilizados para estudos de desafio RSV e BRSV. Eles são, no entanto, mais propensos a desenvolver a resposta imune Th2-inclinada do que os camundongos C57BL/6. Assim sendo, a resposta imune a ΔF formulada com a combinação CpG ODN, indolicidina e polifosfazeno foi ainda avaliada em ambas as classes de camundongos. Camundongos foram imunizados com buffer (placebo). Após duas

imunizações, títulos sub-classe séricos foram medidos de modo a determinar se a imunização com ΔF/CpG/indol/PP poderia da mesma forma aumentar os níveis de IgG1 e IgG2a antígeno específico em ambas as classes de camundongos. Um camundongo Balb/c no grupo ΔF/CpG/indol/PP morreu e foi excluído da análise.

[0189] Camundongos imunizados com ΔF/CpG/indol/PP desenvolveram títulos IgG1 (Figura 9A) e IgG2a (Figura 9B) significativamente maiores do que aqueles imunizados somente com ΔF. Não houve diferença significativa no número de células IFN-γ-secretoras entre as duas classes (Figura 9C), e ambas as classes demonstraram um aumento no número de células secretoras IL-5 quando imunizadas com ΔF/CpG/indol/PP (Figura 9D).

Respostas imune humorais e célula-mediadas ΔF-específicas em camundongos imunizados com a proteína ΔF formulada com CpG ODN, indolicidina e polifosfazeno, e desafiados com BRSV

[0190] De modo a avaliar a eficácia protetora da proteína ΔF quando formulada com CpG ODN, indolicidina e polifosfazeno contra BRSV, camundongos foram imunizados duas vezes subcutaneamente ou somente com ΔF ou com ΔF/CpG/indol/PP, e desafiados com a cepa 375 da BRSV duas semanas após a segunda vacinação. Camundongos controle foram imunizados com buffer, e foram desafiados com BRSV ou “mock”-desafiados com solução salina.

[0191] Como foi observado nos testes anteriores, as respostas IgG totais séricas foram significativamente mais altas em camundongos imunizados com ΔF/CpG/indol/PP do que em camundongos imunizados somente com ΔF (Figura 10A). Isso ficou evidente tanto nas respostas imune primárias quanto nas secundárias, bem como após o desafio. Em ambos os grupos, os títulos aumentaram após a segunda imunização assim como após o desafio, sugerindo a indução de uma resposta anamnéstica. Da mesma forma, a determinação dos títulos de sub-classe séricos revelou produção de IgG1 e IgG2a significativamente mais alta em camundongos imunizados com ΔF/CpG/indol/PP, tanto após duas imunizações (Figura 10B) quanto após desafio (Figura 10C). A capacidade dos anticorpos séricos resultantes de neutralizar o vírus in vitro foi avaliada usando um teste de neutralização de vírus. A imunização com ΔF/CpG/indol/PP induziu títulos de anticorpos

neutralizadores que foram significativamente maiores do que aqueles produzidos somente por ΔF (Figura 10D), e aumentou em aproximadamente quatro vezes após o desafio com BRSV.

[0192] Para examinar as respostas imunes celulares geradas por cada uma das vacinas, a secreção ΔF-induzida de IFN-γ e IL-5 por esplenócitos foi medida seis dias após o desafio. Embora não significativamente diferente, a imunização com ΔF/CpG/indol/PP resultou em um aumento na freqüência de esplenócitos ΔF-específicos e IFN-γ-produtores (Figura 11A). Em contraste, o número de células IL-5-produtoras foi significativamente reduzido em camundongos imunizados com ΔF/CpG/indol/PP quando comparado com a imunização somente com ΔF (Figura 11B). Esses resultados ainda fundamentaram a capacidade da formulação de CpG ODN, indolicidina, e polifosfazeno de alterar a resposta imune gerada por ΔF de uma resposta Th2 para uma resposta Th1-tendenciosa.

Indução de citocina/quimiocina e populações de células nos pulmões

[0193] Homogenatos de pulmão foram examinados em relação à presença de IL-5 e eotaxina quatro dias após o desafio. Camundongos foram imunizados duas vezes subcutaneamente com somente ΔF ou com ΔF/CpG/indol/PP e desafiados duas semanas depois com BRSV. Grupos controle foram imunizados com buffer e então desafiados com BRSV (Placebo/BRSV) ou “mock”-desafiados com solução salina (Placebo/solução salina).

[0194] IL-5 foi apenas detectado nos pulmões de camundongos imunizados somente com ΔF, e esteve ausente em todos os outros grupos (Figura 12A). Níveis substancialmente maiores de eotaxina, um potente quimioatraente de eosinófilos, também foram detectados em camundongos imunizados somente com ΔF, comparado com camundongos imunizados com ΔF/CpG/indol/PP (Figura 12B). Resultados semelhantes foram observados em pulmões de animais seis dias após o desafio (data não mostrada).

[0195] O efeito da formulação de ΔF com CpG ODN, indolicidina e polifosfazeno na resposta imune pulmonar após a infecção com BRSV foi também examinado. A porcentagem de eosinófilos presente nos pulmões de camundongos imunizados com ΔF foi de 63%, em contraste com 2% observados em camundongos imunizados com ΔF/CpG/indol/PP (Figura 12C).

Não foram observados eosinófilos em nenhum dos grupos controle. A porcentagem de macrófafos tanto de neutrófilos quanto alveolares foi maior nos camundongos controle e nos camundongos imunizados com ΔF/CpG/indol/PP quando comparado com ΔF sozinho, enquanto que a porcentagem de linfócitos foi baixa em todos os grupos.

Detecção de RNA viral nos pulmões de camundongos infectados

[0196] Para determinar se a imunização com ΔF/CpG/indol/PP poderia reduzir a replicação viral, e assim prevenir a infecção por BRSV, o RNA viral nos pulmões dos camundongos foi medido quatro dias após a infecção usando qRT-PCR. Camundongos foram imunizados duas vezes subcutaneamente somente com ΔF ou com ΔF/CpG/indol/PP e desafiados duas semanas depois com BRSV. Grupos controle foram imunizados com buffer e então desafiados com BRSV (Placebo/BRSV) ou “mock”-desafiados com solução salina (Placebo/solução salina).

[0197] A quantidade de RNA viral detectada em camundongos imunizados com ΔF/CpG/indol/PP foi significativamente menor do que aquela detectada no grupo placebo, como aquela em camundongos imunizados somente com ΔF (Figura 13).

[0198] Resumindo, os experimentos acima mostram que a combinação de um peptídeo de defesa do hospedeiro com um oligonucleotídeo CpG e uma fosfazina aumenta as respostas imune em camundongos se comparado com o uso desses três componentes sozinhos. Ainda não existe vacina HRSV licenciada, e as vacinas BRSV são apenas moderadamente eficazes. Os esforços para desenvolver vacinas RSV foram reduzidos pela incapacidade das vacinas candidatas de induzir proteção contra a infecção natural e a indução de doença exagerada na subseqüente exposição ao vírus, agora amplamente aceita devido às resopostas T celulares polarizadas vacina-induzidas tipo-2. É consequentemente essencial que se identifique novos candidatos adjuvantes que induzam respostas equilibradas ou Th1 quando co-administradas com vacinas RSV.

[0199] A avaliação dos efeitos adjuvantes de CpG, indolicidina e polifosfazeno, quando co-formulados com a proteína ΔF revelou que eles são mais eficazes quando usados em combinação. Doses adjuvantes foram selecionadas com base em relatórios anteriores da adjuvanticidade dos

componentes individuais. Completos efeitos imunoestimulatórios de CpG ODN 1826 foram observados com doses tão baixas quanto 10 µg (Davies et al., *J. Immunol.* (1998) 160: 870-876), e o polifosfazeno quando administrado a 50 µg por dose demonstrou aumento das respostas imune mesmo na presença de baixas quantidades de antígeno (Mutwiri et al., *Vaccine* (2007) 25: 1204-1213). O exame do efeito da dose de indolicidina e atividade adjuvante quando co-administrada com CpG ODN 1826 indicou que 20 µg de peptídeos aumentou as respostas imune antígeno-específicas e efetuou a alteração de classe para IgG2a melhor do que quando o peptídeo foi administrado em uma dose dez vezes maior (resultados não publicados). Semelhante às descobertas descritas anteriormente (Hancock et al., *Vaccine* (2001) 19: 4874-4882; Hancock et al., *Vaccine* (1995) 13: 391-400), a proteína ΔF, quando administrada sozinha, resultou em uma resposta imune predominantemente Th2. Nos experimentos detalhados acima, a imunização de camundongos com ΔF co-formulada com uma combinação de todos os três adjuvantes nas doses indicadas levou a um aumento significativo dos títulos IgG, IgG1 e IgG2a totais séricos, e aumentou significativamente a produção de IFN-γ, que é importante para estabelecer uma resposta imune antígeno-específica de Th1 protetora à infecção RSV, e prevenir o aumento da doença vacina-induzida (Durbin et al., *J. Immunol*. (2002) 168: 2944-2953).

[0200] Hancock et al. (Hancock et al., *Vaccine* (2001) 19: 4874-4882) descobriu que a proteína RSV F quando administrada com CpG ODN na ausência de outro adjuvante não induziu níveis significativos de OgG anti-F total ou sub-classe, ou anticorpos neutralizadores. Da mesma forma, a imunização mucosal de ratos do algodão com a proteína RSV F co-adjuvantada com apenas CpG ODN resultou em somente uma proteção modesta contra o desafio viral e não evitou o desenvolvimento de patologia pulmonar crescente (Prince et al., *J. Virol*. (2003) 77: 13156-13160. Mapletoft et al., (Mapletoft et al., *J. Gen. Virol*. (2008) 89: 250-260) observou um aumento nos títulos IgG antígeno-específicos e a freqüência de células IFN-γ-secretoras após a imunização mucosal de camundongos com uma vacina FI-BRSV co-formulada com CpG ODN e polifosfazeno. A combinação de ΔF com CpG ODN e polifosfazeno aumentou a imunidade humoral antígeno-específica.

[0201] Como detalhado nos presentes experimentos, entretanto, a inclusão da indolicidina peptídeo de catelicidina catiônica ainda aumentou as respostas imune célula-mediadas, sugerindo que isso desempenha também um importante papel na formulação da vacina. Nesse estudo a indiolicidina por si só não parece ser um adjuvante eficaz, e promoveu uma resposta Th2-inclinada. A combinação de indolicidina, no entanto, juntamente com CpG ODN e polifosfazeno aumentou as respostas imune humorais e celulares ΔF-específicas, e gerou uma resposta Th1. Além disso, demonstramos recentemente que a indolicidina age sinergicamente com CpG ODN para aumentar a produção de citocinas Th1 tais como IL-12 e IFN-γ, bem como o fator quimiotático MCP-1 (resultados não publicados). A combinação de todos os três adjuvantes foi requerida para maior aumento da resposta imune, bem como para alterar a resultante resposta imune anti-ΔF de Th2 para Th1. Entretanto os mecanismos desse aumento imune não são claros. Sem estar ligado uma teoria em particular, a imunogenicidade aumentada e o efeito Th1-inclinado da combinação com todos os três adjuvantes e com ΔF poderia ser como um resultado da estabilização e efeito prolongado de CpG ODN e/ou ΔF, e uma maior entrada de CpG ODN e ΔF em células apresentando antígenos.

Exemplo 4

Imunização de Gado usando Formulações de Adjuvante de Combinação Combinadas com OVA

[0202] Para determinar se a co-formulação com CpG ODN 1826, indolicidina e polímero de polifosfazeno 90:10 PCPP/OH poderia efetivamente aumentar as respostas imune antígeno-específicas em grandes espécies endogâmicas, o gado foi imunizado com 1 mg de ovalbumina (OVA) seja sozinha ou co-formulada com CpG ODN, indolicidina, e/ou polifosfazeno, em doses de 0,5 mg, 2 mg, e 1 mg, respectivamente. Animais controle foram imunizados com buffer (placebo). Títulos IgG totais séricos e secreção IFN-γ por PBMCs re-estimulados foram medidos após duas imunizações. Similar aos resultados observados em camundongos, a imunização com OVA formulada com CpG + indol ou CpG + indol + PP aumentou os títulos IgG totais séricos quando comparado com títulos induzidos por imunização somente com OVA, ou OVA combinada com os adjuvantes individualmente (Figura 14A). Da mesma forma, números significativamente maiores de células IFN-γ-secretoras

foram também observados nesses dois grupos (Figura 14B), indicando que a co-formulação de CpG ODN com indolicidina e polifosfazeno também pode aumentar as respostas imune antígeno-específicas em uma população endogâmica.

Exemplo 5

Imunização de Gado usando Formulações de Adjuvante de Combinação com HEL

[0203] Para determinar se a co-formulação com CpG ODN 2007, indolicidina e polímero de polifosfazeno 90:10 PCPP/OH poderia efetivamente aumentar respostas imune antígeno-específicas em gado, os seguintes experimentos foram conduzidos. CpG ODN 2007 ((TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT) (SEQ ID NO:9) foi fornecido por Merial (Lyon, France), e continha uma espinha dorsal fosforotioato-modificada. 90:10 PCPP/OH e indolicidina são descritos acima.

[0204] Vacas foram imunizadas com lisozima de ovo de galinha (HEL, Sigma-Aldrich) adjuvantada com CpG ODN 2007 (CpG), indolicidina (HDP), e polifosfazeno (PP) de modo a medir respostas imune humorais e celulares HEL-específicas da seguinte forma. O gado (8/grupo) foi imunizado duas vezes subcutaneamente com 1 mg de HEL, sozinha ou co-formulada com 500 µg CpG ODN 2007, 2 mg de indolicidina, e/ou 1 mg de polifosfazeno. Os títulos IgG anti-HEL totais séricos foram medidos após as imunizações primária (Figura 15A) e secundária (Figura 15B). Após a imunização secundária, as células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) foram re-estimuladas com 10 µg/mL HEL e os números de células IFN-γ-secretoras foram medidos pelo teste ELISPOT (Figura 15C). Os títulos de ELISA foram expressados como o recíproco da maior diluição resultante em uma leitura de dois desvios padrão acima do controle negativo. Os resultados de ELISPOT foram expressados como a diferença entre o número de células citocina-secretoras em poços HEL-estimulados e poços meio-controle por 106 células. Os valores representam meios geométricos. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$.

[0205] Como se pode ver, a co-formulação de HEL com CpG ODN, indolicidina e polifosfazeno levou a respostas imune significativamente aumentadas em bezerros se comparado com HEL formulada com qualquer um ou dois dos adjuvantes.

Exemplo 6

Produção de Citocinas por PBMCs Bovinos *in vitro* após a administração das Formulações de Adjuvante de Combinação combinadas com HEL

[0206] De modo a determinar os efeitos da formulação de adjuvante de combinação na produção de citocinas *in vitro*, foi conduzido o seguinte experimento. Várias combinações de CpG ODN 2007, indolicidina (indol) e polímero de polifosfazeno (90:10 PCPP:OH, rotulado como PP6 na figura) nas concentrações finais de 0, 12.5, 25, 50 µg/mL, respectivamente, como mostrado nas Figuras 16A-16C, foram usadas para estimular PBMCs bovinos por 24 horas. Os níveis de IFN-α (Figura 16A), TNF-α (Figura 16B) e IFN-γ (Figura 16C) foram medidos por ELISA. Os dados mostrados representam os valores médios para 8 bezerros. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$.

[0207] Como se pode ver, a formulação de combinação tripla resultou em uma maior liberação de citocinas e quimiocinas de células imune *in vitro*.

Exemplo 7

Respostas Imune ao Toxóide Pertussis em Camundongos usando Formulação de Adjuvante de Combinação

[0208] De modo a determinar se o adjuvante de combinação foi eficaz em produzir uma resposta imune ao toxóide pertussis, foi conduzido o seguinte experimento. Oito grupos de 15 camundongos receberam várias combinações de toxóide pertussis (PTd) obtido de Novartis Vaccines and Diagnostics, Italy, polímero de polifosfazina (PZ#6), CpG oligonucleotídeo CpG-C 2395 e HH2. Grupos controle receberam ou PBS como um controle negativo ou a vacina comercialmente disponível QUADRACEL (Sanofi-Pasteur, Inc) como um controle positivo. Ver Tabela 5. O polímero de polifosfazina usado foi 90:10 PCPP:OH, produzido como descrito acima. CpG-C 2395 tem a seqüência TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCCG (SEQ ID NO: 12) e é totalmente fosforotiotado e foi obtido de Coley Pharmaceuticals. A seqüência do peptídeo de defesa do hospedeiro HH2 é mostrada na Tabela 1 acima. QUADRACEL contém toxóide pertussis bem como antígenos de proteína Bordetella adicionais. Duas doses de toxóide pertussis foram escolhidas para determinar se os adjuvantes eram capazes de aumentar as respostas imune a uma dose sub-optimal de antígeno.

[0209] Os títulos IgG totais resultantes mostraram que a resposta imune à menor dose de toxóide (0.2µg vs 1.0 µg) foi mais variável do que a dose de 1.0 µg e que a resposta IgG total à dose mais baixa de PTd foi menor em todos os pontos no tempo (Figura 17). No entanto, a cinética da resposta anti-PTd específica mostrou que os adjuvantes de combinação induziram uma resposta muito mais rápida ao PTd (Figura 18), mesmo quando comparado com a vacina comercialmente disponível. Igualmente, os títulos IgG1 e IgG2a individuais (Figuras 19 a 22) mostraram que a adição dos adjuvantes de combinação aumentou o título IgG1 anti-PTd específico quando 1.0 µg de PTd foi usado e o título IgG2a em todas as doses de PTd usadas. Relevantemente, uma única dose de 1,0 µg de PTd formulada juntamente com a combinação de adjuvante tripla induziu títulos IgG1 PTd específicos nos mesmos níveis que duas doses de vacina comercialmente disponível (Figura 21). Os títulos IgG2a PTd específicos em resposta a uma única dose da formulação de adjuvante tripla e 1.0 µg de PTd foram 100 vezes maiores do qua a vacina comercial (Figura 22). Assim, uma única dose da combinação tripla é tão eficaz em induzir uma resposta imune mais equilibrada do que duas doses do produto comercialmente disponível.

Exemplo 8

Produção de quimiocina por PBMCs humanos *in vitro* após a administração de formulações de adjuvantes compreendendo ácidos nucléicos CpG, não-CPG, e poli(I:C), peptídeos de defesa do hospedeiro 1002 e nisina Z e PCPP polifosfazeno

Indução de quimiocinas por formulações de ácido nucléico-peptídeo

[0210] Formação complexa direta entre os vários ácidos nucléicos e peptídeos de defesa do hospedeiro sintéticos foi verificada antes das estimulações PBMC humanas. Para a determinação das atividades imunoestimulatórias de vários ácidos nucléicos em complexo com peptídeos de defesa do hospedeiro *in vitro*, foi conduzido o seguinte experimento. Várias combinações de CpG ODN 10103, 5 'AAAAAAGGTACCT AAATAGTATGTTTCTGAAA3 ' (SEQ ID NO: 13) não-CpG ODN, poli(I:C) e os peptídeos de defesa do hospedeiro sintéticos 1002 e 1018 foram examinados em relação à indução de quimiocina. Em resumo, ácidos nucléicos e peptídeos foram co-incubados por 30 minutos a 37°C antes de estimulações celulares. Os

PBMCs humanos foram estimulados com as várias formulações por 24 horas e os níveis de MCP-1 foram medidos por ELISA. Índices optimais 2:1, 1:1 e 1:2 ácido nucléico:peptídeo de defesa do hospedeiro (µg/ml: µg/ml) foram identificados entre princípios de concentrações de 40 µg/ml e 10 µg/ml. Os resultados foram de quatro replicativos biológicos.

[0211] Formulações usando poli(I:C), o não-CpG ODN, e CpG ODN 10103 todas demonstraram indução sinergística de MCP-1 quando casado com os principais candidatos peptídeos sintéticos 1002 ou 1018 se comparado com estimulações com os componentes individuais. A liberação total de MCP-1 e efeito sinergístico era comparável independente da forma do ácido nucléico utilizado nas formulações adjuvantes com peptídeo de defesa do hospedeiro.

Indução de quimiocina por formulações de adjuvantes triplas em PBMCs humanos

[0212] O efeito da adição de PCPP na indução de quimiocina pelos complexos peptídeo-CpG 10103 foi avaliado pela indução de MCP-1 em PBMCs humanos. Em resumo, os complexos peptídeo-CpG foram formados como anteriormente descrito e após incubação PCPP, com ou sem MgC12 (pH 7.4), acrescentados aos complexos peptídeo-CpG em várias concentrações e incubados por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, PBMCs humanos foram estimulados com as várias formulações por 24 horas e os níveis de MCP-1 foram medidos por ELISA.

Tabela 4: Propriedades adjuvantes potenciais de peptídeos 1002 e Nisina Z em combinação com polifosfazinas (PCPP) e CpG 10103 avaliado por indução de MCP-1 em PBMC humano.

[0213] Peptídeos e CpGs foram mantidos em 40 µg/ml e 20 µg/ml, respectivamente, durante todos os experimentos de formulações. A indução sinergística de MCP-1 foi calculada da seguinte forma: indução de MCP-1 por formulação/soma de induções de MCP-1 de componentes individuais da formulação. Um número maior que 1 significa indução sinergística de MCP-1 com números maiores indicando sinergia aprimorada comparada com os componentes individuais da formulação. Os dados apresentados representam a média de 4 replicativos biológicos. * “na” = não aplicável.

Tratamento	Detalhes específicos dos componentes formulação	Indução MCP-1 (pg/ml)	Indução sinergistica de MCP-1*
Peptídeo sozinho (40 µg/ml)	1002	371	NA
	Nisina Z	47	Na
CpG (20 µg/ml)	CpG 10103	755	Na
Peptídeo + CpG	1002 + CpG	8163	4,5
	Nisina Z + CpG	10604	8,9
Peptídeo + CpG 10103 + 1mM $MgCl_2$	1002 + CpG	11437	6,3
	Nisina Z + CpG	15497	13
1002 + CpG 10103 + 10mM $MgCl_2$	1002 + CpG	10970	6,0
1002 + CpG 10103 + PCPP	PCPP (9,375 µg/ml)	10103	4,4
	PCPP (18,75 µg/ml)	10751	7,3
	PCPP (37,5 µg/ml)	6169	4,5
	PCPP (75 µg/ml)	0	0
	PCPP (150 µg/ml)	0	0
Nisina Z + CpG 10103 + PCPP	PCPP (9,375 µg/ml)	11386	8,4
	PCPP (18,75 µg/ml)	8506	7,0
	PCPP (37,5 µg/ml)	1493	1,3
	PCPP (75 µg/ml)	119	0,1
	PCPP (150 µg/ml)	0	0
1002 + CpG 10103 + 1mM $MgCl_2$	PCPP (9,375 µg/ml)	11484	5,0
	PCPP (18,75 µg/ml)	9201	6,2
	PCPP (37,5 µg/ml)	3343	2,4
	PCPP (75 µg/ml)	0	0
	PCPP (150 µg/ml)	0	0
Nisina Z + CpG 10103 + 1mM $MgCl_2$	PCPP (9,375 µg/ml)	10154	7,5
	PCPP (18,75 µg/ml)	11505	9,5
	PCPP (37,5 µg/ml)	7663	6,5
	PCPP (75 µg/ml)	473	0,4
	PCPP (150 µg/ml)	0	0
1002 + CpG 10103 + 10mM $MgCl_2$	PCPP (9,375 µg/ml)	11968	5,2
	PCPP (18,75 µg/ml)	12102	8,2
	PCPP (37,5 µg/ml)	5603	4,1
	PCPP (75 µg/ml)	835	0,6
	PCPP (150 µg/ml)	0	0

Tabela 5

Grupo	# camundongo	PTd	PZ#6	CpG-C (2395)	HH2	Outro
1	15					PBS- controle negativo
2	15					Controle Quadracel- positivo
3	15	1 µg				
4	15	1 µg	100 µg	10 µg	100 µg	
5	15	1 µg	100 µg	10 µg	100 µg	Duas doses dadas
6	15	02 µg				
7	15	0,2µg	100 µg	10 µg	100 µg	
8	15	0,2µg	100µg	10 µg	100 µg	Duas doses dadas

[0214] Assim, novos métodos para tratar e prevenir doenças infecciosas são divulgados. Embora representações preferíveis da invenção tenham sido descritas em detalhes, fica entendido que variações óbvias podem ser feitas sem se afastar do espírito e do escopo da invenção como definido pelas reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição adjuvante compreendendo ao menos um peptídeo de defesa do hospedeiro, uma sequência imunoestimulatória e um polímero polianiônico caracterizado o peptídeo de defesa do hospedeiro ser selecionado de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21 ou SEQ ID NO:22, a sequencia imunoestimulatória ser selecionada de SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, ou poli(I:C), o polímero polianiônico ser poli[di(sodio carboxilatofenoxi)fosfazeno] (PCPP), poli(di-4-oxifenilproprionato)fosfazeno (PCEP), ou um polímero PCPP compreendendo 90% de copolímero PCPP com 10% de grupos hidroxil (90:10 PCPP), onde a dita composição adjuvante é capaz de aumentar uma resposta imune em um antígeno selecionado quando comparado a uma resposta imune provocada por uma quantidade equivalente do antígeno quando distribuído sem a composição adjuvante.

2. Composição adjuvante de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por a dita composição compreender ainda o dito antígeno.

3. Composição adjuvante de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado por o peptídeo de defesa do hospedeiro ser SEQ ID NO:1.

4. Composição adjuvante de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado por o peptídeo de defesa do hospedeiro ser SEQ ID NO:19.

5. Composição adjuvante de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado por o peptídeo de defesa do hospedeiro ser SEQ ID NO:20.

6. Composição adjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 caracterizado por o polímero polianiônico ser poli(di-4-oxifenilproprionato)fosfazeno (PCEP).

7. Composição adjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 caracterizado por o oligonucleotideo CpG ser totalmente fosforotionado.

8. Composição adjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 caracterizado por a sequencia imunoestimulatória ser poli (I:C).

9. Composição adjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 caracterizado por o antígeno ser selecionado a partir de um vírus, bactéria, parasita e fungo.

10. Composição adjuvante de acordo com a reivindicação 9 caracterizado por o antígeno ser o vírus respiratório sincicial (RSV).

11. Composição adjuvante de acordo com a reivindicação 10 caracterizado por o antígeno ser de BRSV.

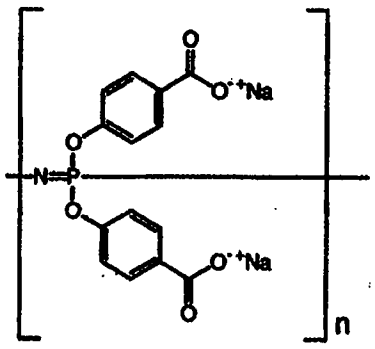
12. Composição adjuvante de acordo com a reivindicação 9 caracterizado por o antígeno ser de *Bordetella*.

13. Composição adjuvante de acordo com a reivindicação 12 caracterizado por o antígeno ser de *B. pertussis*.

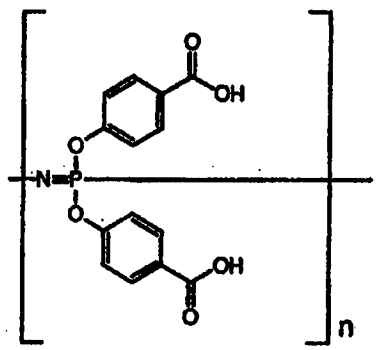
14. Composição adjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13 caracterizado por o peptídeo de defesa do hospedeiro, a sequencia imunoestimulatória, o polímero polianiônico e o antígeno selecionado estarem presentes na mesma composição.

15. Composição adjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13 caracterizado por ao menos um dentre o peptídeo de defesa do hospedeiro, a sequencia imunoestimulatória, o polímero polianiônico e o antígeno selecionado estar presente em uma composição diferente das outras.

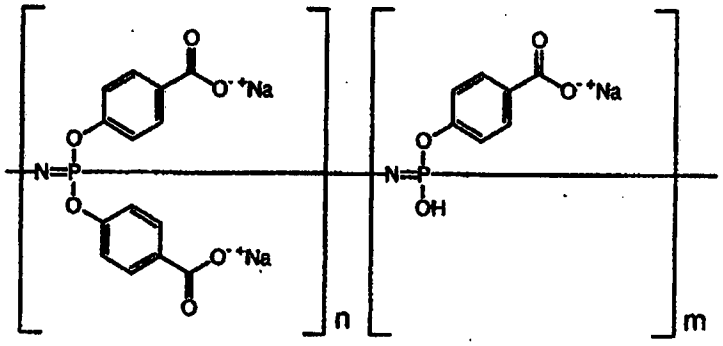
16. Composição adjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes caracterizado por a composição adjuvante estar na forma de uma micropartícula de polifosfazeno.



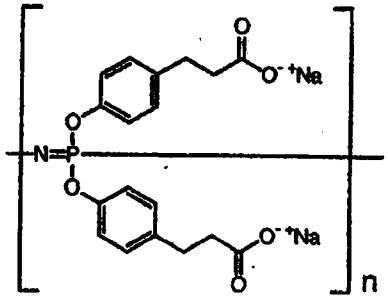
Poly(p-carboxylatophenoxy)-
phosphazene, sodium salt
100% PCPP



Poly(p-carboxylatophenoxy)-
phosphazene, acid
100% PCPP-H



Poly(p-carboxylatophenoxy)-
phosphazene, sodium salt
90:10 PCPP



Poly(di-4-oxyphenylproprionate)-
phosphazene, sodium salt
100% PCEP

Fig. 1

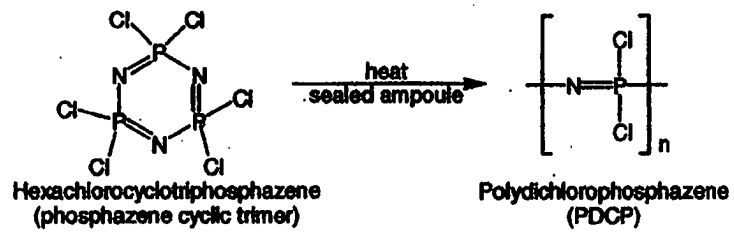


Fig. 2A

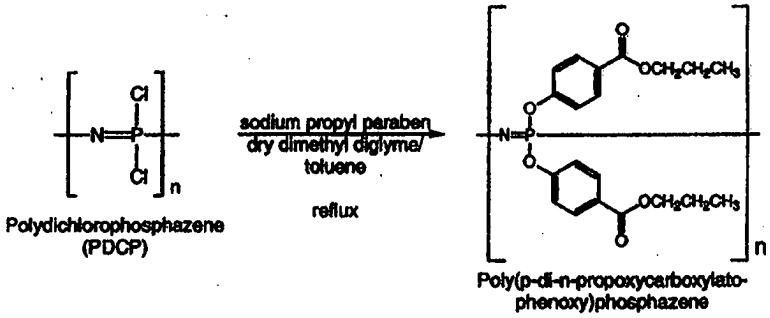


Fig. 2B

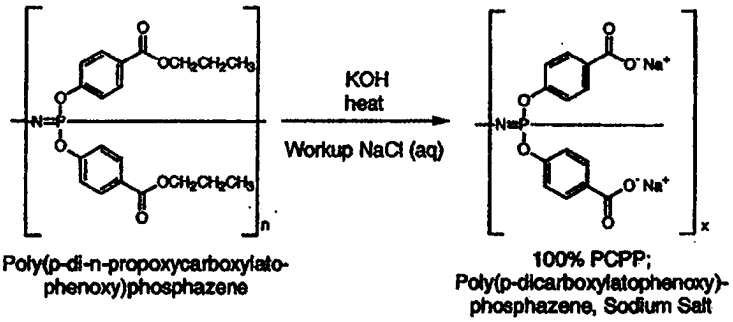


Fig. 2C

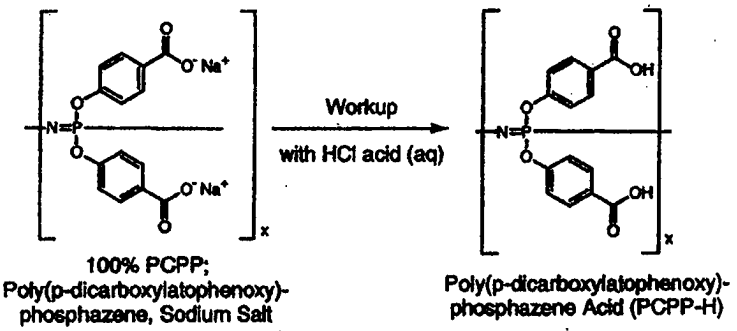


Fig. 2D

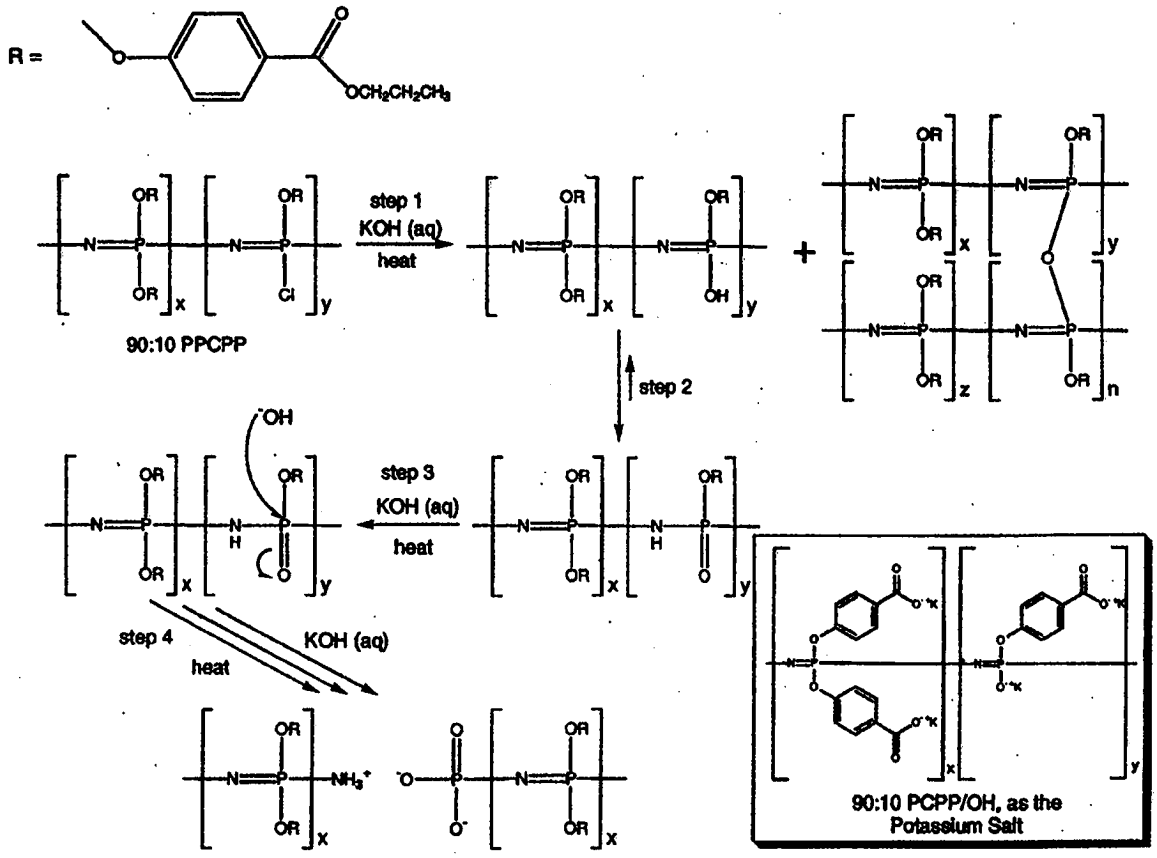

R =
OCH2CH2CH3
90:10 PPCPP
step 1
KOH (aq)
heat
step 2
step 3
KOH (aq)
heat
step 4
heat
KOH (aq)
90:10 PCPP/OH, as the
Potassium Salt

Fig. 3

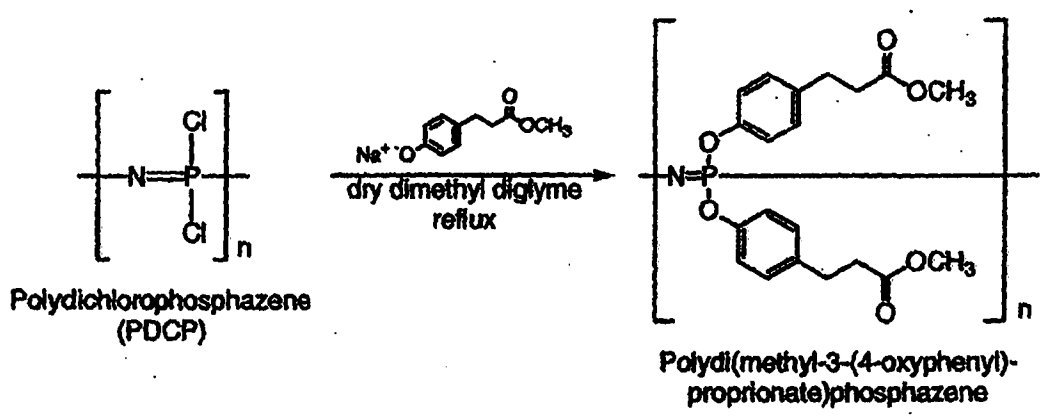

Cl
N=P
Cl
n
Polydichlorophosphazene
(PDCP)
Na+ -O
OCH3
dry dimethyl diglyme
reflux
OCH3
N=P
OCH3
n
Polydi(methyl-3-(4-oxyphenyl)-
proprionate)phosphazene

Fig. 4A

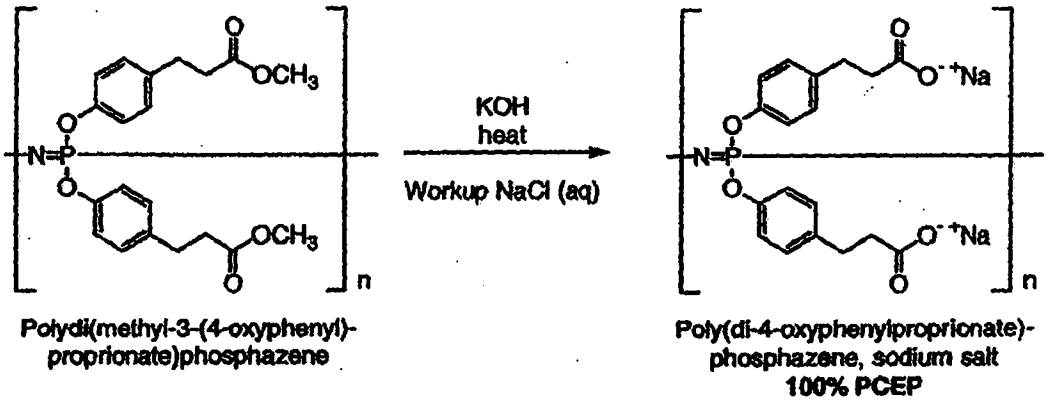

OCH3
N=P
OCH3
n
Polydi(methyl-3-(4-oxyphenyl)-
proprionate)phosphazene
KOH
heat
Workup NaCl (aq)
O- +Na
N=P
O- +Na
n
Poly(di-4-oxyphenylproprionate)-
phosphazene, sodium salt
100% PCEP

Fig. 4B

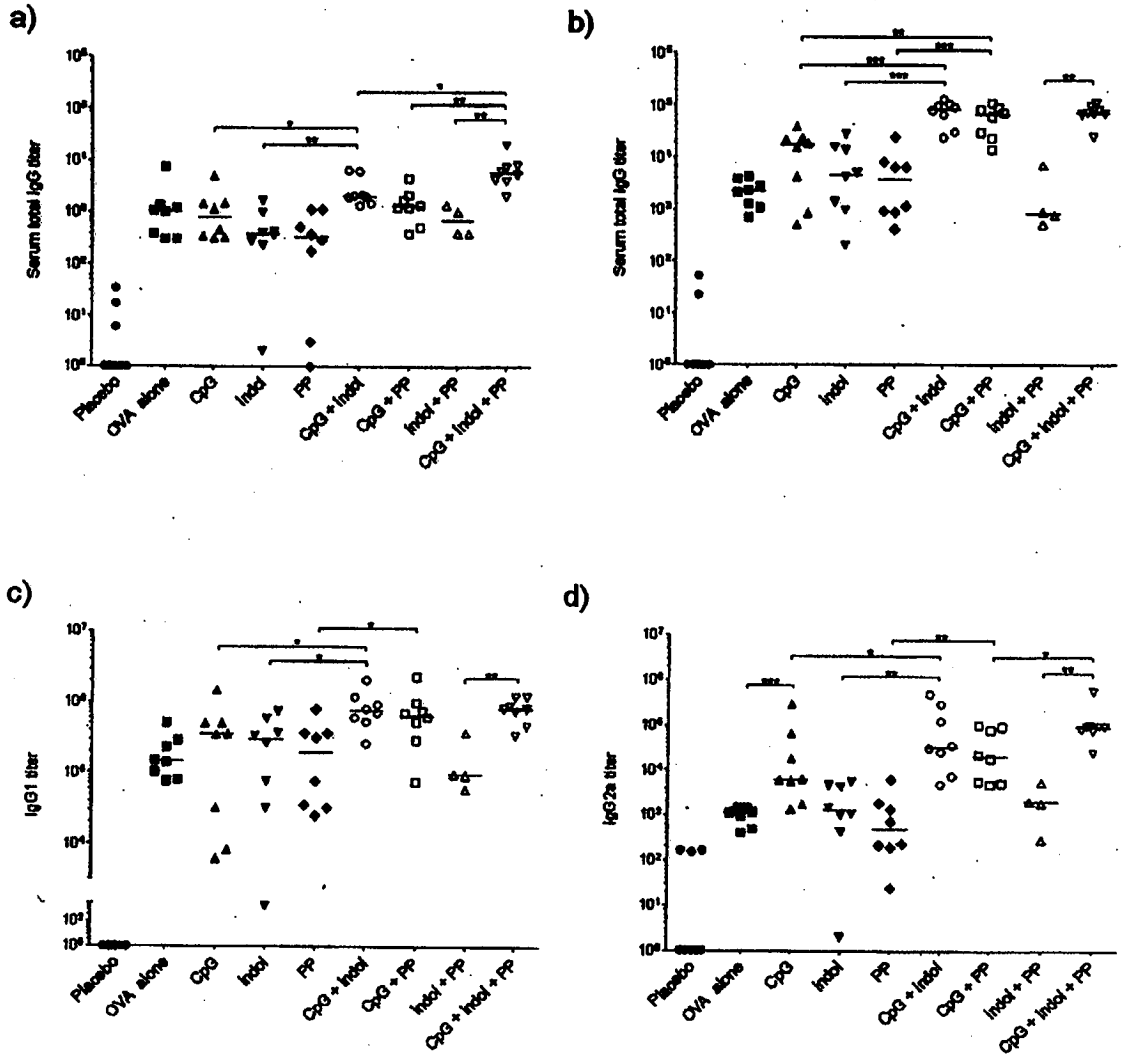

a)
b)
c)
d)
Serum total IgG titer
IgG1 titer
IgG2a titer
Placebo
OVA alone
CpG
Indol
PP
CpG + Indol
CpG + PP
Indol + PP
CpG + Indol + PP

Fig. 5

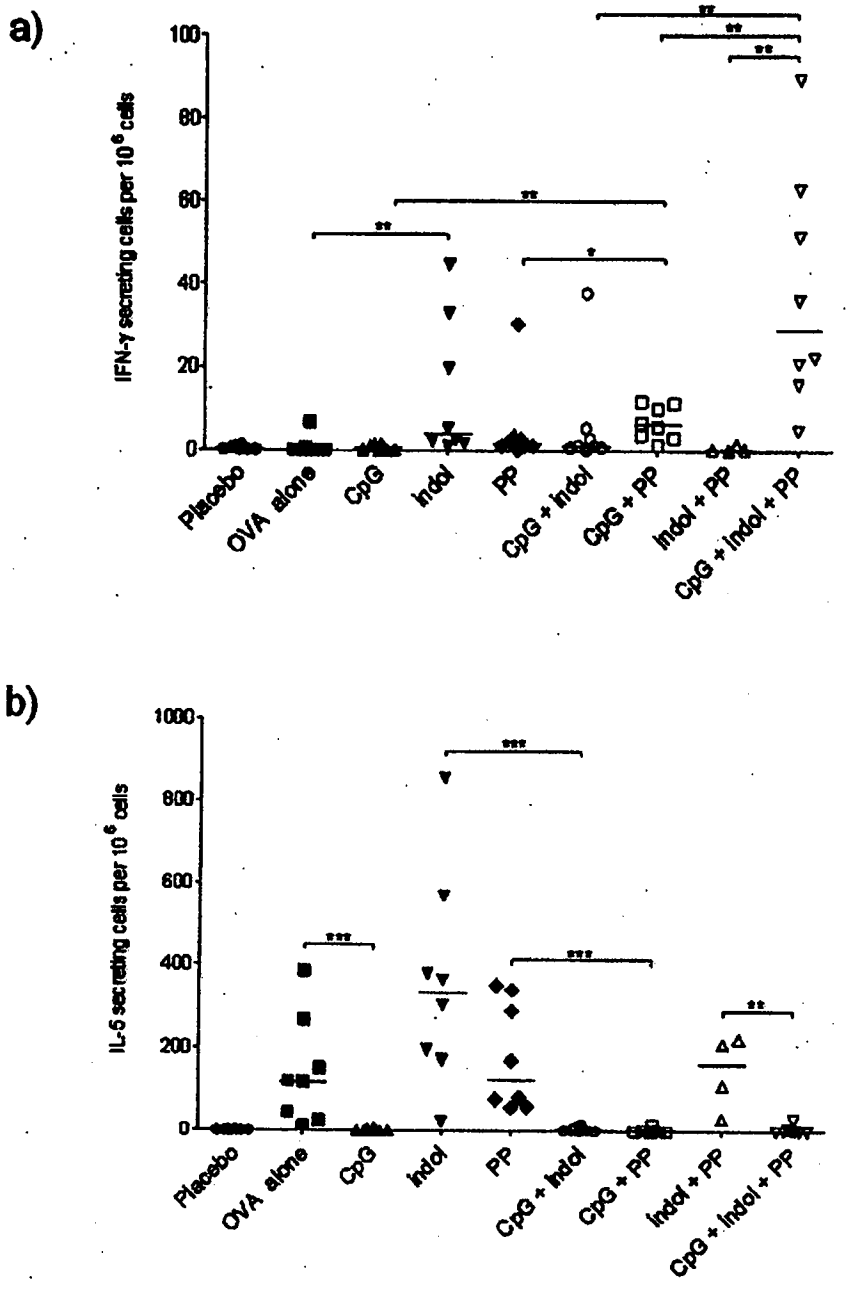

a)
IFN-γ secreting cells per 10^6 cells
100
80
60
40
20
0
**
**
**
**
**
*
Placebo
OVA alone
CpG
Indol
PP
CpG + Indol
CpG + PP
Indol + PP
CpG + Indol + PP
b)
IL-6 secreting cells per 10^6 cells
1000
800
600
400
200
0
***
***
***
**
Placebo
OVA alone
CpG
Indol
PP
CpG + Indol
CpG + PP
Indol + PP
CpG + Indol + PP

Fig. 6

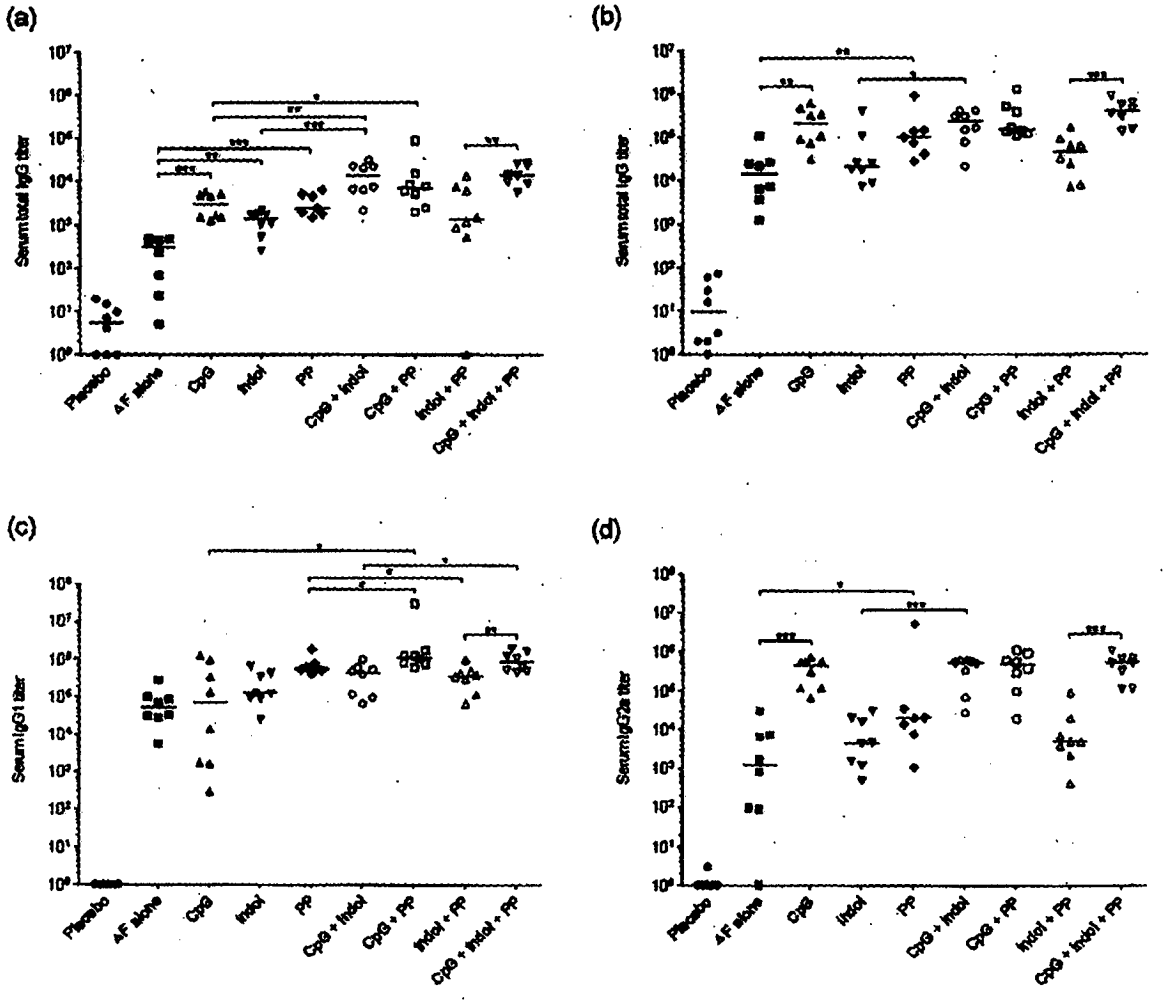

(a)
(b)
(c)
(d)
Placebo
ΔF alone
CpG
Indol
PP
CpG + Indol
CpG + PP
Indol + PP
CpG + Indol + PP

Fig. 7

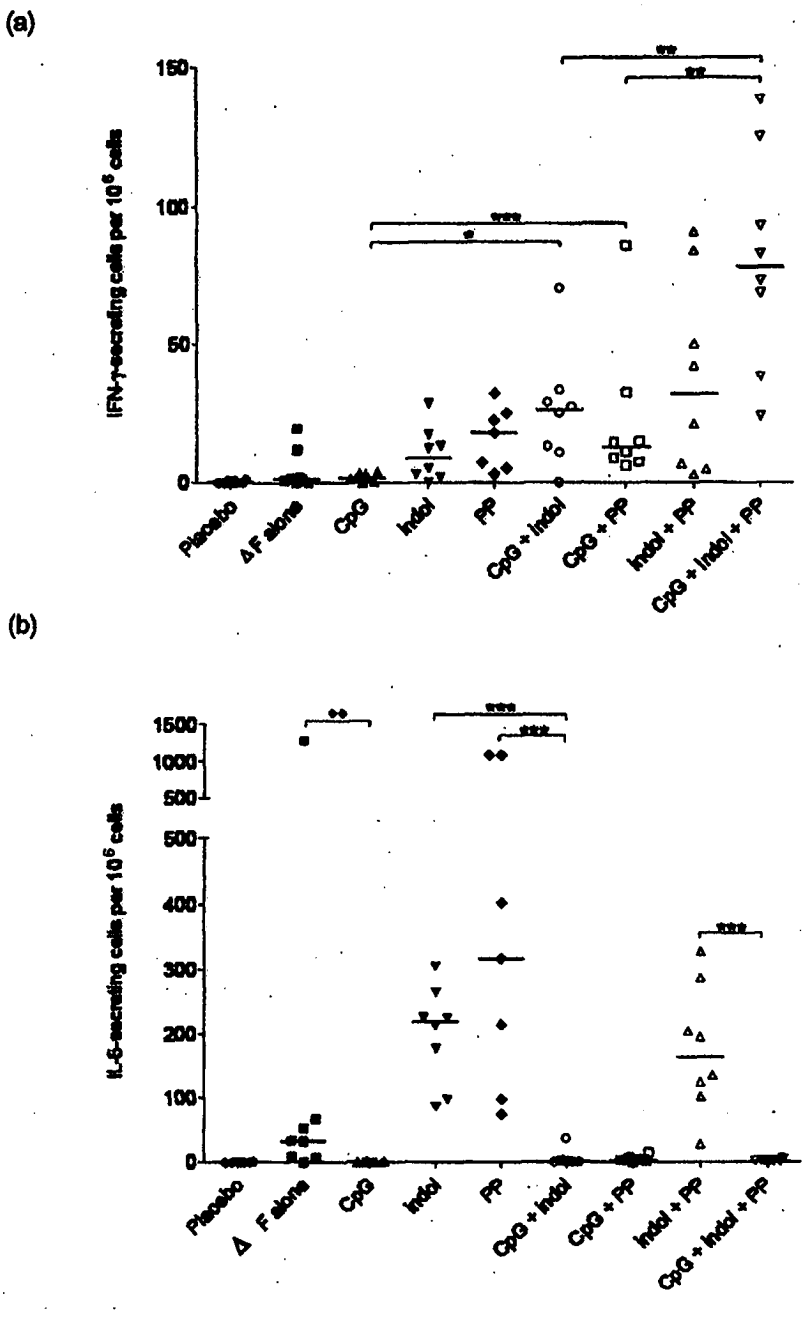

(a)
IFN-γ-secreting cells per 10^6 cells
150
100
50
0
Placebo
Δ F alone
CpG
Indol
PP
CpG + Indol
CpG + PP
Indol + PP
CpG + Indol + PP
(b)
IL-6-secreting cells per 10^6 cells
1500
1000
500
500
400
300
200
100
0
Placebo
Δ F alone
CpG
Indol
PP
CpG + Indol
CpG + PP
Indol + PP
CpG + Indol + PP

Fig. 8

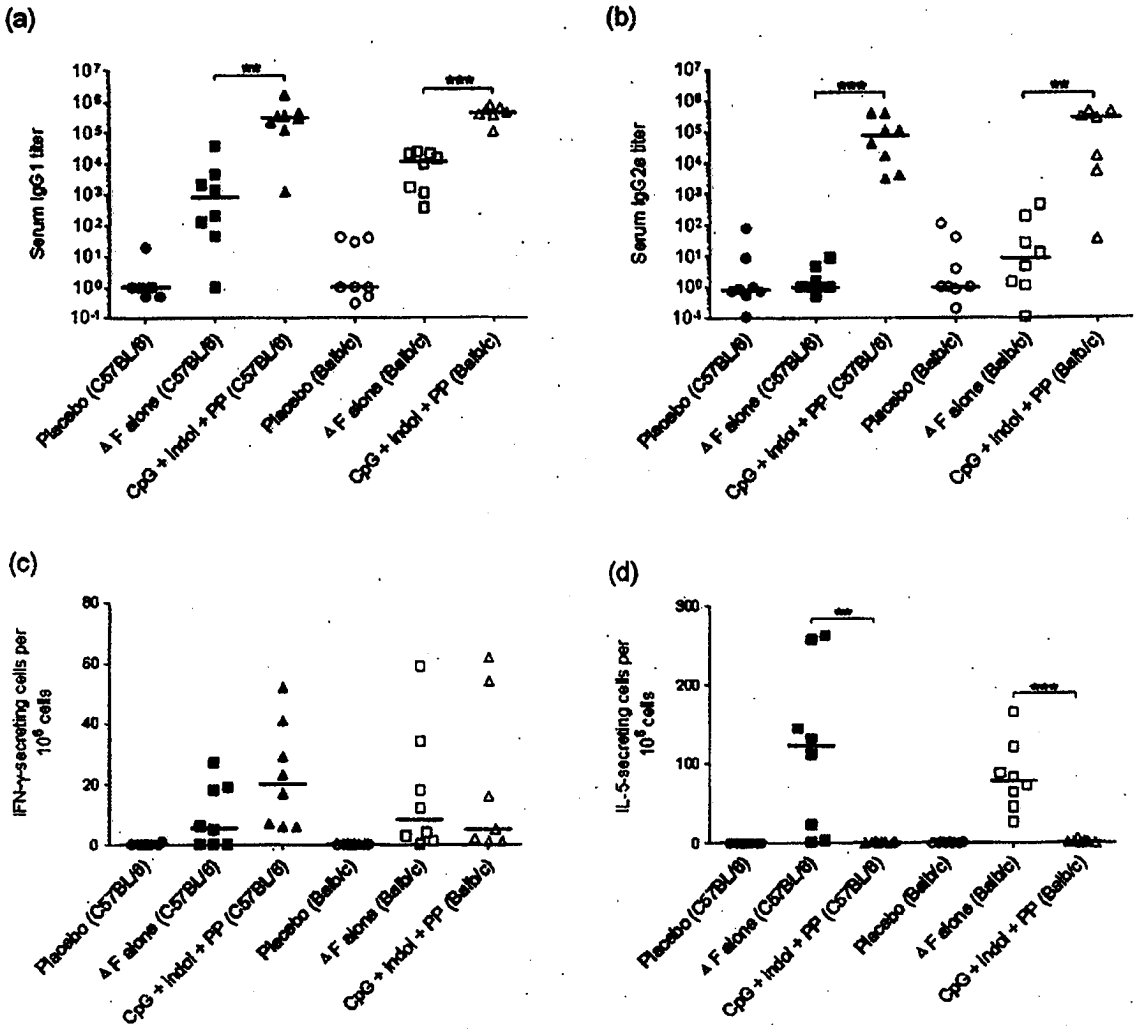

(a)
Serum IgG1 titer
(b)
Serum IgG2a titer
(c)
IFN-γ-secreting cells per 10^6 cells
(d)
IL-5-secreting cells per 10^6 cells
Placebo (C57BL/6)
ΔF alone (C57BL/6)
CpG + Indol + PP (C57BL/6)
Placebo (Balb/c)
ΔF alone (Balb/c)
CpG + Indol + PP (Balb/c)

Fig. 9

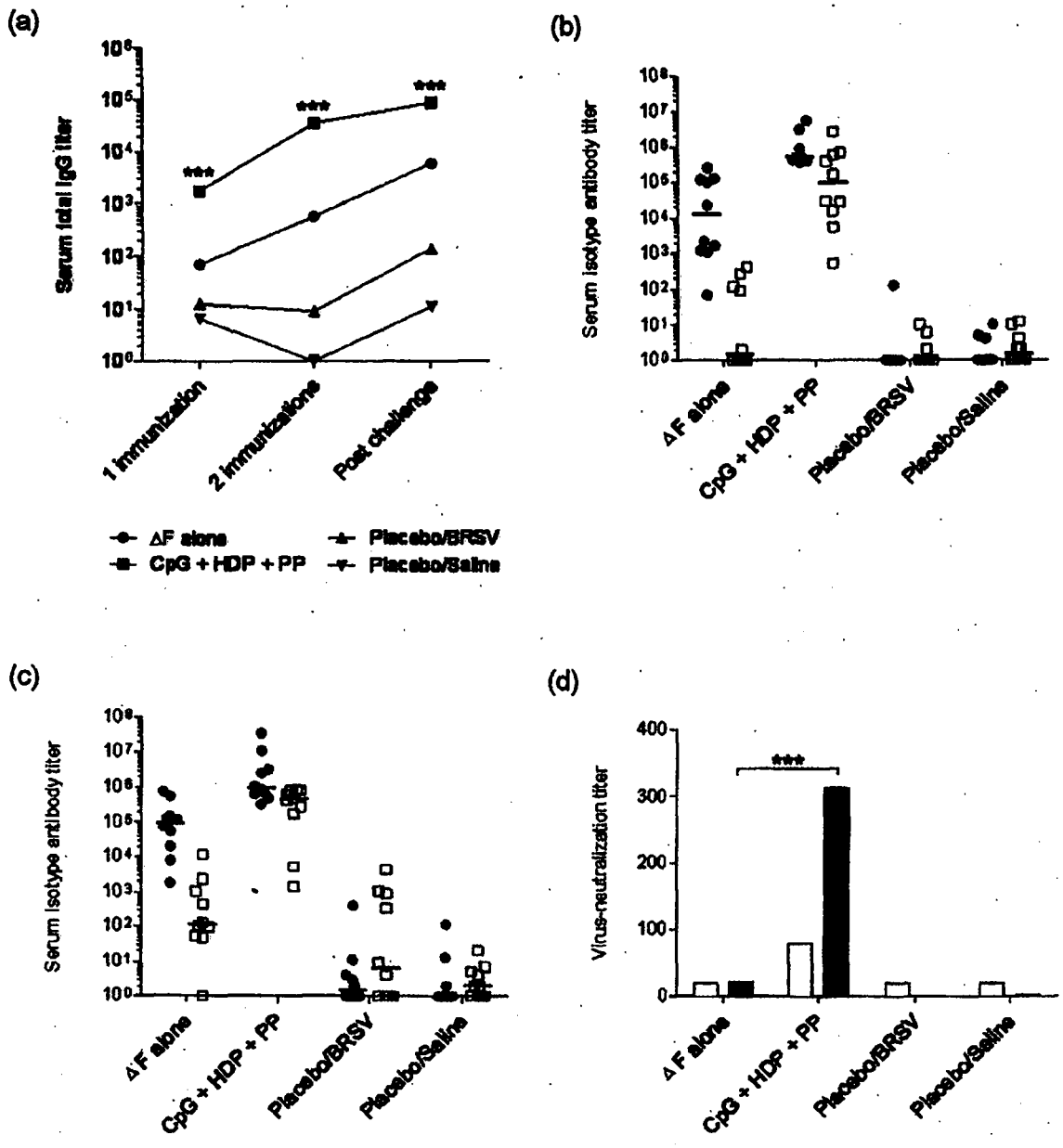

(a)
Serum total IgG titer
1 immunization
2 immunizations
Post challenge
***
ΔF alone
CpG + HDP + PP
Placebo/BRSV
Placebo/Saline
(b)
Serum isotype antibody titer
ΔF alone
CpG + HDP + PP
Placebo/BRSV
Placebo/Saline
(c)
Serum isotype antibody titer
ΔF alone
CpG + HDP + PP
Placebo/BRSV
Placebo/Saline
(d)
Virus-neutralization titer
***
ΔF alone
CpG + HDP + PP
Placebo/BRSV
Placebo/Saline

Fig. 10

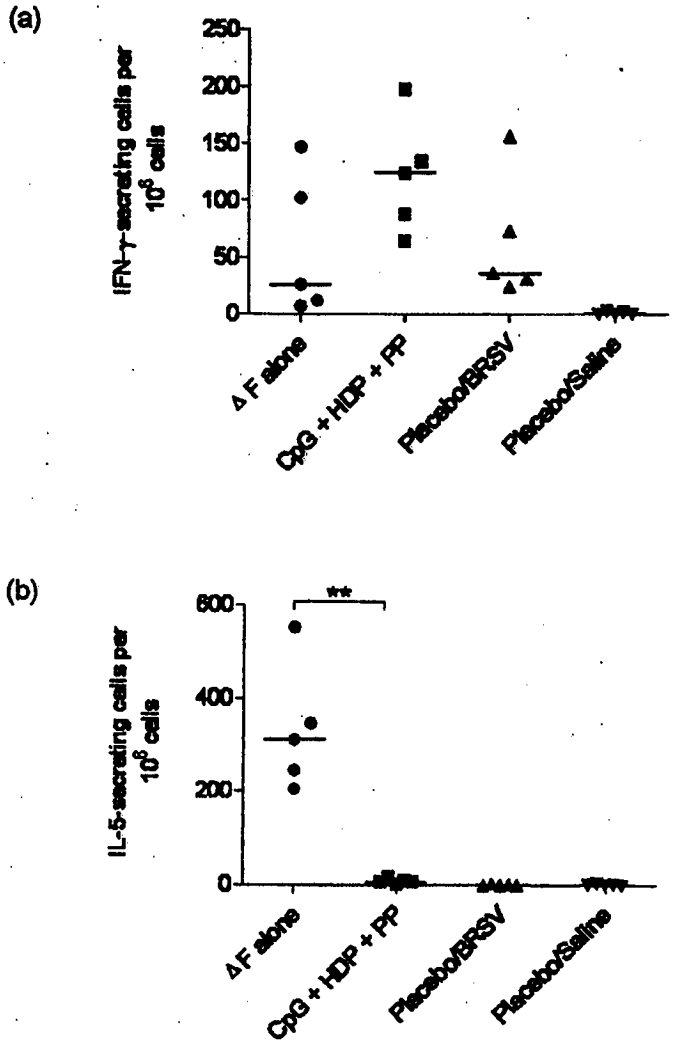
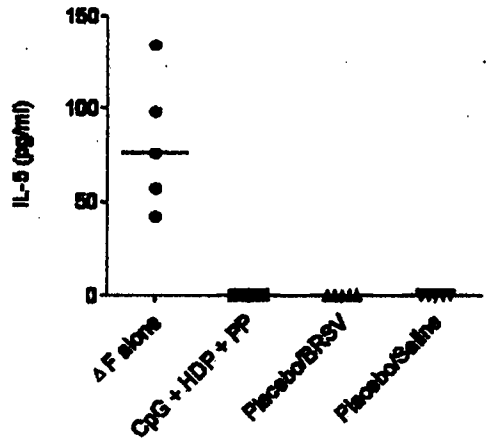
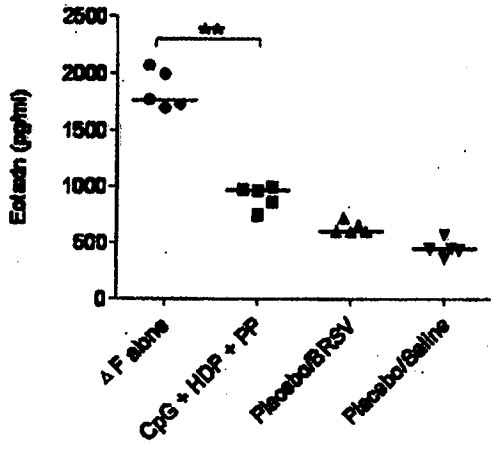

(a)
IFN-γ-secreting cells per 10^6 cells
250
200
150
100
50
0
ΔF alone
CpG + HDP + PP
Placebo/BRSV
Placebo/Saline
(b)
IL-5-secreting cells per 10^6 cells
600
400
200
0
**
ΔF alone
CpG + HDP + PP
Placebo/BRSV
Placebo/Saline

Fig. 11

(a)


IL-5 (pg/ml)
150
100
50
0
ΔF alone
CpG + HDP + PP
Placebo/BRSV
Placebo/Saline

(b)


Eotaxin (pg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
**
ΔF alone
CpG + HDP + PP
Placebo/BRSV
Placebo/Saline

(c)

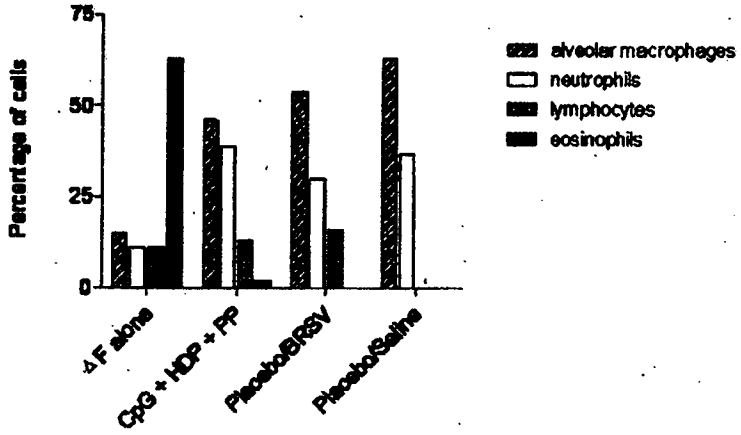

Percentage of cells
75
50
25
0
alveolar macrophages
neutrophils
lymphocytes
eosinophils
ΔF alone
CpG + HDP + PP
Placebo/BRSV
Placebo/Saline

Fig. 12

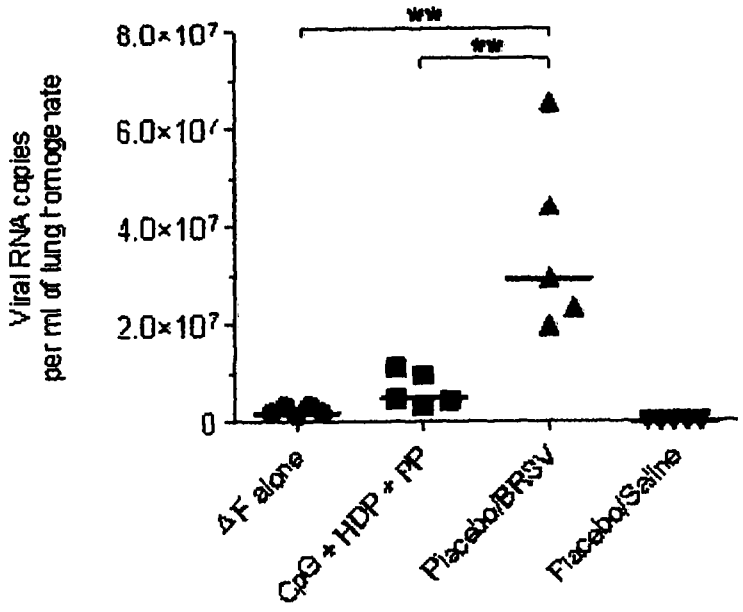
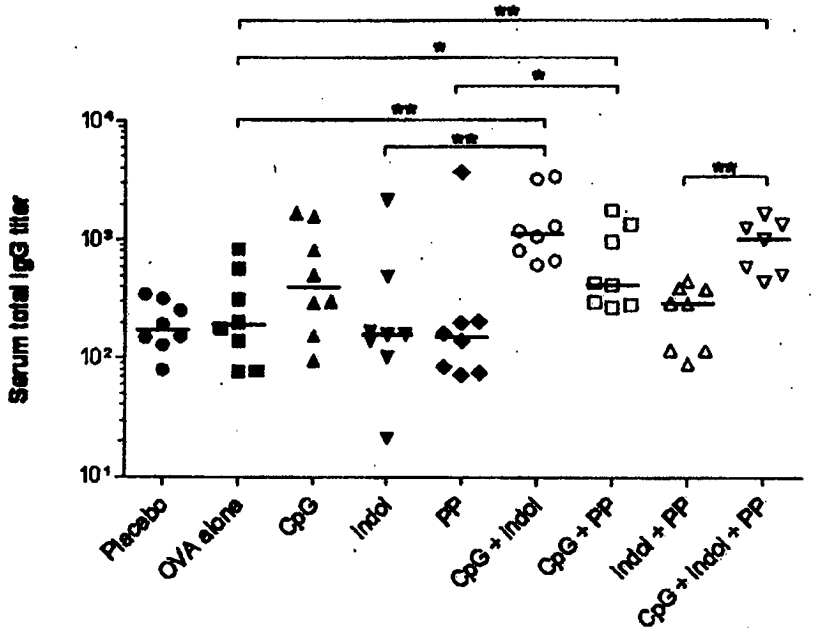

Viral RNA copies per ml of lung homogenate
8.0×10⁷
6.0×10⁷
4.0×10⁷
2.0×10⁷
0
ΔF alone
CpG + HDP + PP
Placebo/BRSV
Placebo/Saline

Fig. 13

a)


Serum total IgG titer
Placebo
OVA alone
CpG
Indol
PP
CpG + Indol
CpG + PP
Indol + PP
CpG + Indol + PP

b)

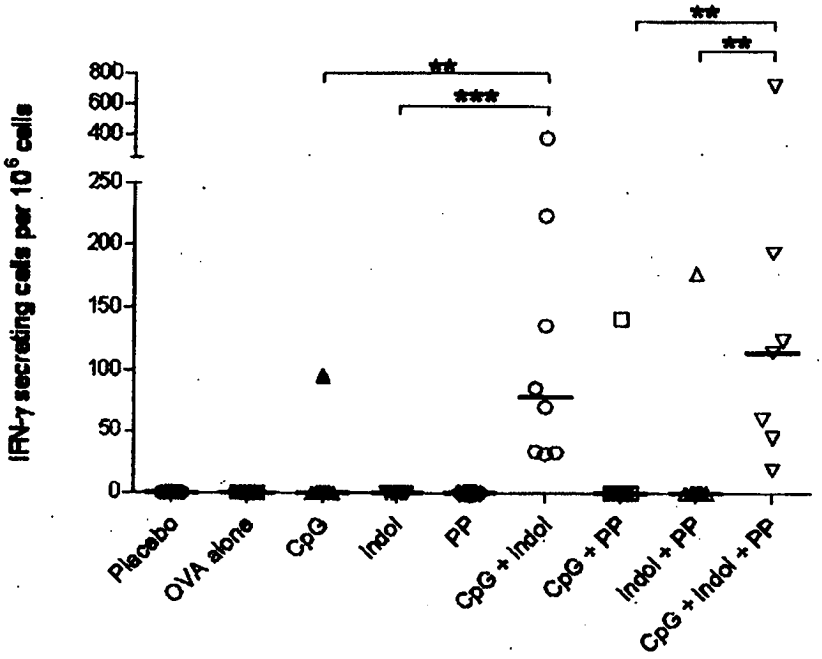
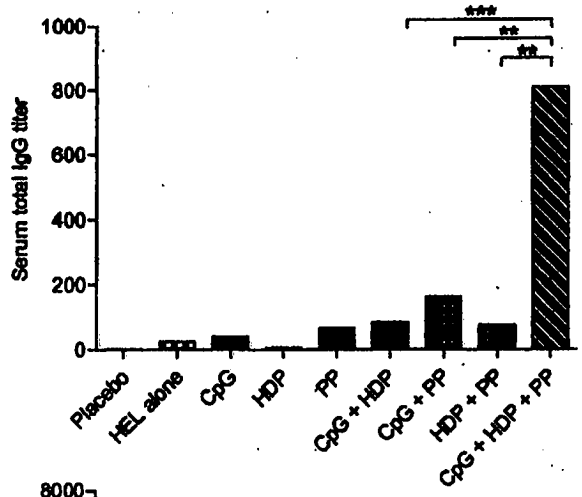
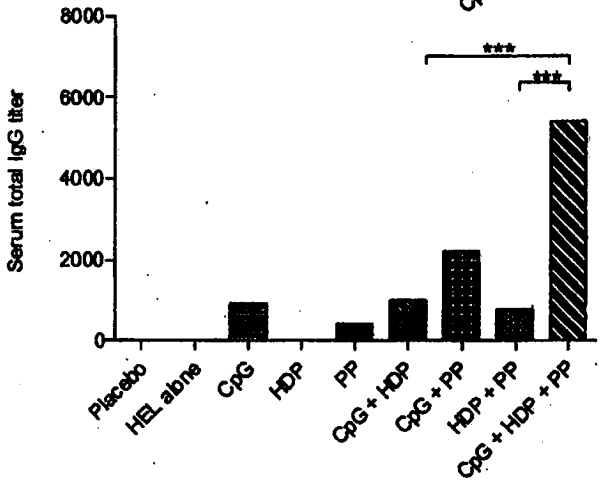

IFN-γ secreting cells per 10^6 cells
Placebo
OVA alone
CpG
Indol
PP
CpG + Indol
CpG + PP
Indol + PP
CpG + Indol + PP

Fig. 14

A


Serum total IgG titer
1000
800
600
400
200
0
***
**
**
Placebo
HEL alone
CpG
HDP
PP
CpG + HDP
CpG + PP
HDP + PP
CpG + HDP + PP

B


Serum total IgG titer
8000
6000
4000
2000
0
***
***
Placebo
HEL alone
CpG
HDP
PP
CpG + HDP
CpG + PP
HDP + PP
CpG + HDP + PP

C

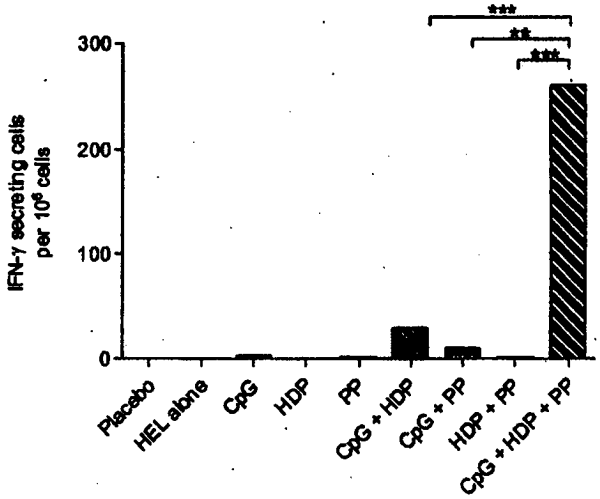

IFN-γ secreting cells per 10^6 cells
300
200
100
0
***
**
***
Placebo
HEL alone
CpG
HDP
PP
CpG + HDP
CpG + PP
HDP + PP
CpG + HDP + PP

Fig. 15

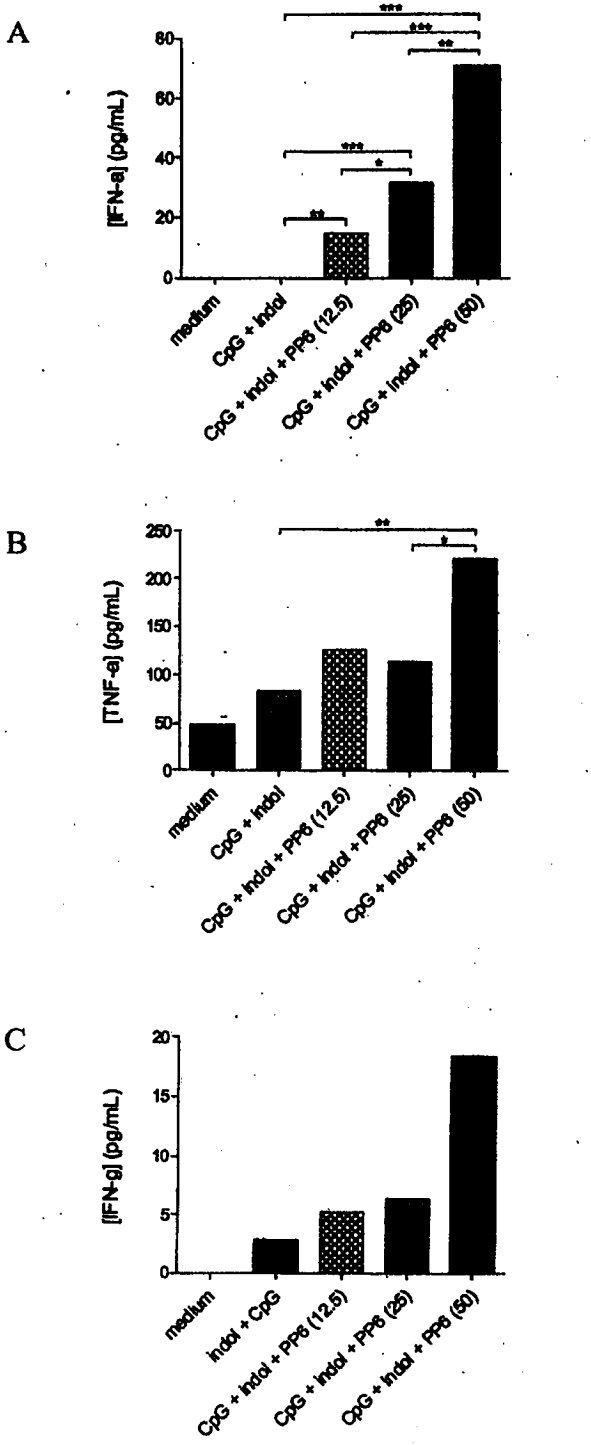

A
[IFN-a] (pg/mL)
0
20
40
60
80
**
***
*
***
***
**
medium
CpG + Indol
CpG + Indol + PP6 (12.5)
CpG + Indol + PP6 (25)
CpG + Indol + PP6 (50)
B
[TNF-a] (pg/mL)
0
50
100
150
200
250
**
*
medium
CpG + Indol
CpG + Indol + PP6 (12.5)
CpG + Indol + PP6 (25)
CpG + Indol + PP6 (50)
C
[IFN-g] (pg/mL)
0
5
10
15
20
medium
Indol + CpG
CpG + Indol + PP6 (12.5)
CpG + Indol + PP6 (25)
CpG + Indol + PP6 (50)

Fig. 16

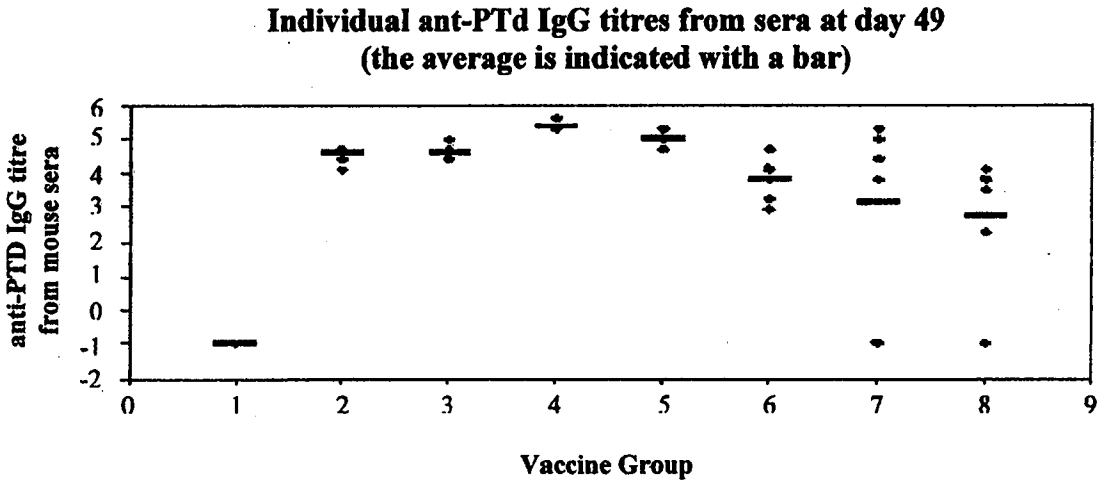

Individual ant-PTd IgG titres from sera at day 49
(the average is indicated with a bar)
anti-PTD IgG titre from mouse sera
6
5
4
3
2
1
0
-1
-2
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Vaccine Group

Fig. 17

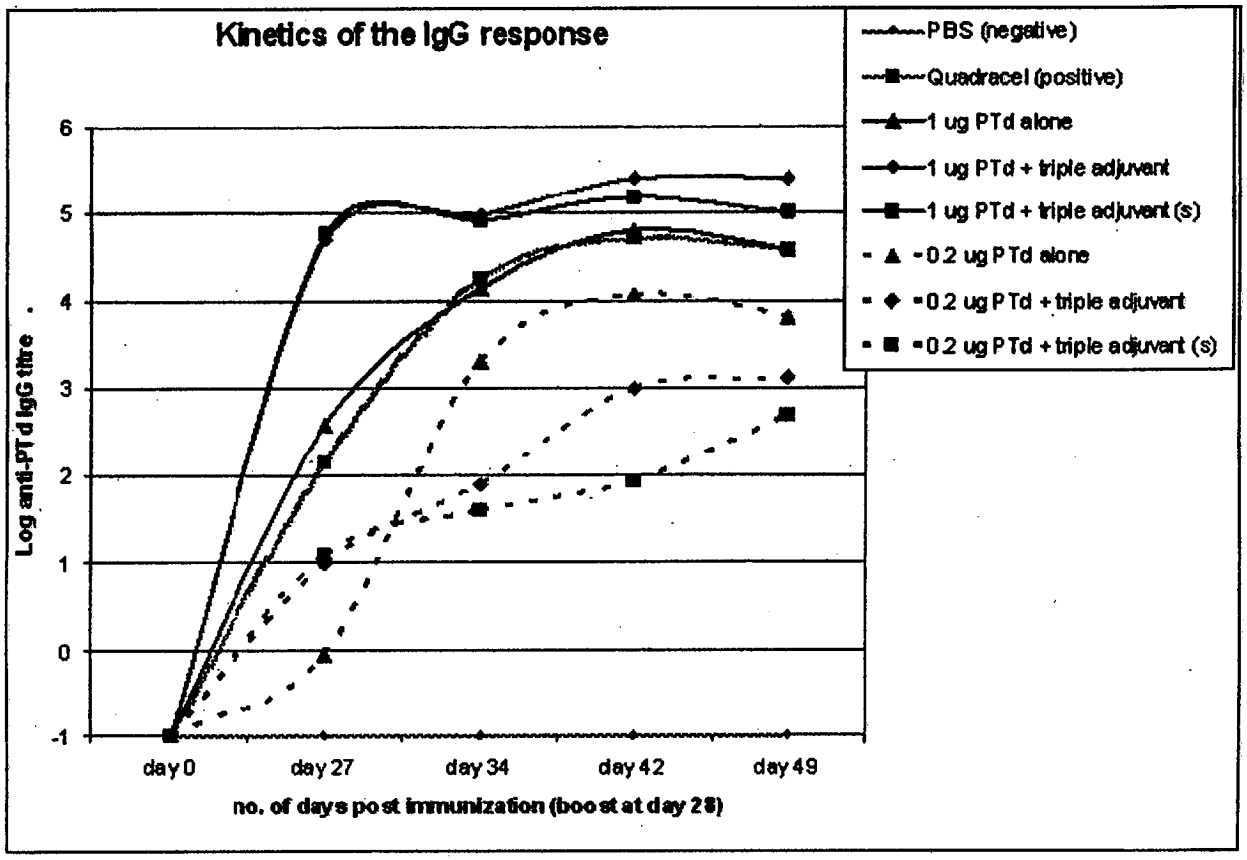

Kinetics of the IgG response
PBS (negative)
Quadracel (positive)
1 ug PTd alone
1 ug PTd + triple adjuvant
1 ug PTd + triple adjuvant (s)
0.2 ug PTd alone
0.2 ug PTd + triple adjuvant
0.2 ug PTd + triple adjuvant (s)
Log anti-PTd IgG titre
6
5
4
3
2
1
0
-1
day 0
day 27
day 34
day 42
day 49
no. of days post immunization (boost at day 28)

Fig. 18

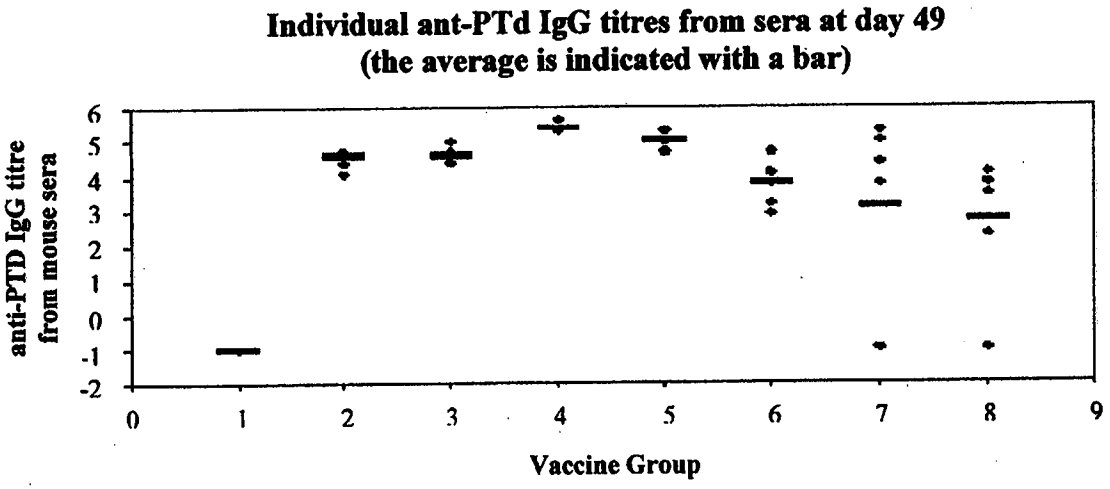

Individual ant-PTd IgG titres from sera at day 49
(the average is indicated with a bar)
anti-PTD IgG titre from mouse sera
6
5
4
3
2
1
0
-1
-2
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Vaccine Group

Fig. 19

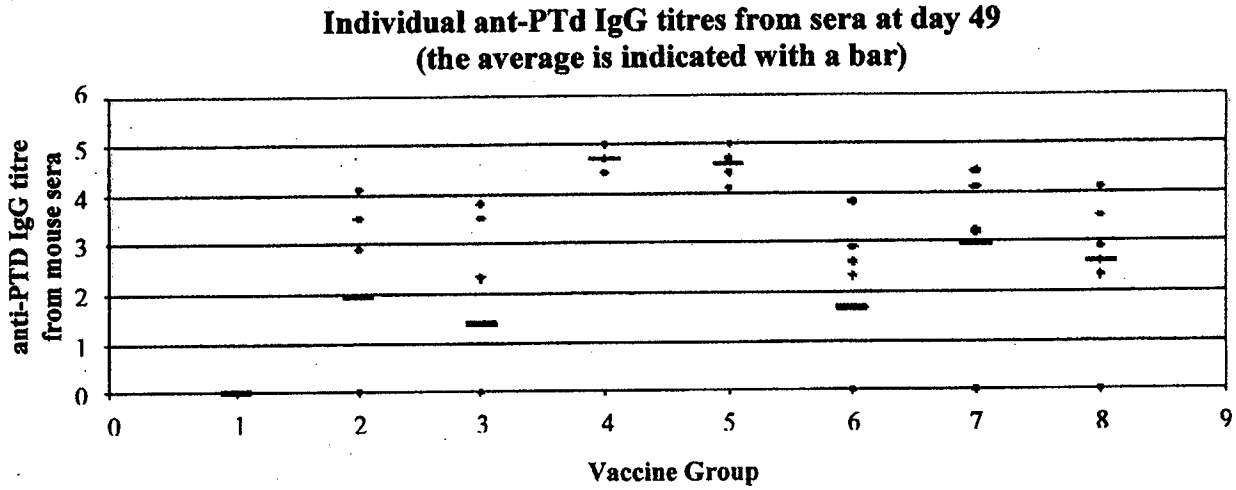

Individual ant-PTd IgG titres from sera at day 49
(the average is indicated with a bar)
anti-PTD IgG titre from mouse sera
6
5
4
3
2
1
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Vaccine Group

Fig. 20

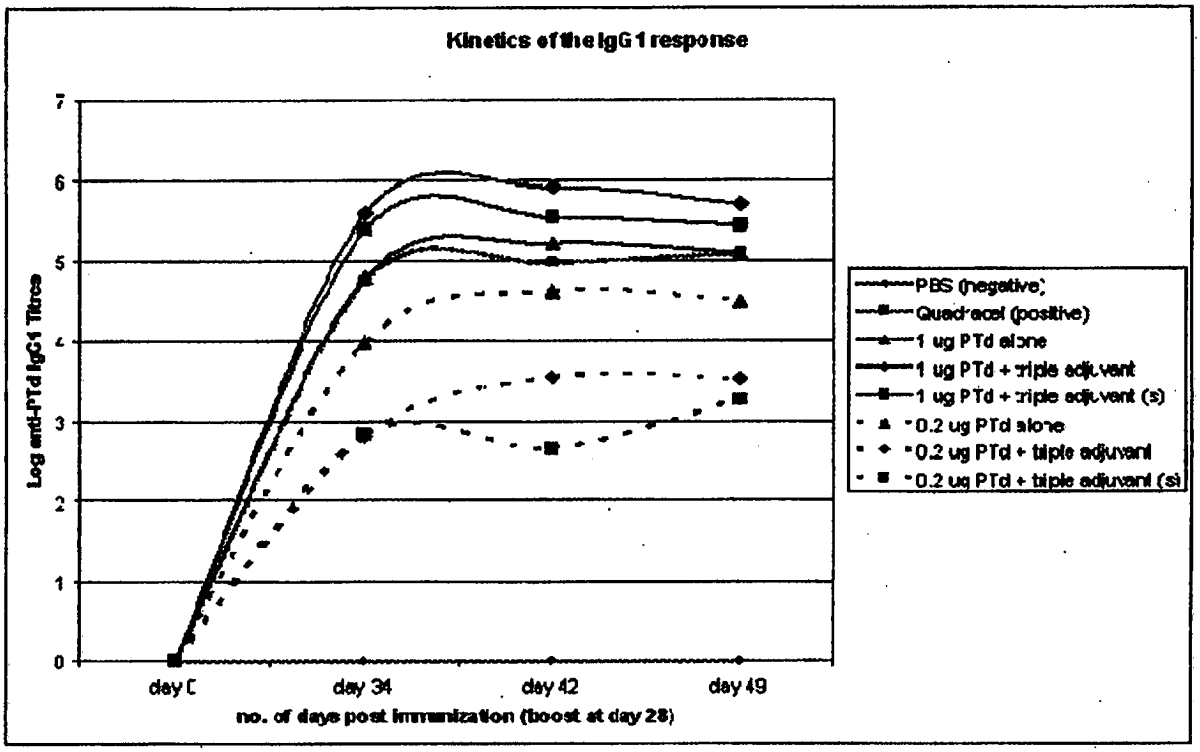

Kinetics of the IgG1 response
Log anti-PTd IgG1 Titre
0
1
2
3
4
5
6
7
day 0
day 34
day 42
day 49
no. of days post immunization (boost at day 28)
PBS (negative)
Quadracel (positive)
1 ug PTd alone
1 ug PTd + triple adjuvant
1 ug PTd + triple adjuvant (s)
0.2 ug PTd alone
0.2 ug PTd + triple adjuvant
0.2 ug PTd + triple adjuvant (s)

Fig. 21

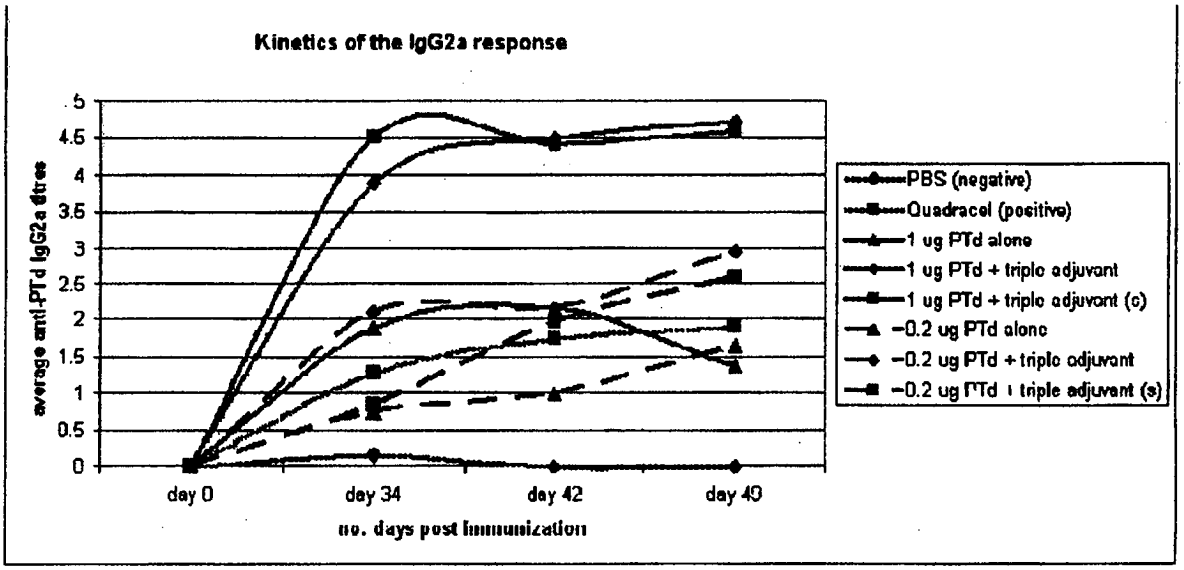

Kinetics of the IgG2a response
average anti-PTd IgG2a titres
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
4.5
5
day 0
day 34
day 42
day 49
no. days post immunization
PBS (negative)
Quadracel (positive)
1 ug PTd alone
1 ug PTd + triple adjuvant
1 ug PTd + triple adjuvant (c)
0.2 ug PTd alone
0.2 ug PTd + triple adjuvant
0.2 ug PTd + triple adjuvant (s)

Fig. 22