

(11) Número de Publicação: **PT 1913957 E**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 39/39** (2007.10) **A61K 48/00** (2007.10)  
**A61K 9/16** (2007.10) **A61P 37/04** (2007.10)

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

(22) Data de pedido: **1999.11.03**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2008.04.23**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.03.17**  
**086/2010**

(73) Titular(es):

**POWDERJECT VACCINES, INC.**  
**235 EAST 42ND STREET NEW YORK, NY 10017-**  
**5755 US**

(72) Inventor(es):

**JOEL R. HAYNES US**  
**GEORG WIDERA US**  
**JAMES T. FULLER US**  
**TIMOTHY SHIPLEY US**  
**DEBORAH FULLER US**

(74) Mandatário:

**MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA**  
**AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA PT**

(54) Epígrafe: **VACINAS GENÉTICAS ADJUVANTES**

(57) Resumo:

**RESUMO****"VACINAS GENÉTICAS ADJUVANTES"**

São descritos reagentes úteis em técnicas de imunização com ácidos nucleicos. Mais particularmente, são descritas composições de vacina genética com adjuvante , assim como métodos de utilização destas composições para induzir uma melhor resposta imunitária contra um antigénio seleccionado.

## **DESCRIÇÃO**

### **"VACINAS GENÉTICAS ADJUVANTES"**

#### Domínio Técnico

A invenção refere-se aos campos gerais de biologia molecular e imunologia, e geralmente refere-se a reagentes úteis em técnicas de imunização com ácidos nucleicos. Mais especificamente, a invenção refere-se a composições de vacinas e métodos para utilização destas composições para induzir uma melhor resposta imunitária contra um抗ígeno seleccionado.

#### Antecedentes da Invenção

Têm sido descritas técnicas para a injecção de ADN e ARNm em tecidos de mamíferos, para efeitos de imunização contra um produto de expressão. Ver, por exemplo, Especificação da Patente Europeia PE 0 500 799 e Patente Norte-americana nº 5,589,466. As técnicas, aqui denominadas "imunização com ácido nucleico" têm demonstrado desencadear respostas imunitárias tanto humorais como mediadas por células. Por exemplo, foi demonstrado que o soro dos ratinhos imunizados com uma construção de ADN codificadora de uma glicoproteína de envelope, gp 160, reagia com uma gp160 recombinante em imunoensaios e que os linfócitos dos ratinhos vacinados proliferavam em resposta à gp120 recombinante. Wang et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4156-4160.

De modo semelhante, os ratinhos imunizados com um gene da hormona do crescimento humano (hGH) apresentaram uma resposta imunitária baseada num anticorpo. Tang et al. (1992) Nature 356: 152-154.

A injecção intramuscular de ADN codificador da nucleoproteína de influenza conduzida por um promotor mamífero tem mostrado desencadear uma resposta de linfócitos T CD8+ citolíticos (CTL) que pode proteger os ratinhos contra desafios letais subsequentes com vírus. Ulmer et al. (1993) Science 259: 1745-1749. Ensaios imuno-histoquímicos do local da injecção revelaram que o ADN foi retomado por mieloblastos e a produção citoplásica da proteína viral pode ser demonstrada durante, pelo menos, 6 meses.

As denominadas "injecções genéticas" mostraram, assim, desencadear uma resposta imunitária em animais tratados, semelhante à observada após administração de vacinas vivas atenuadas, actualmente a forma mais eficaz de vacina a ser utilizada. A eficácia teórica de vacinas baseadas em ácidos nucleicos provém da capacidade das composições da vacina em desencadear uma produção *de novo* de抗原s de proteínas enroladas correctamente, os quais podem resultar no desencadeamento de respostas de anticorpos de reconhecimento de epítopos tridimensionais complexos. Mais ainda, a produção *in vivo* destes抗原s em células apresentadoras de抗原s profissionais resulta na apresentação de fragmentos de peptídeos processados por moléculas MHC de classe I, que resultam na activação e participação de linfócitos T citolíticos específicos de抗原s (CTLs).

Até à data, a técnica de vacinação com ácido nucleico mais eficaz implica a administração de uma composição de vacina de ADN através de transporte intracelular mediado por partículas na epiderme. Ver, por exemplo, Patente Europeia N° 0 500 799. Esta técnica evita os perigos da administração extracelular (por exemplo, através de agulha e seringa na pele ou músculo), uma vez que se pensa que a maior parte do ADN administrado por meio extracelular é rapidamente degradado, sendo necessário que uma quantidade excessiva de ADN seja inoculada apenas para se obter um nível suficiente de expressão do antígeno. Por outro lado, a administração de ADN mediada por partículas na epiderme alcança a deposição intracelular directa de ADNs plasmídicos nas células epidérmicas, incluindo as células epidérmicas de Langerhans . Devido à administração intracelular directa, o ADN é protegido de nucleases extracelulares, sendo apenas necessário administrar quantidades muito pequenas de ADN. Efectivamente, a imunização mediada por partículas com quantidades da ordem dos nanogramas de um determinado ADN plasmídico pode desencadear respostas humorais e de CTL muito fortes, muito frequentemente após uma única administração.

A malária é uma doença generalizada e significativa do ser humano, especialmente em países tropicais. A doença é causada pelos parasitas provenientes de mosquitos, nomeadamente *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*. No entanto, a pesquisa no campo da vacina contra a malária ainda têm de resultar no desenvolvimento de uma vacina profilática segura, prática e eficaz. Embora se tenham obtido inúmeros exemplos de resposta imunitária significativa tanto em modelos animais como em voluntários

humanos por meio da utilização de uma variedade de vacinas experimentais, a protecção efectiva conferida por tais vacinas em ensaios clínicos com seres humanos tem sido desanimadoramente baixa. O conhecimento científico cada vez maior do ciclo de vida do parasita da malária e a identificação de抗énios importantes das várias fases da vida de um parasita tem permitido o desenvolvimento de uma série de estratégias de vacinação concebidas para provocar a formação de anticorpos protectores assim como de células efectoras tais como as CTLs.

O ciclo de doença da malária começa com uma picada de mosquito, através da qual são injectados os esporozoitos infecciosos da malária na corrente sanguínea. Poderia parecer razoável que os anticorpos específicos dos esporozoitos fossem um meio eficaz de prevenção ou de limitação significativa no que respeita à infecção de hepatócitos nesta fase. No entanto, após infecção dos hepatócitos, o parasita desenvolve-se no meio intracelular do hepatócito, podendo escapar-se aos anticorpos circulantes. Nesta fase, a apresentação dos抗énios específicos dos esporozoitos na superfície dos hepatócitos infectados antes dos merozoitos ou da libertação de merozoitos na fase sanguínea, facilita um alvo atractivo para os CTLs específicos da malária. Tais células efectoras poderiam ou eliminar os hepatócitos infectados ou desencadear a destruição de parasitas intracelulares, antes da primeira libertação de merozoitos maduros na fase sanguínea.

#### Resumo da Invenção

O objectivo primário da presente invenção consiste em apresentar composições novas para utilização em procedimentos de vacinas (genéticas) com ácido nucleico. Estas composições combinam moléculas de ácido nucleico que contêm sequências codificadoras de um antigénio de interesse com um adjuvante, em que o adjuvante se encontra presente na composição sob uma forma que não é de ADN, e pressupõem uma administração directa, intracelular da composição - tanto a sequência codificadora do antigénio como o adjuvante não-ADN.

Consequentemente, as presentes composições apresentam um afastamento significativo das composições anteriores da vacina de DNA que podem combinar sequências codificadoras de antigénios com sequências codificadoras de adjuvantes. Além disso, a administração intencional do adjuvante não-DNA numa célula alvo é um contra-senso uma vez que os adjuvantes são conhecidos por funcionar numa base extracelular, por exemplo, formando um depósito extracelular, e é quando essas fracções estão presentes no domínio extracelular que as células imuno-competentes podem encontrar e interagir com o adjuvante para produzir o efeito adjuvante desejado. O componente adjuvante destas novas composições pode ser apresentado sob inúmeras formas diferentes tais como, mas não limitadas a, na forma de uma proteína, de um lípido, de uma hormona não proteica ou respetivo análogo, de uma vitamina ou respetivo análogo, de uma proteína purificada derivada de uma cultura bacteriana (por exemplo, *Bacillus calmette guerin*), de material da parede celular esquelética microbacteriana, de uma saponina ou respetivo derivado, ou semelhante.

Mais ainda, a invenção apresenta uma composição que contém (a) uma molécula de ácido nucleíco que inclui uma sequência codificadora de um抗igénio de interesse; e (b) um adjuvante eficaz na intensificação de pelo menos um componente de uma resposta imune direcionada contra o抗igénio quando expresso nas células de um indivíduo vacinado, em que o adjuvante se encontra presente na composição sob uma forma que não é ADN e em que o ácido nucleíco e o adjuvante são revestidos em partículas transportadoras nucleares separadas, por exemplo em partículas transportadoras balísticas de ouro ou tungsténio. Em concretizações particulares, a molécula de ácido nucleico é apresentada no contexto de uma construção de vector, de preferência um plasmídeo. O抗igénio seleccionado pode ser obtido ou derivado de qualquer agente que se pretenda que desencadeie uma resposta imunitária, podendo, deste modo, ser um agente de doença parasitária ou infecciosa, contra um抗igénio específico de tumor ou抗igénio "self", um alérgeno ou semelhante. Em concretizações particulares, o抗igénio é um抗igénio viral, tal como um抗igénio do vírus da hepatite B (HBV), um vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou um vírus da gripe. Em outras concretizações, o抗igénio deriva de um parasita, tal como de um parasita da malária. O adjuvante seleccionado pode ser qualquer composição adjuvante adequada. Em concretizações particulares, o adjuvante é, pelo menos, parcialmente solúvel em etanol. Os adjuvantes preferidos incluem monofosforil lípido A (MPL) e saponinas tais como Quil-A. Outros adjuvantes preferidos são os denominados adjuvantes da mudança imunitária tal como aqui descrito. Todas estas composições podem ser utilizadas na

produção de um medicamento para utilização em técnicas de imunização com ácido nucleico.

A publicação apresenta igualmente métodos para se utilizarem as composições acima descritas como forma de se obter uma resposta imunitária contra um抗ígenio seleccionado num indivíduo vacinado. Os métodos implicam a administração das composições directamente nas células presentes num local alvo no indivíduo numa quantidade suficiente para se obter a resposta imunitária desejada. Em concretizações particulares, a composição é primeiro revestida numa partícula de suporte nuclear (por exemplo, uma partícula condutora balística de tungsténio ou de ouro) e administrada utilizando uma técnica de transporte transdérmico, tal como, técnica de transporte mediada por partícula. Um tecido alvo preferencial é, deste modo, o tecido epidérmico.

É igualmente objectivo primário da presente invenção apresentar composições novas para utilização em procedimentos com vacinas (genéticas) com ácido nucleico, cujas composições são formadas a partir da combinação de uma molécula de ácido nucleico que contém uma sequência codificadora de um抗ígenio de interesse e um adjuvante de alteração imunitária que é eficaz no desenvolvimento do componente Th1 de uma resposta imunitária desencadeada contra um抗ígenio num indivíduo vacinado. Aqui também o adjuvante de alteração imunitária se encontra na composição numa forma que não é ADN e pretende-se que a composição seja de transporte intracelular e directo. Em concretizações particulares, o抗ígenio provém de um agente parasítico ou infeccioso e/ou adjuvante de mudança imunitária é um lípido A monofosforilo. A composição pode

ser revestida uma partícula de suporte nuclear para proporcionar uma preparação farmacêutica.

É ainda objectivo da presente publicação apresentar um método para desencadear uma resposta imunitária contra um抗ígenio seleccionado num indivíduo (por exemplo, vacina contra um agente de doença infecciosa), que inclua as fases de administração de uma construção genética nas células do indivíduo, construção essa que provoca expressão nas células do indivíduo, de um抗ígenio em níveis suficientes para dar lugar uma resposta imunitária específica do抗ígenio; e co-administrar ao indivíduo próximo da administração da construção genética uma quantidade efectiva de um adjuvante de alteração imunitária suficiente para causar uma mudança no equilíbrio de respostas imunitáreas do tipo Th1 e Th2 desencadeadas no indivíduo vacinado a partir de tal resposta, que seria obtida sem o adjuvante de alteração imunitária. A presente invenção facilita assim a utilização de vacinas genéticas através da utilização de adjuvantes de alteração imunitária que alteram ou redireccionam a resposta imunológica de um indivíduo relativamente a uma vacina genética.

Consequentemente, a invenção apresenta um método de gerar uma resposta imunitária, incluindo: (a) administração de uma composição de vacina genética nas células presentes num local alvo num indivíduo, em que a composição da vacina comprehende um ácido nucleico codificador de um抗ígenio; e (b) co-administração de um adjuvante, em que a composição do adjuvante pode ser administrada no mesmo local ou em local diferente da composição da vacina. A composição do adjuvante pode igualmente ser administrada antes, após ou simultaneamente com a composição da vacina. As composições

do adjuvante e da vacina podem ser administradas numa única composição ou em composições separadas. Numa concretização particular, a composição adjuvante apresenta-se em forma de partículas e é administrada através de uma técnica de administração transdérmica, preferencialmente com utilizando um dispositivo de injecção de pó de seringa sem agulha. Numa concretização relacionada, o adjuvante é administrado utilizando uma técnica de administração mediada por partículas. Para ambas estas concretizações, o local alvo preferencial é o tecido epidérmico. Ainda, numa outra concretização, o adjuvante é administrado por via tópica no local alvo.

É ainda objectivo da presente invenção facultar uma composição de vacina genética eficaz para a malária. A composição inclui uma construção genética codificadora da expressão num indivíduo de um ou mais抗igénios da malária, por exemplo, um抗igénio CS; e uma quantidade efectiva de adjuvante de alteração imunitária suficiente para mudar a natureza da resposta imunitária desencadeada num indivíduo vacinado a partir de uma resposta predominantemente Th2 relativamente a uma resposta Th1.

É, sem dúvida, uma vantagem da presente invenção o facto de poder aumentar a eficácia de composições de vacina genética. Outra vantagem são os métodos e composições aqui apresentados que podem ser utilizados para adaptar especificamente ou alterar a natureza da resposta imunitária gerada utilizando composições de vacina genética.

Estes e outros objectivos, concretizações e vantagens da invenção serão evidentes para quem tiver formação

ordinária na técnica, considerando tudo o que aqui é revelado.

#### Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1 é um histograma que representa os resultados da Experiência 1.

#### Descrição Pormenorizada das Concretizações Preferenciais

Antes de descrever em detalhe a presente invenção, deve entender-se que esta invenção não se limita a formulações de vacinas específicas ou parâmetros processuais uma vez que estes podem, certamente, variar. Deve igualmente entender-se que a terminologia aqui utilizada tem como função descrever apenas concretizações particulares da invenção e não se pretende que esta seja limitada.

Deverá ter-se em microesfera que, tal como utilizado nesta especificação e reivindicações anexas, as formas de singular "um", "uma" e "o" e "a" incluem referências plurais a não ser que o seu conteúdo indique o contrário. Deste modo, por exemplo, a referência a "uma particula" inclui duas ou mais partículas, referência a "um antigénio" ou a "um adjuvante" inclui uma mistura ou uma combinação de dois ou mais desses agentes, referência a "um excipiente" inclui misturas ou combinações de dois ou mais excipientes e assim por diante.

#### A. Definições

Salvo definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos utilizados na presente invenção têm o mesmo significado tal como é entendido por alguém com competência ordinária aos quais esta invenção respeita. Embora uma

série de métodos e materiais similares ou equivalentes aos aqui descritos possa ser utilizada na prática da presente invenção, os materiais e métodos preferenciais são os descritos nesta invenção.

Ao se descrever a presente invenção, serão empregues os seguintes termos, pretendendo-se que os mesmos sejam definidos como abaixo indicado.

Tal como utilizado esta invenção, o termo "administração transdérmico" inclui a administração intradérmico (por exemplo, na derme ou epiderme) e administração transdérmica (por exemplo, "percutânea"), isto é, a administração por meio de passagem de um agente para ou através de, pelo menos, a camada superior da pele. Ver, por exemplo, Transdermal Drug Delivery : Developmental Issues and Research Initiatives, Hadgraft and Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989) ; Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications, Robinson and Lee (eds.), Marcel Dekker Inc., (1987); e Transdermal Delivery of Drugs, Vols. 1-3, Kydonieus and Berner (eds.), CRC Press, (1987).

Um "antigénio" refere-se a qualquer fracção imunogénica ou agente, normalmente uma macro-molécula, a qual pode desencadear uma resposta imunológica num indivíduo. O termo pode ser utilizado para referir uma macro-molécula individual ou uma população homogénea ou heterogénea de macro-moléculas antigénicas. Tal como utilizado nesta invenção, o termo "antigénio" inclui alérgenos. Consequentemente, o termo "antigénio" inclui, de modo geral, fracções que compreendem proteínas, polipeptídeos, fragmentos de proteínas antigénicas, oligossacarídeos,

polissacarídeos, produtos ou composições químicos orgânicos ou inorgânicos e por aí adiante. Para além disso, o antigénio pode derivar ou ser obtido a partir de um vírus, bactéria, parasita, protozoário ou fungo e pode ser um organismo inteiro. Este termo inclui igualmente antigénios tumorais ou os denominados "auto" antigénios que estão envolvidos com doenças auto-imunes. Semelhantemente, um oligonucleótido ou polinucleotídeo que expresse um antigénio, tal como nas aplicações de imunização com ácido nucleico, é também incluído na definição. Os antigénios sintéticos também são aqui incluídos, por exemplo, poliepíopos, epítocos flanqueados e outros antigénios recombinantes ou sinteticamente derivados (Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23: 2777-2781; Bergmann et al. (1996) J. Immunol. 157 : 3242-3249; Suhrbier, A. (1997) Immunol. and Cell Biol. 75: 402-408; Gardner et al. (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, June 28-July 3, 1998).

Os termos "molécula de ácido nucleico" e "polinucleótido" são utilizados alternadamente e referem-se a uma forma polimérica de nucleotidos de qualquer comprimento, sejam deoxiribonucleótidos sejam ribonucleótidos ou semelhantes. Exemplos não limitadores de polinucleótidos incluem um gene, um fragmento de gene, exões e intrões, ARN mensageiro (mRNA), ARN transferente, ARN ribossómico, ribozimas, polinucleótidos de ADN recombinante, polinucleótidos ramificados, plasmídeos, vectores, ADN isolado de qualquer sequência, ARN isolado de qualquer sequência, sondas e ácido nucleico e iniciadores.

Um "gene", tal como utilizado no contexto da presente invenção, é uma sequência de nucleotídos numa molécula de

ácido nucleico (cromossoma, plasmídeo, etc) ao qual é associada uma função genética. Um gene é uma unidade hereditária, por exemplo de um organismo que inclui uma sequência polinucleótida (por exemplo, uma sequência de ADN para os mamíferos) e que ocupa um local físico específico (um "locus de genes" ou "locus genético") dentro do genoma de um organismo. Um gene pode codificar um produto expresso, tal como um polipeptídeo ou um polinucleótido (por exemplo, tARN). Alternativamente, um gene pode definir um local genómico para um evento/função específica, tal como a ligação de proteínas e/ou ácidos nucleicos (por exemplo, locais de ligação de fagos), em que o gene não codifica um produto expresso. Normalmente, um gene inclui sequências codificadoras, tais como sequências codificadoras de polipeptídeos, e sequências não codificadoras, tais como sequências promotoras, sequências de poliadenalinação, sequências reguladoras de transcrições (por exemplo, sequências intensificadoras). Muitos genes eucarióticos têm "exões" (sequências codificadoras) interrompidas por "intrões" (sequências não codificadoras). Em certos casos, um gene pode partilhar sequências com um outro(s) gene(s) (por exemplo, sobreposição de genes).

Uma "sequência codificadora" ou uma sequência que "codifica" um polipetídeo seleccionado, é uma molécula de ácido nucleico que é transcrito (no caso do ADN) e traduzido (no caso do ARNm) num polipetídeo *in vivo* quando colocado sob o controlo de sequências reguladoras apropriadas (ou "elementos de controlo"). O termo inclui um gene. Os limites da sequência codificadora são determinados por um codão iniciador no terminal (amino) 5' e um codão

terminal de tradução no terminal (carboxilo) 3'. Uma sequência codificadora pode incluir, mas não se limitando a, ADNc de ARNm viral, procariótico ou eucariótico, sequências genómicas de ADN de ADN viral ou procariótico e até sequências sintéticas de ADN. Uma sequência terminal de transcrição pode ser localizada no terminal 3' da sequência codificadora. A transcrição e tradução de sequências codificadoras são tipicamente reguladas por "elementos de controlo", mas não limitadas a, promotores de transcrição, elementos intensificadores de transcrição, sinais terminais de transcrição, sequências poliadenilação (localizadas no terminal 3' do codão terminal de tradução), sequências de optimização para iniciação da tradução (localizadas no terminal 5' da sequência codificadora), e sequências terminais de tradução.

Um "vector" é qualquer fracção capaz de transferir moléculas de ácido nucleico (por exemplo, sequências polinucleótidas ou genéticas) para células alvo (por exemplo, vectores virais, vectores não-virais, suportes de partículas e lipossomas). Normalmente, uma "construção de vector", "vector de expressão" e "vector de transferência de genes" significa qualquer construção de ácido nucleico capaz de direcccionar a expressão de um gene de interesse e com capacidade de transferir sequências de genes para células alvo. Deste modo, o termo inclui veículos de clonagem e de expressão, assim como vectores virais.

"Ligada operacionalmente" refere-se a uma disposição de elementos em que os componentes descritos são configurados de modo a poderem desempenhar as suas funções normais. Deste modo, um determinado promotor que se encontra ligado operacionalmente a uma sequência codificadora (por exemplo,

a uma sequência codificadora de um antigénio de interesse) tem capacidade de realizar a expressão da sequência codificadora na presença de proteínas reguladoras e enzimas adequadas. Em alguns casos, existem alguns elementos de controlo que não necessitam ser contíguos às sequências codificadoras, desde que funcionem de modo a direcionar a expressão das mesmas. Por exemplo, podem encontrar-se sequências intervenientes não traduzidas mas já transcritas entre a sequência promotora e a sequência codificadora e a sequência promotora pode ainda ser considerada "ligada operacionalmente" à sequência codificadora.

O termo "recombinante", tal como utilizado nesta invenção para descrever uma molécula de ácido nucleico significa um polinucleótido de origem genómica, ADNc, semi-sintética ou sintética, a qual, devido à sua natureza ou manipulação: (1) não se encontra associada a todas ou a uma porção do polinucleótido com o qual se encontra associada; e/ou (2) se encontra ligada a um polinucleótido que não o polinucleótido a que se encontra ligada por natureza. O termo "recombinante" tal como utilizado relativamente a uma proteína ou polipeptídeo, significa um polipeptídeo produzido por expressão de um polinucleótido recombinante.

As técnicas para determinar a "identidade de sequências" de ácido nucleico e de aminoácidos são bem conhecidas na arte. Normalmente, estas técnicas incluem determinar a sequência nucleotídica do ARNm para um gene e/ou determinar a sequência de aminoácidos codificada deste modo e a comparação destas sequências com uma segunda sequência nucleotídica ou de aminoácidos. Normalmente, "identidade" refere-se a uma correspondência exacta de nucleótido por nucleótido ou aminoácido para aminoácido de duas sequências

de polinucleótidos ou poplipeptídeos. Duas ou mais sequências (polinucleótidos ou aminoácidos) podem ser comparadas determinando-se a sua "percentagem de identidade". A percentagem de identidade de duas sequências, sejam estas sequências de ácidos nucleicos ou de aminoácidos, é o número de correspondências exactas existentes entre duas sequências alinhadas, dividido pelo comprimento das sequências menores e multiplicado por 100. Um alinhamento aproximado para sequências de ácidos nucleicos é providenciado pelo algoritmo de homologia local de Smiths and Waterman (1981) Advances in Applied Mathematics (Avanços em Matemáticas Aplicadas) 2: 482-489 Este algoritmo pode ser aplicado a sequências de aminoácidos utilizando a matriz de classificação desenvolvida por Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M. O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C., USA e normalizada por Gribskov (1986) Nucl. Acids Res. 14 (6): 6745-6763. Uma implementação exemplar deste algoritmo para determinar a percentagem de identidade de uma sequência é apresentada pelo Genetics Computer Group (Madison, WI) na aplicação utilitária "BestFit". Os parâmetros por defeito para este método são descritos na *Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual*, Versão 8 (1995) (disponível em Genetics Computer Group, Madison, WI). Um dos métodos preferidos para estabelecer a percentagem de identidade no contexto da presente invenção consiste em utilizar o conjunto de programas MPSRCH publicado pela Universidade de Edimburgo, desenvolvido por John F. e Shane S. Sturrok, e distribuído por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). Considerando estas disposições, o

algoritmo de Smith-Waterman pode ser empregue no qual os parâmetros por defeito são utilizados para a tabela de classificação (por exemplo, penalização de intervalo aberto de 12, penalização de extensão de intervalo de um e um intervalo de seis). A partir dos dados obtidos, o valor "Match" reflecte a "identidade da sequência". Outros programas adequados para calcular a percentagem de identidade ou semelhança entre sequências são normalmente conhecidos na técnica. Por exemplo, outro parâmetro de alinhamento é o BLAST, utilizado com parâmetros por defeito. Por exemplo, o BLASTN e o BLASTP podem ser utilizados utilizando os seguintes parâmetros: genetic code = standard; filter = none; strand = both; cutoff = 60; expect = 10; Matrix = BLOSUM62 ; Descriptions = 50 sequences; sort by = HIGH SCORE; Databases = non-redundant, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR. Os pormenores relativos a estes programas podem ser encontrados no endereço de internet seguinte: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

Alternativamente, a homologia pode ser determinada por hibridação de polinucleótidos em condições que formam um duplo estável entre regiões homólogas, seguindo-se a digestão com nuclease(s) específica(s) de cadeia simples e com determinação do tamanho dos fragmentos digeridos. Duas sequências de DNA ou duas sequências de polipeptídeos são "substantialmente homólogas" reciprocamente quando as sequências apresentam, pelo menos, cerca de 80% a 85%, preferencialmente pelo menos cerca de 90% e ainda mais preferencialmente cerca de 95% a 98% de identidade de sequência ao longo de um comprimento definido de moléculas,

tal como determinado utilizando os métodos acima indicados. Tal como utilizado na presente invenção, substancialmente homólogas refere-se igualmente a sequências que apresentam uma identidade completa relativamente à sequência de ADN ou de polipeptídeos.

As sequências de ADN que são substancialmente homólogas podem ser identificadas numa experiência de hibridação de Southern sob, por exemplo, condições rigorosas, tal como definido para esse sistema particular. Por exemplo, condições de hibridação rigorosas podem incluir 50% de formamida, 5 x Solução de Denhardt, 5 x SSC, 0,1% SDS e 100 tg/ml de ADN de esperma de salmão desnaturado e as condições de lavagem incluem 2x SSC, 0,1% SDS a 37 °C, seguidas de 1x SSC, 0,1% SDS a 68 °C. A definição das condições de hibridação apropriadas é abrangida pela própria técnica.

O termo "composição de vacina" pressupõe qualquer composição farmacêutica que contenha um抗igénio (particularmente, tal como aqui utilizado, o termo refere-se a uma composição que contém uma molécula de ácido nucleico com uma sequência que codifica um抗igénio), composição essa que pode ser utilizada para prevenir ou tratar uma doença ou condição num indivíduo.

As composições de vacinas podem igualmente conter um ou mais adjuvantes. Normalmente, uma composição de vacina é utilizada como profilaxia numa doença causada por um agente patogénico, no entanto, as composições de vacina da presente invenção podem também ser utilizadas num contexto terapêutico.

Uma "resposta imunológica" ou "resposta imunitária" contra um agente seleccionado, antigénio ou uma composição de interesse é o desenvolvimento, num indivíduo, de uma resposta imune humoral e/ou celular às moléculas (por exemplo, um antigénio) presentes no agente ou na composição de interesse. Para efeitos da presente invenção, uma "resposta imunitária humoral" refere-se a uma resposta imunitária mediada por moléculas de anticorpos, enquanto uma "resposta imunitária celular" é uma resposta mediada por linfócitos T e/ou outros glóbulos brancos.

Pressupõe-se que as respostas imunitárias dos mamíferos envolvam uma cascata imunitária conforme uma de duas categorias gerais de resposta, caracterizadas pela classe da célula auxiliar T que inicia a cascata. Deste modo, uma resposta imunitária a um antigénio específico pode ser caracterizada como uma resposta de tipo auxiliar T 1(Th1) ou tipo auxiliar T 2(Th2), dependendo dos tipos de citoquinas que são libertadas dos linfócitos T específicos do antigénio a seguir à apresentação dos antigénios. As respostas imunitárias Th1 são normalmente caracterizadas pela libertação de citoquinas inflamatórias, tais como IL-2, gama-interferão (IFN- $\gamma$ ) e o factor alfa de necrose do tumor (TNF- $\alpha$ ) das células auxiliares T estimuladas pelo antigénio. As respostas Th1 encontram-se igualmente associadas a uma forte imunidade celular (por exemplo, CTLs) e à produção de subclasses de anticorpos IgG que possuem uma actividade de opsonização e de fixação complementar, tal como actividade de fixação do complemento, tal como IgG2a no modelo de ratinho vulgarmente utilizado. Por outro lado, as respostas imunes Th2 são caracterizadas pela libertação de citoquinas não

inflamatórias, tais como IL-4 e IL-10, a seguir à simulação de células auxiliares T específicas de um抗igénio. Normalmente, as respostas Th2 não favorecem a actividade CTL máxima, mas estão associadas a fortes respostas a anticorpos, representando subclasses IgG tais como a IgGI no rato, classes de anticorpos com ausência de actividade de opsonização e de fixação complementar. De modo geral, os níveis de anticorpos associados às respostas Th2 são consideravelmente mais fortes do que os associados a respostas Th1.

O termo "adjuvante" pressupõe qualquer material ou composição com capacidade de alterar especificamente ou não especificamente, intensificar, direcccionar, redirecccionar, potenciar ou iniciar uma resposta imunitária específica de um抗igénio. Deste modo, a co-administração de um adjuvante e um抗igénio (por exemplo, como uma composição de vacina) pode dar lugar a uma dose inferior ou menos doses de um抗igénio necessárias para alcançar uma resposta imunitária desejada no indivíduo ao qual é administrado o抗igénio. Em determinadas concretizações da invenção, a co-administração de um adjuvante com um ácido nucleico codificador de um抗igénio pode redirecccionar a resposta imunitária contra o抗igénio. Por exemplo, onde a resposta imunitária é redirecccionada de uma resposta imunitária do tipo Th2 para uma do tipo Th1 e vice versa. A eficácia de um adjuvante pode ser determinada pela administração do adjuvante com uma composição de vacina e controlos de composição de vacina nos animais e pela comparação dos títulos dos anticorpos e/ou imunidade mediada por células contra os dois ensaios modelo utilizados, tais como rádio-imunoensaios, ensaio ELISAs,

ensaio CTL e por aí adiante. Normalmente, numa composição de vacina, o adjuvante é uma fracção separada do antigénio, embora uma molécula única possa ter características de adjuvantes e de antigénios (por exemplo, toxina da cólera). Para os efeitos da presente invenção, um adjuvante é utilizado para intensificar a resposta imunitária relativamente a um antigénio específico, por exemplo, quando um adjuvante é co-administrado com uma composição de vacina, a resposta imunitária resultante é maior do que a resposta imunitária provocada por uma quantidade equivalente da composição de vacina administrada sem o adjuvante, ou o adjuvante é utilizado para redireccionar a natureza da resposta imunitária.

Além disso, para efeitos da presente invenção, uma "quantidade eficaz" de um adjuvante será a quantidade que intensifica uma resposta imunológica relativamente a um antigénio co-administrado numa composição de vacina de tal forma que são requeridas doses mais baixas e menores para gerar uma resposta imunitária eficiente, ou uma "quantidade eficaz" de um adjuvante será a quantidade suficiente para dar lugar a uma mudança ou redireccionamento da resposta imunitária relativamente à resposta imunitária do antigénio isolado. Uma "composição adjuvante" pressupõe qualquer composição farmacêutica que contenha um adjuvante.

Um "adjuvante de alteração imunitária" é um adjuvante que é eficaz para alterar ou direcccionar (redireccionar) a natureza de uma resposta imunitária contra um antigénio seleccionado que recebe tanto o antigénio como o adjuvante de alteração imunitária. A alteração ou redireccionamento tem a ver com a natureza da resposta imunitária que é direcccionada contra o antigénio na ausência do adjuvante de

alteração imunitária. Deste modo, estes adjuvantes são aqui utilizados para mudar a natureza de uma resposta imunitária desencadeada contra um抗igénio seleccionado (um抗igénio codificado por uma sequência de ácido nucleico presente numa composição de vacina genética) para favorecer uma resposta do tipo Th1 em vez de uma resposta do tipo Th2, ou para favorecer uma resposta do tipo Th2 em vez de uma resposta do tipo Th1. Na presente invenção pode ser utilizado um número de adjuvantes conhecidos como adjuvante de alteração imunitária, não se limitando a um adjuvante lípido A monofosforilo (MPL). A capacidade de um adjuvante servir como um adjuvante de alteração imunitária pode ser determinada pela avaliação da natureza de respostas imunitárias criadas pela administração composição de vacina sozinha e administração da composição de vacina com o adjuvante. Esta avaliação pode envolver a caracterização ou identificação dos tipos de citoquinas que são libertadas por linfócitos T específicos do抗igénio a seguir à apresentação do抗igénio num indivíduo e/ou caracterização ou identificação das subclasses IgG predominantes que são desencadeadas por uma combinação抗igénio/adjuvante relativamente ao抗igénio sozinho. Todas estas caracterizações ou identificações são bem conhecidas dealguém com competência ordinária na técnica, tal como dirigido nesta especificação.

Tal como utilizado nesta invenção, o termo "co-administrado", tal como quando um adjuvante é "co-administrado" com um ácido nucleico codificador de um抗igénio (por exemplo, composição de vacina), implica uma administração simultânea ou concorrente de adjuvante e抗igénio, por exemplo, quando ambos estão presentes na

mesma composição ou são administrados em composições separadas quase ao mesmo tempo mas em locais diferentes, assim como o transporte de adjuvante e antigénio em composições separadas em momentos diferentes. Por exemplo, a composição adjuvante pode ser administrada antes ou após transporte do antigénio no mesmo local ou em local diferente. O tempo entre a administração do adjuvante e a administração do antigénio pode ter uma diferença de minutos, algumas horas ou vários dias.

Tal como utilizado na presente invenção, o termo "tratamento" inclui qualquer uma das situações seguintes: prevenção de infecção ou reinfecção; redução ou eliminação de sintomas e a redução ou eliminação completa de um patogénio. O tratamento pode ser efectuado a título profilático (antes da infecção).

Os termos "indivíduo" e "sujeito" são utilizados alternadamente nesta invenção e referem-se a qualquer membro da subfilo cordata, incluindo, sem limitações, seres humanos e outros primatas (incluindo primatas não humanos tais como os chimpanzés e outras espécies de macacos e símios), animais de quinta tais como bois, ovelhas, porcos, cabras e cavalos; mamíferos domésticos tais como cães e gatos; animais de laboratório incluindo roedores tais como os ratinhos, ratazanas e porquinhos da Índia; pássaros (incluindo, pássaros domésticos, selvagens e de caça tais como galinhas, perus e outros pássaros galináceos, patos, gansos); peixes, etc. Os termos não denotam uma idade particular. Deste modo, pretende-se que tanto os adultos como indivíduos recém-nascidos sejam incluídos. Pretende-se que os métodos descritos nesta invenção sejam utilizados para todas as espécies de vertebrados acima indicadas, uma

vez que os sistemas imunitários de todos estes vertebrados funciona de forma semelhante.

#### B. Métodos Gerais

Uma premissa básica da presente invenção reside na descoberta de que um adjuvante não-ADN pode ser incorporado numa composição de vacina baseada num ácido nucleico (por exemplo, uma composição de ADN ou composição de vacina genética) e utilizado para alterar, intensificar, direcccionar ou redireccionar a natureza da resposta imunitária a um antigénio num indivíduo tratado.

As composições que contêm uma combinação de uma molécula de ácido nucleico que inclua uma sequência codificadora de um antigénio de interesse e um adjuvante numa forma que não de ADN, são administradas directamente nas células presentes no tecido alvo num indivíduo a ser tratado. É preferível, mas não necessário, que a composição seja revestida numa partícula de suporte nuclear o que facilita grandemente o transporte intracelular directo das novas composições. O componente adjuvante da composição é eficaz para intensificar, pelo menos, um aspecto da resposta imunitária desencadeada contra o antigénio parceiro. Em alguns aspectos da invenção, o adjuvante é seleccionado para mudar ou redireccionar a natureza da resposta imunitária específica de um antigénio relativamente à resposta imunitária de um antigénio específico que é criada na ausência do adjuvante co-administrado.

Em outros aspectos da invenção, o adjuvante é seleccionado para intensificar o componente auxiliar T 1 (th1) da resposta imunitária de um antigénio específico.

Num aspecto particular da invenção, foi descoberto que a adição de um adjuvante apropriado alteração da resposta imunitária a uma vacina de ADN tem o efeito de estimular e mudar a resposta imunitária específica de um抗igénio desenacadeada pela vacina de modo a favorecer uma resposta Th1 em vez de uma resposta Th2. Um adjuvante particular que foi descoberto por surtir esse efeito é o lípido A monofosforilo (MPL), embora tenham sido identificados outros adjuvantes com efeitos semelhantes. Tal mudança de resposta imunitária numa vacina de ADN aumenta a eficácia de vacinas de ADN numa série de doenças infecciosas, tais como a malária.

#### Antigénios

As moléculas de ácido nucleico para a componente de vacina genética das composições aqui presentes não requerem a elaboração de técnicas de preparação. O passo de preparação mais critico é, sem dúvida, a selecção de uma sequéncia apropriada que codifique um抗igénio de interesse. O抗igénio é seleccionado de forma a que a resposta imune, quando desencadeada, possa providenciar algum nível de efeito terapêutico no indivíduo vacinado, por exemplo algum nível de protecção eficaz contra um agente de doença. Nestas concretizações em que se pretende que a resposta imunitária de uma vacina de ADN seja modificada para intensificar o carácter Th1 da resposta imunitária, o抗igénio codificado pelo ADN na vacina será seleccionado com este efeito em mente.

Deste modo, em geral, o抗igénio será seleccionado tendo consideração um método de transporte particular, tecido alvo e adjuvante companheiro. Por exemplo, a

imunização mediada por partículas de ratinhos com vectores codificadores do抗igénio de nucleoproteína (NP) do vírus influenza,抗igénio embrionário de carcinoma humano (CEA), ou抗igénio do *P. falciparum* CS resulta previsivelmente na indução das respostas de anticorpos indicativas de uma resposta Th2. Por outro lado, a imunização de ratinhos com vectores codificadores de proteínas HIV resulta em respostas inicialmente do tipo Th1 que podem ser convertidas em respostas Th2 com imunizações adicionais. Mais ainda, a imunização com vectores codificadores da superfície do vírus da hepatite B (HBV) e抗igénios do núcleo resulta numa resposta que poderá ser classificada como Th0 devido à representação igual de ambas as subclasses principais de IgG na resposta imunitária específica de um抗igénio. Deste modo, para determinadas infecções ou doenças parasíticas, é possível que o resultado imunológico a seguir a uma vacina de ADN seja apropriado para proporcionar uma protecção óptima, enquanto que para outras, modulação ou redireccionamento do resultado imunológico é necessário para atingir um nível eficaz de protecção que seja superior ao observado sem a utilização do adjuvante. Por exemplo, é igualmente que, para determinadas infecções ou doenças parasíticas, as respostas imunológicas, embora significativas em força, possam não ser apropriadas para apresentar um efeito terapêutico considerado óptimo, por exemplo, a protecção. Por outras palavras, a resposta imunitária poderá ser quantitativamente suficiente, mas qualitativamente insuficiente. Este pode ser o caso da malária, em que dados da vacina já existentes anteriormente indicam que respostas Th1 poderão ser importantes, mas onde as respostas Th2 são

desencadeadas via vacina de ADN da epiderme quando se utiliza um vector plasmídeo codificador de CS. Deste modo, o efeito do tipo de adjuvante aqui previsto poderão não intensificar o nível quantitativo de resposta imunitária, mas sim simplesmente redireccionar a resposta imunitária para intensificar o componente Th1 dessa resposta.

Consequentemente, para o componente de ácido nucleico das presentes composições, um sistema promotor adequado será uma sequência operacionalmente ligada que codifica um抗érgenio de interesse. O抗érgenio de interesse será preferencialmente associado a um agente patogénico, tal como um agente patogénico viral, bacteriano ou parasítico, ou o抗érgenio poderá ser um抗érgenio específico de tumor, um auto-抗érgenio ou um alérgeno. O抗érgenio poderá ser uma proteína completa.

Alternativamente, o抗érgenio poderá apenas consistir essencialmente num epítopo celular B de um抗érgenio.

Os抗érgenios específicos de tumores incluem, mas não se limitam a, qualquer das várias MAGEs (抗érgenio associado a melanoma E), incluindo MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3 (peptídeo HLA-A1, MAGE 4, etc., qualquer dos vários tirosinase (peptídeo HLA-A2), ratos mutantes; p53 mutante e抗érgenio de melanoma p97. Outros抗érgenios específicos de tumores incluem o peptídeo RAS e o peptídeo p53 associado a cancros em estado avançado, os抗érgenios HPV 16/18 e E6/E7 associados a cancros cervicais,抗érgenios MUC1-KLH associados ao cancro da mama, CEA (antigénios carcino-embriónarios) associados ao cancro colo-rectal,抗érgenios gplIOO ou MART1 associados ao melanoma e o抗érgenio do PSA associado ao cancro da próstata A sequência do gene p53 é

conhecida (ver, por exemplo, Harris et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6: 4650-4656 e encontra-se depositada no GenBank com N° de Acesso M14694.

Os antigénios virais adequados incluem, mas não se limitam a, antigénios obtidos ou derivados da família dos vírus da hepatite, incluindo o vírus da hepatite A (HAV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite delta (HDV), vírus da hepatite E (HEV) e vírus da hepatite G (HGV). Como forma de exemplo, a sequência genómica viral de HBV é conhecida, uma vez que são conhecidos os métodos para obter sequências codificadoras de antigénios. Ver, por exemplo, Ganem et al. (1987) Annu. Rev. Biochem. 56: 651- 693; Hollinger, F. B. (1990) Vírus da Hepatite B, vol. II, pp. 2171-2235, em Fields et al.

(eds), *Virology*, 2<sup>a</sup> ed, Raven Press, Nova Iorque, NY; e Valenzuela et al. (1980) The nucleotide Sequence of the Hepatitis B viral Genome and the Identification of the Major Viral Genes, pp. 57-70, em Fields et al. (eds), *Animal Virus Genetics*, Academic Press, Nova Iorque, NY). O genoma HBV codifica diversas proteínas virais, incluindo os polipeptídeos antigénicos de superfície grande, média e principal , o polipeptídeo de gene X e o polipeptídeo de núcleo. Ver, por exemplo, Yokosuka et al. (1986) N. Engl. J. Med. 315 : 1187-1192; Imazeki et al. (1987) Hepatology 7: 753-757; Kaneko et al. (1988) J. Virol. 62: 3979-3984; e Ou et al. (1990) J. Virol. 64: 4578-4581. De modo semelhante, a sequência genómica viral de HVC é conhecida, uma vez que existem métodos para obter a sequência. Ver, por exemplo, Publicações Internacionais n°s WO 89/04669; WO 90/11089; e WO 90/14436. O genoma HCV codifica inúmeras proteínas virais, incluindo a E1 e E2. Ver, por exemplo,

Houghton et al. (1991) Hepatology 14: 381-388. As sequências codificadoras destas proteínas HBV e HCV, assim como de fragmentos抗igénicos das mesmas, encontrarão utilidade nos métodos aqui presentes. De modo semelhante, é também conhecida a sequência codificadora para o抗igénio 8 do HDV (Ver, por exemplo Patente Norte-americana Nº 5,378,814).

De modo geral, as sequências codificadoras de uma grande variedade de抗igénios de proteínas da família do vírus do herpes podem ser utilizadas na presente invenção, incluindo抗igénios derivados ou obtidos do vírus herpes simplex (HSV) tipos 1 e 2, tais como glicoproteínas gB HSV-1 e HSV-2, gD e gH;抗igénios do vírus varicela zoster (VZV), vírus de Epstein-Barr (EBV) e citomegalovírus (CMV) incluindo gB e gH; e抗igénios de outros vírus herpes humanos tais como o HHV6 e HHV7 (ver por exemplo, Chee et al. (1990) *Cytomegaloviruses* (J. K. McDougall, ed., Springer-Verlag, pp. 125-169; McGeoch et al. (1988) J. Gen Virol. 69: 1531-1574; Patente Norte-americana Nº No. 5,171,568; Baer et al. (1984) Nature 310: 207-211; e Davison et al. (1986) J. Gen. Virol. 67: 1759-1816.) São conhecidos e revelados抗igénios HIV, tais como as sequências gpl20 para uma série de isolados de HIV-1 e HIV-2, incluindo membros dos vários subtipos genéticos do HIV (ver, por exemplo., Myers et al., Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico (1992); e Modrow et al. (1987) J. Virol. 61: 570-578) e抗igénios derivados de qualquer destes isolados irão encontrar utilidade nos métodos aqui presentes. Além disso, a invenção é igualmente aplicável a outras fracções imunogénicas, derivadas de qualquer um dos vários isolados

de HIV, incluindo qualquer das várias proteínas de envelope tais como gp160 e gp41, antigénios gag tais como p24gag e p55gag, assim como proteínas derivadas das regiões *pol*, *env*, *tat*, *vif*, *ver*, *nef*, *vpr*, *vpu* e LTR do HIV.

As sequências codificadoras de antigénios derivadas ou obtidas de outros vírus irão igualmente encontrar utilidade nos métodos reivindicados, tais como, sem se limitarem a, sequências de membros das famílias Picomaviridae (por exemplo, vírus da poliomielite, etc.); Caliciviridae; Togaviridae (por exemplo, vírus da rubéola, vírus do dengue, etc.); Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae; Birnaviridae ; Rhabodoviridae (por exemplo, vírus da raiva, etc.); Filoviridae; Paramyxoviridae (por exemplo, vírus da papeira, vírus do sarampo, vírus respiratório sincitial, etc.); Bunyaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (por exemplo, HTLV-I ; HTLV-II ; HIV-1 (também conhecido como HTLV-III, LAV, ARV, hTLR, etc.), incluindo mas não se limitando a antigénios dos isolados HIV, HIVSF2, HIVLAV, HIVLA,, HIVMN) ; HIV-1CM235, HIV-lUS ; HIV-2, entre outros. Ver, por exemplo, Virology, 3<sup>a</sup> Edição (W. K. Joklik ed. 1988); Fundamental Virology, 2<sup>a</sup> Edição (B. N. Fields e D. M. Knipe, eds. 1991), para uma descrição destes e outros vírus.

As sequências codificadoras de antigénios bacterianos e parasíticos adequadas são obtidas ou derivadas de agentes etiológicos conhecidos para doenças como Difteria, Pertussis, Tétano, Tuberculose, Pneumonia Fúngica ou Bacteriana, Cólera, Febre Tifóide, Peste, Shigelose ou Salmonelose, Doença do Legionário, Doença de Lyme, Lepra, Malária, Ancilostomose, Oncocerciase, Shistosomiase, tripanossomiase, Leishmaniose, Giardiase, Amebiase,

Filaríase, Borrelia e Triquinose. Ainda existem outros antigénios que podem ser obtidos ou derivados de vírus não convencionais ou agentes tipo vírus tais como agentes etiológicos de kuru, doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), paraplexia enzoótica dos ovinos, encefalopatia transmissível da marta, doenças crónicas debilitantes, ou derivadas de partículas infecciosas proteináceas tais como priões associados à doença das vacas loucas.

As sequências codificadoras de alérgenos adequados que poderão encontrar utilidade na presente invenção incluem, mas não se limitam a, alérgenos dos pólens, pêlos dos animais, gramíneas, bolor, pós, antibióticos, veneno da picada de insectos e uma variedade de alérgenos ambientais, alimentares e medicamentosos. Os alérgenos comuns das árvores incluem os pólens da planta do algodão, árvores populares, freixo, bétolas, acér, carvalho, ulmeiro, nogueira e nogueira-pecã; alérgenos vegetais comuns incluem aqueles do centeio, da tasna, da tanchagem, das azedas e da erva formigueira; alérgenos de contacto incluem aqueles do carvalho venenoso, hera venenosa e urtiga; alérgenos cereais comuns incluem alérgenos de rabo-de-gato, erva-dogado, grama-das-boticas, festuca e poa; os alérgenos comuns podem igualmente ser obtidos do bolor ou fungos tais como Alternaria, Fusarium, Hormodendrum, Aspergillus, Micropolyspora, Mucor e actinomicetos termofílicos; penicilina e tetracilina são alérgenos antibióticos comuns; alérgenos epidérmicos podem ser obtidos do pó doméstico ou orgânico (normalmente de origem fungica), de insectos tais como ácaros da casa (dermatphagoides pterosinyssis), ou de fonte animal tais como penas, pelo de cão e de gato; alérgenos alimentares comuns incluem o leite e o queijo

(lacticíneos), ovos, trigo, frutos secos (por exemplo, o amendoim), marisco (por exemplo, crustáceos), ervilha, feijão e alérgenos de glúten; alérgenos de medicamentos comuns incluem alérgenos de anestésicos e salicilatos locais; alérgenos de antibióticos incluem penicilina e alérgenos de sulfonamida; e os alérgenos comuns de insectos incluem abelha, vespa e veneno de formiga e alérgenos de cálices de barata. Os alérgenos particularmente bem caracterizados incluem, mas não se limitam a, epítopos principais e crípticos do alérgeno Der 1 p (Hoyne et al. (1994) Immunology 83:190-195), fosfolipase de veneno de abelha A2 (PLA) (Akdis et al. (1996) J. Clin. Invest. 98: 1676-1683), alérgeno do pólen de bétula Bet v 1 (Bauer et al. (1997) Clin. Exp. Immunol. 107: 536-541), e o alérgeno gramínia recombinante multi-epitópico rKBG8.3 (Cao et al. (1997) Imunologia 90: 46-51).

Estes e outros alérgenos adequados encontram-se comercialmente disponíveis e/ou podem ser prontamente preparados seguindo técnicas conhecidas.

A sequência codificadora para um antigénio de interesse pode ser obtida e/ou preparada utilizando métodos conhecidos. Por exemplo, preparações de antigénios substancialmente puras podem ser obtidas utilizando ferramentas da biologia molecular padrão. Isto é, sequências polinucleótidas codificadoras dos antigénios acima descritos podem ser obtidas utilizando métodos recombinantes, tais como pesquisa de bibliotecas de ADNc e bibliotecas genómicas de células que expressam o gene, ou através da derivação de genes a partir de um vector conhecido que inclua o mesmo. Além disso, a sequência desejada pode ser isolada directamente de células e tecidos

que contêm o mesmo, utilizando técnicas modelo, tais como extracção de fenol e PCR de ADNc ou ADN genómico. Ver, por exemplo, Sambrook et al., supra, para uma descrição das técnicas utilizadas para obter e isolar ADN. As sequências polinucleótidas também podem ser produzidas sinteticamente, em vez de por clonagem.

Ainda outro método conveniente para isolar moléculas específicas de ácido nucleico é através de reacção em cadeia da polimerase (PCR). Mullis et al. (1987) Métodos Enzimáticos 155: 335-350. A técnica utiliza polimerase de ADN, normalmente uma polimerase de ADN termoestável, para replicar uma região desejada de ADN. A região de ADN a ser replicada é identificada por oligonucleótidos de sequência especificada, complementarmente para duas extremidades opostas e cadeias opostas do ADN desejado para iniciar a reacção de replicação. O produto da primeira fase de replicação é ele próprio um modelo para a replicação subsequente. Deste modo, ciclos sucessivos repetidos de replicação resultam numa amplificação geométrica do fragmento de ADN delimitado pelo par iniciador utilizado.

Uma vez obtida a sequência codificadora específica de interesse, esta pode ser operacionalmente ligada a elementos de controlo apropriados para providenciar uma molécula de ácido nucleico que possa ser expressada utilizando técnicas padrão de clonagem ou de biologia molecular. Ver, por exemplo, Edge (1981) Nature 292: 756; Nambair et al. (1984) Science 223: 1299; e Jay et al. (1984) J Biol Chem. 259: 6311. A molécula de ácido nucleico pode ser então utilizada per se ou apenas como simplesmente inserida num vector adequado tal como um plasmídeo de expressão ou construção de vector viral.

Assim, as moléculas de ácido nucleico da presente invenção incluem, normalmente, uma sequência promotora homologa ou heterogénea e outras sequências de controlo apropriadas. Estas outras sequências de controlo podem incluir uma sequência iniciadora ou terminal de tradução (por exemplo, GCCACCATGG ou GCCCCCCATGG) e/ou um codão de paragem traducional (por exemplo, TAA, TAG ou TGA) e/ou um sinal de poliadenilação e/ou um local de pausa ARN. Além disso, podem também estar presentes sequências intensificadoras nativas ou heterólogas para a sequência promotora. Uma vez construídas, as moléculas de ácido nucleico podem ser administradas utilizando protocolos modelo de administração de genes. Os métodos de administração de genes são conhecidos na arte. Ver, por exemplo, Patente Norte-americana N°s 5,399,346, 5,580,859, 5,589,466. Os genes podem ser administrados directamente para um indivíduo ou, alternativamente, administrados ex vivo, para células derivadas de um sujeito e células reimplantadas no sujeito.

#### Adjuvantes

O segundo componente das composições novas da presente invenção é o componente adjuvante que pode incluir qualquer adjuvante adequado ou combinação de adjuvantes. Por exemplo, os adjuvantes adequados incluem, sem limitação, adjuvantes formados de sal de alumínio (alumen), tais como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, sulfato de alumínio, etc; formulações de emulsão de óleo em água e água em óleo, tais como Adjuvante Completo de Freund (CFA) e Adjuvante Incompleto de Freund (IFA); géis minerais; copolímeros em bloco; amino-lípido Avridine™; SEAM62; adjuvantes formados a partir de componentes de paredes

celulares bacterianas, tais como adjuvantes que incluem lipopolissacáridos (por exemplo, lípido A ou lípido monofosforilo A (MPL), Imoto et. al (1985) Tet. Lett. 26 : 1545-1548), dimicolato trealose (TDM) e esqueleto da parede celular (CWS); proteína de choque térmico ou derivados dos mesmos; adjuvantes derivados de toxinas bacterianas de ADP-ribosilação, incluindo a toxina da difteria (DT), toxina da pertussis (PT), toxina da cólera (CT), a toxina de *E. coli* sensível ao calor (LT1 e LT2), Endotoxina A de *Pseudomonas*, exotoxina S. de *Pseudomonas*, exoenzimas *B. cereus*, toxina *B. sphaericus*, toxinas *C. botulinum* C2 e C3, enzoenzima *C. limosum*, assim como toxinas de *C. perfringens*, *C. spiriforma* e *C. difficile*, Estafilococos aureus EDIN, e toxinas mutantes bacterianas de ADP-ribosilação tais como CRM, 97, uma toxina mutante da difteria não tóxica (ver, por exemplo, Bixler et al. (1989) Adv. Exp. Med. Biol. 251: 175; e Constantino et al. (1992) Vaccine) ; adjuvantes saponinos tais como Quil A (Patente Norte-americana Nº 5,057,540), ou partículas geradas de saponinas tais como ISCOMs (complexos imuno-estimulantes); quimioquinas e citoquinas, tais como interleuquinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, etc.), interferões (por exemplo interferão gama), factor estimulante da colónia de macrófagos (M-CSF), factor da necrose do tumor (TNF), defensinas 1 ou 2, RANTES, MIP1-a e MIP-2, etc; muramil peptídeos tais como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2- (1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforil)-etilamina (MTP-PE) etc.; adjuvantes derivados da família CpG de moléculas, dinucleotidos CpG e

oligonucleotidos sintéticos que abrangem os motivos CpG (ver, por exemplo, Krieg et al. *Nature* (1995) 374: 546; Medzhitov et al. (1997) *Curr. Opin. Immunol.* 9: 4-9; e Davis et al.

J Immune (1998) 160: 870-876) tais como TCCATGACGTTCTGATGCT e ATC C. exoenzima limosum GACTCTCGAGCGTTCTC; e adjuvantes sintéticos tais como PCPP (Poli [di (carboxilatofenoxi) fosfazene] (Payne et al. *Vaccines* (1998) 16 : 92-98). Estes adjuvantes encontram-se comercialmente disponíveis junto de uma série de distribuidores tais como Accurate Chemicals; Ribi Immunechemicals, Hamilton, MT; GIBCO; Sigma, St. Louis, MO.

Os adjuvantes preferidos para utilização na presente invenção são aqueles que são, pelo menos, solúveis em etanol. Uma classe de adjuvantes particularmente preferida para utilização nesta invenção são os classificados como "saponinas", isto é, com origem em plantas que produzem saponina do género Quillaja, Saponaria, ou Gipsofila. As saponinas são produtos glicosídicos de plantas naturais, compostos por uma estrutura em anel (a aglicona) ao qual é anexa uma ou mais cadeias de açúcar. A aglicona pode ser um asteróide, triterpenóide ou um esterol alcalóide e o número de açúcares ligados às ligações glicosídicas pode variar bastante. As saponinas mais comuns utilizadas como adjuvantes farmacêuticos são os glicosídos triterpenos extraídos da árvore da América do Sul saponária Quillaja e são referidas como Quil A (ver, por exemplo Patente Norte-americana Nos. 5,688,722; 5.057,540; e 4,432,969; e Publicação Internacional Nº 88/09336, publicada a 1 de Dezembro de 1988), componente activo com o termo QS-21.

Outro adjuvante preferido é o análogo dipeptídeo muramil com a terminologia "GMTP-N-DPG" (N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-L-alanil-dipalmitoilpropilamida). Ver Fast et al. (1997) Vaccine 15: 1748-1752.

Na presente invenção, existem vários adjuvantes que são considerados preferidos para utilização no adjuvante de alteração imunitária. O atributo crítico de tal adjuvante é que este tende a redireccionar a resposta imunitária desencadeada numa direcção particular desejada relativamente à utilização do ADN codificador do抗igénio por ele próprio. É particularmente desejável se o adjuvante tiver esta característica de direcionar ou mudar a resposta imunitária em relação a uma resposta Th1 como oposta a uma resposta Th2. Considerando que todas as respostas a um抗igénio são complexas, e muitas se não todas as respostas imunitárias envolvem elementos tanto da resposta Th1 como da resposta Th2, não é prático procurar um redireccionamento total de resposta. Como alternativa, o que é contemplado é uma mudança relativa do tipo de resposta imunitária, por exemplo, utilizando um adjuvante que intensifique uma resposta do tipo Th1. Por exemplo, onde se descobriu que um抗igénio particular produz uma resposta predominantemente Th2, mas o resultado mais desejável é uma resposta Th1, então uma mudança na direcção de Th1 irá apresentar uma eficácia clínica maior da vacina. Um adjuvante de alteração imunitária, tal como aqui descrito, poderá ou não resultar em qualquer aumento na resposta imunitária quantitativa total no indivíduo, que é o resultado normalmente esperado para incorporação de adjuvantes nas vacinas.

Alternativamente, pretende-se que o adjuvante de alteração imunitária mude ou redireccione a natureza ou qualidade da resposta imunitária, mais do que a sua magnitude ou quantidade.

Um exemplo de adjuvante de alteração imunitária que favoreça respostas Th1 é o lípido A monofosforilo, ou MPL disponível em Ribi Immunochemical Research Inc. Um exemplo de um adjuvante de alteração imunitária que favoreça a resposta Th2 é a vitamina D3 di-hidroxi 1,25. Outros adjuvantes de mudança imunitária possíveis incluem PPD, uma proteína purificada derivada do *Bacillus Calmette Guérin* (BCG), dimicolato trealose e esqueleto da parede celular micobacteriana.

O adjuvante poderá estar presente nas composições instantâneas individualmente ou numa combinação de dois ou mais adjuvantes. Neste contexto, os adjuvantes combinados poderão ter um efeito aditivo ou sinergético na promoção ou mudança de uma resposta imunitária. Um efeito sinergético é o efeito em que o resultado obtido por se combinar dois ou mais adjuvantes é maior do que se esperaria ao se adicionar simplesmente o resultado obtido a cada adjuvante quando administrado individualmente.

Infelizmente, a maior parte dos adjuvantes acima referidos são conhecidos por serem altamente tóxicos e, por conseguinte, são normalmente considerados demasiado tóxicos para utilização no ser humano. Por este motivo, o único adjuvante actualmente aprovado para utilização no ser humano é o alumínio, composição de sal de alumínio. No entanto, alguns dos adjuvantes acima são utilizados em animais e, deste modo, apropriados para inúmeros indivíduos

pretendidos, e muitos destes estão a ser sujeitos a estudos pré-clínicos e clínicos para utilização no ser humano. No entanto, descobriu-se que os adjuvantes normalmente considerados demasiado tóxicos para utilização no ser humano podem ser administrados com uma técnica de injecção em pó (tal como a técnica de transporte mediada por partículas aqui utilizada) sem problemas de toxicidade concomitantes. Sem ligação a uma teoria particular, parece que o transporte de quantidades pequenas de adjuvantes na pele permite a interacção com as células de Langerhans na camada epidérmica e células dendríticas na camada subcutânea da pele. Estas células são importantes na iniciação e manutenção de uma resposta imunitária. Deste modo, um efeito adjuvante intensificador pode ser obtido pelo transporte no alvo nas ou na proximidade de tais células. Mais ainda, o transporte transdérmico de adjuvantes na prática da invenção poderá evitar problemas de toxicidade considerando que (1) as camadas superiores da pele são pouco vascularizadas, o que faz com que a quantidade do adjuvante que entra na circulação sistémica seja reduzido, reduzido assim o efeito tóxico; (2) as células da pele estão constantemente a ser mudadas, pelo que o adjuvante residual é eliminado em vez de absorvido; e (3) uma quantidade de adjuvante substancialmente menor pode ser administrada para produzir um efeito adjuvante apropriado (comparativamente ao adjuvante que é transportado por meio de técnicas convencionais tais como a injecção intramuscular).

Uma vez seleccionado, um ou mais adjuvantes podem ser providenciados numa forma farmacêutica adequada para administração parentérica, encontrando-se a preparação

destas formas dentro do contexto da técnica geral. Ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Company, Easton, Penn., 18<sup>a</sup> edição. Em alternativa, o adjuvante pode ser transmitido em forma de partículas tal como abaixo descrito em detalhe. O(s) adjuvante(s) estarão presentes em formas farmacêuticas em quantidade suficiente para produzir o efeito desejado, isto é, intensificar a resposta da mucosa contra o antigénio de interesse co-administrado e/ou direcccionar a resposta imunitária da mucosa contra o antigénio de interesse. Normalmente, cerca de 0,1 µg para 100 µg de adjuvante, de preferência cerca de 1 µg para 500 µg de adjuvante, e ainda preferencialmente 5 µg para 300 µg de adjuvante serão eficazes para intensificar uma resposta imunitária de um determinado antigénio.

Deste modo, por exemplo, para Quil A, doses de aproximadamente 0,5 para 50 µg, de preferência 1 para 25 µg, e ainda preferencialmente entre 5 para 20 µg irão encontrar utilidade nos métodos aqui apresentados. Para MPL, uma dose de aproximadamente 1 a 250 µg, de preferência 20 para 150 µg e ainda preferencialmente 40 para 75 µg irão encontrar utilidade nos métodos aqui apresentados.

As doses para outros adjuvantes podem prontamente ser determinadas por um especialista na técnica através de métodos de rotina. A quantidade a ser administrada dependerá de um número de factores incluindo o antigénio co-administrado, assim como a capacidade do adjuvante actuar como estimulador de uma resposta imunitária ou actuar como um adjuvante de alteração imunitária.

#### Preparação das Composições

Uma vez obtida, a molécula de ácido nucleico codificadora do抗igénio de interesse e, na maioria das concretizações, o adjuvante seleccionado pode ser formulado conjuntamente como uma preparação farmacêutica única. Em outras concretizações, o adjuvante pode ser preparado numa forma farmaceuticamente aceitável, por exemplo, como uma solução líquida ou suspensão (adequada para injecção ou administração tópica) ou como um creme, emulsão, pomada, gel ou outra forma tópica farmaceuticamente aceitável. Por exemplo, a sequência codificadora de um抗igénio e/ou o adjuvante podem ser combinados com um ou mais excipientes farmaceuticamente aceitáveis ou veículo para providenciar uma vacina, adjuvante ou composição de adjuvante de vacina genética. Substâncias auxiliares, tais como agentes humectantes ou emulsificantes, substâncias tampão do pH e semelhantes, poderão estar presentes no excipiente ou veículo. Estes excipientes, veículos e substâncias auxiliares são normalmente agentes farmacêuticos que não induzem uma resposta imunitária por eles próprios no indivíduo que recebe a composição e os quais podem ser administrados sem toxicidade indevida. Os excipientes farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não se limitam a, líquidos tais como água, soro fisiológico, polietilenoglicol, ácido hialurónico, glicerol e etanol. Os sais farmaceuticamente aceitáveis podem ser aqui incluídos. Por exemplo, sais de ácidos minerais como cloridratos, bromidratos, fosfatos, sulfatos, etc.; e sais de ácidos orgânicos tais como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, etc. É aqui igualmente contemplada, embora não exigida, a possibilidade de a composição conter um suporte farmaceuticamente aceitável que serve como estabilizante,

principalmente para ácidos nucleicos e/ou peptídeos, proteínas ou outros adjuvantes semelhantes. Exemplos de condutores adequados que também actuam como estabilizantes de ácidos nucleicos e peptídeos incluem, sem se limitarem a, dextrose, sucrose, lactose, trealose, manitol, sorbitol, inositol, dextran e semelhantes de qualidade farmacêutica. Outros condutores adequados incluem, igualmente sem se limitarem a, amido, celulose, fosfatos de sódio ou cálcio, ácido cítrico, ácido tartárico, glicina, polietilenoglicóis de elevado peso molecular (PEGs) e combinações dos mesmos. Uma discussão minuciosa sobre excipientes, condutores, estabilizantes e outras substâncias auxiliares farmaceuticamente aceitáveis encontra-se disponível em REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub Co., N. J. 1991), aqui incluída por referência.

Uma vez que se pretende que as composições de vacinas da presente invenção sejam transportadas para as células presentes num local alvo, o transporte mediado por partículas é, na prática da invenção, o método preferido para administrar as composições.

Consequentemente, as moléculas de ácido nucleico e/ou adjuvantes podem ser revestidas em partículas de suporte nuclear apropriadas para o transporte intracelular, por exemplo, ouro ou tungsténio.

Os métodos mediados por partículas para transporte de preparações de vacinas são conhecidos na técnica. Mais especificamente, uma vez preparadas e devidamente purificadas, as moléculas de ácido nucleico codificadoras de抗原s e/ou adjuvantes podem ser revestidas em partículas de suporte nuclear (por exemplo, condutores de

suporte balístico) utilizando uma série de técnicas conhecidas na técnica. As partículas de suporte são seleccionadas a partir de materiais que possuem uma densidade adequada relativamente à dimensão das partículas, normalmente utilizadas para transporte intracelular a partir de um dispositivo de pistola de genes. O tamanho óptimo do condutor da partícula irá, certamente, depender do diâmetro das células alvo.

O transporte por meio de técnicas mediadas por partículas é o preferido por diversas razões.

Uma razão muito importante é que esta técnica para transporte de genes em mamíferos tem mostrado ter o mesmo nível de eficácia em todos os sistemas mamíferos testados até à data. O significado deste facto é que os dados para os modelos animais são aplicáveis e transferíveis mais directamente no tratamento do ser humano do que é possível com outras técnicas, tais como transporte intramuscular de gene, o qual mostrou uma eficácia dramaticamente diferente em roedores. Os dispositivos de transporte mediados por partículas aceleram normalmente o material genético dentro do animal através da utilização de uma força propulsiva ajustável, seja uma descarga de faísca eléctrica ou uma descarga de gás comprimido, deste modo tornando possível seleccionar facilmente os tecidos alvo para os quais serão transportadas as composições de vacinas de ácido nucleico.

De acordo com as técnicas de transporte mediadas por partículas, o material genético a ser transportado pode ser preparado em solução aquosa e posteriormente precipitado para de pequenas partículas de suporte de núcleo biologicamente inertes. Pode ser utilizada qualquer

partícula condutora adequada, por exemplo, partículas formadas a partir de polímeros ou metais (por exemplo, tungsténio, ouro, platina e irídio); no entanto, as preferidas são as partículas de suporte de tungsténio e ouro. As partículas de tungsténio encontram-se disponíveis em tamanhos médios de 0,5 para 2,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Embora estas partículas tenham uma densidade óptima para utilização em métodos de transporte mediados por partículas e permitam um revestimento altamente eficaz com ADN, o tungsténio poderá ser potencialmente tóxico para determinados tipos de células. Partículas de ouro microcristalino (por exemplo, pó de ouro A1570, disponível em Engelhard Corp., East Newark, NJ) irão também encontrar utilidade nos métodos aqui descritos. As partículas de ouro proporcionam uniformidade no tamanho (disponível em Alpha Chemicals em tamanhos de partículas 1 a 3  $\mu\text{m}$ , ou disponíveis em Degussa, South Plainfield, NJ em que a média de tamanho das partículas inclui 0,95  $\mu\text{m}$ ) e toxicidade reduzida. O ouro microcristalino proporciona uma distribuição diversa do tamanho das partículas, normalmente numa média de 0,5-5  $\mu\text{m}$ . No entanto, a área superficial irregular do ouro microcristalino fornece revestimentos altamente eficazes com ácidos nucleicos, antigénios e adjuvantes. A partícula de ouro com tamanho normal de aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  pode ser aqui utilizada.

É conhecida uma série de métodos, os quais foram aqui descritos para revestimento e precipitação de ADN ou ARN em partículas de ouro ou tungsténio. Estes métodos combinam normalmente uma quantidade pré-determinada de ouro ou tungsténio com ADN plasmídeo,  $\text{CaCl}_2$  e espermidina. A

solução daí resultante é agitada continuamente com vórtica durante o procedimento de revestimento para assegurar uniformidade da mistura de reacção. Após precipitação do ácido nucleico, as partículas revestidas podem ser transferidas para membranas adequadas e deixadas secar antes da utilização, podem ser revestidas em superfícies de um módulo de amostra, cartucho ou cassete, ou carregadas numa cassete de transporte para utilização em dispositivos de transporte mediado por partículas (por exemplo, dispositivo de pistola de genes).

Os adjuvantes peptídeos podem ser juntos no mesmo fornecimento ou num fornecimento diferente das partículas de suporte nuclear ao se misturarem simplesmente os dois componentes numa taxa empiricamente determinada, por precipitação de sulfato de amónio ou outros métodos solventes de precipitação familiares para os especialistas nesta técnica, ou através da acoplagem química do peptídeo para a partícula condutora. A acoplagem dos resíduos L-cisteína ao ouro foi já anteriormente descrita (Brown et al. (1980) Chemical Society Reviews 9 : 271-311). Outros métodos incluem, por exemplo, dissolver o peptídeo em etanol absoluto, água ou numa mistura de álcool/água, adicionando a solução a uma quantidade de partículas de suporte e depois secar a mistura debaixo de uma corrente de ar ou gás azoto enquanto se misturam.

Alternativamente, os peptídeos podem ser secos em partículas de suporte através da centrifugação em vácuo. Uma vez secas, as partículas revestidas podem ser suspensas de novo num solvente adequado (por exemplo, acetato de etilo ou acetona) e trituradas (por exemplo, por

sonificação) para proporcionar uma suspensão substancialmente uniforme.

Numa concretização, a invenção inclui a utilização de um adjuvante MPL numa composição de vacina genética, sendo o MPL uma molécula lipídica complexa. Enquanto alguns compostos podem ser simplesmente misturados numa preparação de ácido nucleico aquoso (por exemplo, ADN) antes do respectivo revestimento nas partículas de suporte, e enquanto tal pode funcionar no caso de MPL, MPL ou outros compostos solúveis em etanol podem simplesmente ser adicionados à solução de etanol que é normalmente utilizada para suspender as partículas de ouro revestidas de ADN.

Ainda assim, o etanol é por fim evaporado das partículas de ouro revestidas de ADN, ficando apenas o adjuvante (por exemplo, MPL que não é volátil) necessário após evaporação. Estas mesmas técnicas gerais podem ser utilizadas com outras classes de materiais biológicos no processo de transporte genético mediado por partículas, tais como adjuvantes formados a partir de hormonas não proteína, vitaminas ou análogos das mesmas.

Embora seja conveniente preparar previamente o adjuvante com o ADN nas partículas de suporte, foi descoberto igualmente que o adjuvante pode ser eficaz mesmo se transportado separadamente do material genético. Por exemplo, no transporte epidérmico por meio de técnica mediada por partículas, o adjuvante pode simplesmente ser aplicado topicalmente na área a ser tratada com a vacina genética. Desconhece-se se as partículas transportam o adjuvante para o local de expressão do gene ou se o adjuvante é eficaz por simplesmente difundir para o local

de transporte do gene. Para o transporte de genes mediados por partículas, a diferença não é crítica. O adjuvante pode ser transportado com os genes ou aplicado separadamente topicalmente, por exemplo por meio de compressa.

As técnicas de transporte mediadas por partículas permitem que as composições da vacina sejam direcionadas para um tipo ou categoria de tecido alvo no corpo. No entanto, é mais conveniente transportar partículas de suporte que transportem ADN para a epiderme.

Convenientemente, a epiderme tem provado ser um local particularmente desejado para o transporte de vacinas de ADN. Foi já demonstrado que uma resposta imunitária quantitativamente superior a uma vacina genética pode ser desencadeada na epiderme comparativamente a outros tecidos alvo possíveis. A resposta imunitária vigorosa desencadeada no transporte do gene na epiderme pode dever-se às células imunitárias, tais como as células de Langerhans ou outras células apresentadoras de抗énios, as quais transfundem regularmente na camada epidérmica da pele em busca de alvos抗énicos.

Consequentemente, a seguir à sua formação, as partículas de suporte revestidas com抗énio e/ou preparações adjuvantes são transportadas para o local alvo na pele utilizando uma técnica de transporte mediado por partículas. Alguns dispositivos de aceleração de partículas adequados para transporte mediado por partículas são conhecidos na técnica e são todos adequados na prática da invenção. O design dos dispositivos actuais empregam uma descarga explosiva, eléctrica ou gasosa para impelir as partículas de suporte revestidas no sentido das células

alvo. As partículas de suporte revestidas podem por si ser juntas de forma amovível a uma folha condutora móvel ou juntas de modo amovível a uma superfície ao longo da qual passa uma corrente de gás, elevando as partículas da superfície e acelerando-as no sentido do alvo. Um exemplo de dispositivo de descarga gasosa é descrito na Patente Norte-americana Nº 5,204,253. Um dispositivo do tipo explosivo é descrito na Patente Norte-americana Nº 4,945,050. Um exemplo de um aparelho de aceleração de descarga de partículas a hélio é o instrumento Powderjects XR (Powderject Vaccines, Inc., Madison), WI, o qual é descrito na patente

Norte-americana Nº. 5,120,657. Um aparelho de descarga eléctrica adequado para utilização nesta invenção é descrito na Patente Norte-americana Nº 5,149,655. A divulgação de todas estas patentes é aqui incluída por referência.

Dosagens únicas de partículas de suporte revestidas podem ser fornecidas num contentor adequado. Por exemplo, num cartucho que inclua um troço de tubos que contenha uma dose de partículas revestidas numa superfície interior dos mesmos. Os métodos para preparação de tais contentores são descritos nas Patentes normalmente detidas pelos E.U Nos.

5,733,600 e 5,780,100, cuja divulgação é aqui incluída por referência.

As composições das partículas ou partículas revestidas são administradas ao indivíduo numa forma compatível com a formulação da dosagem e em quantidade que será eficaz para os efeitos da invenção. A quantidade da composição a ser transportada (por exemplo, aproximadamente 0,01 µg para 10

mg, de preferência 1 para 50 µg da sequência de antígenio, depende do indivíduo a ser testado e do(s) antígeno(s) específico(s) ou alergénio(s) a ser administrados. A quantidade necessária exacta irá variar dependendo da idade e condições gerais do indivíduo a ser tratado e uma quantidade apropriada eficaz pode ser determinada prontamente por um especialista na técnica ao ler a especificação actual.

#### Programas de Administração e Dosagem

As composições de vacinas (que contêm a sequência codificadora do antígeno e/ou adjuvante) são administradas ao indivíduo de modo compatível com a formulação da dosagem e em quantidade eficaz para provocar a resposta imunitária desejável da mucosa. A quantidade do antígeno a ser transportado por administração é normalmente, no caso das moléculas de ácido nucleico codificadoras de um antígeno, 0,001 µg para 10 mg, de preferência 0,01 para 5000 µg de molécula de ácido nucleico por dose (normalmente cerca de 0.5 µg/kg para 100 µg/kg de molécula de ácido nucleico por dose). A quantidade exacta irá, certamente, depender tanto do sujeito como da condição a ser tratada ou prevenida. Mais especificamente, a quantidade exacta necessária irá variar dependendo da idade e condições gerais do indivíduo e do antígeno e/ou adjuvante particular, assim como de outros factores. Uma quantidade eficaz apropriada pode ser prontamente determinada por um especialista na arte ao ler a especificação actual e/ou ser determinada através de experiências de rotina.

O tratamento da dosagem poderá ser um programa de dosagem único ou um programa de dosagem múltipla.

Para as composições de vacinas, um programa de dose múltipla implica um curso inicial de vacinação que poderá realizar-se com 1 a 10 doses separadas de outras doses administradas em intervalos de tempo subsequentes, escolhidas para se manter e/ou reforçar a resposta imunitária, por exemplo em 1 a 4 meses para uma segunda dose e se necessário, dose(s) subsequente(s) após alguns meses. O regime de dosagem irá igualmente, pelo menos em parte, ser determinado pela necessidade do indivíduo e depender da opinião do médico.

Além disso, se se pretender a prevenção da doença, as composições são normalmente administradas antes da infecção primária com o agente patogénico de interesse. Caso se pretenda o tratamento, por exemplo, a redução dos sintomas ou recorrências, as composições são normalmente administradas após a primeira infecção.

#### C. Exemplos

Os exemplos abaixo são concretizações específicas para o desenvolvimento desta invenção. Os exemplos têm um efeito ilustrativo apenas e não se pretende, de forma alguma, que os mesmos limitem o âmbito da presente invenção.

Foram feitos esforços para assegurar a exactidão dos números utilizados (por exemplo, quantidades, temperaturas, etc.) mas poder-se-á eventualmente permitir alguma falha experimental ou desvio.

##### Exemplo 1

Redireccionamento de uma Resposta Imunitária a CEA utilizando uma Técnica de Transporte Mediado por Partículas

De modo a demonstrar a influência do adjuvante MPL na resposta imunitária para uma vacina de ADN virgem, foi desenvolvido o seguinte estudo. O adjuvante e a molécula de ácido nucleico que contém a sequência codificadora de um抗igénio de interesse foram co-administrados através do transporte mediado por partículas utilizando uma pistola de genes.

O抗igénio particular utilizado para este exemplo foi o抗igénio embrionário do carcinoma humano ("CEA"),抗igénio do tumor humano normalmente usado em experiências de investigação de tratamentos terapêuticos do cancro. Trabalhos anteriores revelaram que quando um gene codificador de CEA foi transportado por um transporte mediado por partículas nos ratos, uma resposta imunitária do tipo Th2 foi a dominante, tal como indicado por uma predominância do IgG1 no soro do título de anticorpos no soro do animal. Sem um adjuvante, os anticorpos específicos do CEA tipo Th2 (IgG1) são detectados em níveis vinte vezes superiores aos níveis dos anticorpos específicos do CEA tipo Th1 em ratinhos Balb/c (gG2a). O trabalho aqui desenvolvido foi utilizado para demonstrar que a resposta imunitária Th2 poderia ser redirecionada no sentido de uma reposta Th1 através da utilização de um adjuvante de alteração imunitária.

Para este protocolo, foi utilizada uma construção de plasmídeo que continha uma região codificadora para o抗igénio CEA sob o controlo do promotor imediatamente anterior ao citomegalovírus (CMV) com o intrão CMV A entre o promotor e a região codificadora. Para se formar a composição 64 μg do plasmídeo, o qual foi designado WRG7083, em 120 μL de água foram adicionados a 32

miligramas de esferas de ouro de 0,9 micrones num tubo Eppendorf, isto é, 2  $\mu\text{g}$  ADN/mg de ouro. Depois, foram adicionados 13,5  $\mu\text{l}$  de solução de acetato de amónio e 135  $\mu\text{L}$  de isopropanol e o tubo foi agitado brevemente em vórtex.

A mistura foi incubada por 15 minutos a -20 °C para precipitar o ADN no ouro. As esferas revestidas com ADN foram peletizadas por uma rotação de dez segundos e foram retirados os sobrenadantes. Os pellets de ouro/ADN foram lavados quatro vezes por agitação em vórtex em 1 mL de etanol, microfuging dez segundos e os sobrenadantes foram removidos. Após a lavagem final, as partículas de suporte de ouro revestido de ADN foram ressuspensas em 1,14 mL de etanol, de modo a que cada 250  $\mu\text{L}$  de suspensão de etanol contivesse 7mg de partículas de suporte de ouro com 2 g de ADN por mg de ouro.

Separadamente, foi preparada uma solução de 1mg/mL de MPL em etanol a qual foi utilizada como uma solução mãe de MPL. Cada uma das seguintes soluções foi então preparada: Suspensão da partícula de suporte (0 MPL)-250  $\mu\text{L}$ , 750  $\mu\text{L}$  de etanol adicional e 0  $\mu\text{L}$  de solução mãe de MPL.

Suspensão da partícula de suporte (0,05 mg MPL)-250  $\mu\text{L}$ , 750  $\mu\text{L}$  de etanol adicional e 50  $\mu\text{L}$  de solução mãe de MPL.

Suspensão da partícula de suporte (0,2 mg MPL)-250  $\mu\text{L}$ , 750  $\mu\text{L}$  de etanol adicional e 200  $\mu\text{L}$  de solução mãe de MPL.

Suspensão da partícula de suporte (0,5 mg MPL)-250  $\mu\text{L}$ , 750  $\mu\text{L}$  de etanol adicional e 500  $\mu\text{L}$  de solução mãe de MPL.

Suspensão da partícula de suporte (1 mg/mL MPL)-250 µL com etanol removido por meio de centrifugação e substituído por solução mãe de MPL.

Cada preparação foi sonificada durante dez segundos num banho com sonda ultrassónica para criar uma suspensão de partículas de suporte de ouro uniforme no etanol.

A transferência mediada por partículas aqui descrita foi desenvolvida utilizando um instrumento de transporte de genes potenciado por gás comprimido. Este instrumento foi obtido junto da Agracetus, Inc. e denominado como dispositivo ACCELL. O mesmo instrumento pode ser actualmente obtido junto da Powderject Vaccines, Inc. e é denominado dispositivo Powderject XR . Este género vulgar do instrumento, o qual é descrito no pedido de patente PCT PCT/US95/00780 e Patente Norte-americana Nos. 5,865,796 e 5,584,807, as divulgações sobre as quais são aqui incluídas por referência, é construído de forma a que as partículas de suporte revestidas de ADN sejam colocadas, ou revestidas no interior do condutor cilíndrico de partículas. Para este conductor, foram utilizadas secções cilíndricas de tubos de TefzelTM . Ao se utilizar uma seringa equipada com um adaptador preparado para este efeito, as suspensões acima indicadas foram, cada uma, traçadas para um tubo de TefzelTM de 30 polegada de comprimento, um milímetro (7 mg de partículas de ouro revestidas de ADN) de cada suspensão enchendo 7 polegadas de comprimento do tubo, produzindo uma distribuição nominal de 1 mg de partículas de suporte de ouro revestido de ADN, com ou sem MPL, por polegada de tubo. O tubo foi transferido para um sistema que mantinha o tubo numa configuração linear horizontal.

Após se ter permitido que as partículas de suporte tivessem um momento para assentar visivelmente, o excesso de etanol foi drenado do tubo através de uma ponta, e este foi rodado durante trinta segundos de modo a distribuir as partículas de suporte de modo uniforme no interior do tubo cilíndrico. O etanol residual foi então removido passando azoto pelo tubo durante três minutos. O tubo foi cortado em secções, cada uma com 2 polegadas de comprimento. Cada secção do tubo foi utilizada como uma carga de dose para o dispositivo de aceleração, o qual libertou um jacto de gás de hélio comprimido através do interior das secções do tubo para agarrar as partículas de suporte do tubo e transportá-las no sentido do indivíduo experimental.

Os animais modelo foram ratinhos Balb/c com seis a oito semanas de idade (Harlan/Sprague/Dawley, Indianapolis Indiana), os quais foram anestesiados e tinham o pelo do abdómen cortado. Em cada dos dois locais adjacentes no abdómen de cada animal, foi transportada uma dose única de partículas de suporte revestidas de ADN para a epiderme por meio de uma carga de hélio com uma pressão de 400 psi. Deste modo, cada local recebeu 1 $\mu$ g de ADN em 0,5 mg de partículas de suporte de ouro, com quantidades variáveis de MPL e cada animal tinha dois locais.

Numa experiência paralela, a solução mãe de MPL foi aplicada directamente na pele dos locais em tratamento no animal, passando com cotonete antes do transporte dos genes. Esta experiência foi feita por passagem de um cotonete do abdómen do animal com um aplicador de algodão mergulhado na solução mãe de MPL, após o que se permitiu que o etanol evaporasse durante dez segundos antes do

transporte das partículas de suporte revestidas de ADN numa dosagem correspondente.

Quatro semanas antes do tratamento, foram obtidas amostras de soro dos animais imunizados e dos anticorpos específicos de CEA (IgG e IgG2a) que foram quantificados utilizando um kit ELISA da Southern Biotech. Após comparação com os isótipos padrão de imunoglobulina de concentrações conhecidas, foi então desenvolvida a quantificação dos tipos de imunoglobulinas específicas de CEA.

Os resultados do estudo encontram-se representados na figura 1. Como se pode observar, os três ratinhos sujeitos a cada um dos níveis de dosagem do adjuvante da vacina genética e o adjuvante encontram-se representados por uma única barra no gráfico. Na ponta esquerda do gráfico, as três barras representam os animais que não receberam MPL nas respectivas dosagens e as respostas imunitárias desses animais, como se pode observar, foram predominantemente tipo Th2, com uma média de 27,5 vezes mais anticorpos de tipo IgG1 em comparação com os anticorpos de tipo IgG2a. A maior modificação na natureza da resposta imunológica nos animais tratados verificou-se a uma velocidade de 0,2 mg/mL de MPL, enquanto a proporção de IgG para IgG2a tinha sido reduzida para 4,5. Quando se passou MPL nos animais, como indicado nas barras à direita na figura 1, os resultados eram comparáveis aos do método de transporte por pistola de genes de 0,2 mg/mL, com uma proporção de IgG1 para IgG2a de cerca de 4,0. Outras dosagens de MPL revelaram variação no nível de redirecionamento da resposta imunitária, mas revelaram nitidamente uma resposta IgG2a mais robusta do que a observada apenas com a vacina genética sem o

adjuvante. Os resultados demonstram que a utilização do adjuvante altera de facto a natureza da resposta imunológica à vacina genética, alterando a resposta em favor de uma produção de anticorpos de tipo Th1.

Os estudos dos exemplos 2 a 5, descritos seguidamente, foram executados para determinar o efeito adjuvante proporcionado por co-administração intracelular de várias sequências codificadoras de antígeno com um adjuvante Quil A. Em cada estudo, moléculas de ADN contendo sequências que codificam antígenos virais foram combinadas com o adjuvante Quil A e revestidas sobre partículas de ouro para proporcionar composições de exemplo de acordo com a presente invenção. As partículas revestidas foram administradas a sujeitos animais e a capacidade das composições para desencadear respostas específicas dos antígenos Th1, CTL e anticorpo foi comparada com a administração extracelular intradérmica ou subcutânea do adjuvante Quil A imediatamente antes da administração de ADN. Em cada um dos estudos foram utilizadas as seguintes técnicas gerais:

Revestimento das partículas de suporte nucleares: Pesaram-se quantidades apropriadas de partículas de ouro directamente em tubos Eppendorf de 1,5 mL. Adicionou-se 400 a 500 µL de espermidina 0,05 M e fragmentou-se agregados de ouro na solução de ouro/espermidina com um banho com sonda ultrassónica durante 3 a 5 segundos. A solução mãe de ADN, contendo a molécula de plasmídeo de ADN relevante foi adicionada à solução de ouro/espermidina para resultar numa carga de esfera de 2,0 µg de ADN/mg Au e os tubos foram tapados e invertidos, depois agitados em vórtex rapidamente. Após diminuir a velocidade do vórtex e

mantendo a agitação suavemenet, adicionou-se gota a gota um volume de 10% de CaCl<sub>2</sub> a uma quantidade igual do volume de espermidina adicionada ao ouro seco. Assim que se terminou a adição da totalidade do volume de CaCl<sub>2</sub>, a solução resultante foi agitada com vórtex a alta velocidade durante cerca de 5 segundos. Deixou-se então a solução precipitar à temperatura ambiente, durante pelo menos 10 minutos. Entretanto, formou-se uma solução mãe de polivinilpirrolidona (PVP)/etanol a uma concentração de 0,03 mg PVP/mL de EtOH. Após precipitação durante dez minutos, os tubos foram rapidamente centrifugados (10 a 15 segundos) para formar pellets com a totalidade do ouro. O sobrenadante foi aspirado e os tubos foram depositados num suporte para tubos Eppendorf para soltar o pellet de ouro. Adicinou-se 800 µL de EtOH e os tubos foram invertidos várias vezes para lavar o ouro revestido com ADN. Esta etapa foi repetida por duas vezes, após o que os tubos foram novamente centrifugados e o sobrenadante foir aspirado.

As partículas de ouro revestidas com ADN lavadas foram depois acrescentadas a solução mãe de PVP e adicionou-se 50 µg de Quil A à solução de partículas de ouro revestidas com ADN-PVP com sonda ultrassónica durante 3 segundos. As partículas resultantes, que foram revestidas com a composição de vacina de ADN + Quil A foram depois aplicadas em troços de tubos de Tefzel™, como anteriormente descrito no exemplo 1.

Ensaios ELISPOT em ratinho: Os materiais e reagentes foram os seguintes:

Os anticorpos de revestimento incluiam IFN- $\gamma$  Ab de rato anti-ratinho, IL-4 AB de rato anti ratinho ou IL-5 AB rato anti ratinho (Pharmigen): anticorpos detectores incluiam IFN- $\gamma$  rato anti ratinho biotinilado, IL-4 de rato anti ratinho biotinilado ou IL-5 de rato anti ratinho biotinilado (Pharmigen); tampão de carbonato esterilizado por filtração de pH 9,6 (Pierce), placas ELISPOT de 96 poços (Millipore), solução salina tamponizada com fosfato 1X estéril (PBS, Gibco), conjugado de estreptavidina com fosfatase alcalina (Mabtech); conjunto de substrato de fosfatase alcalina (BioRad) e meio de cultura celular RPMI-10% FCS (Sigma). A estimulação celular foi executada da seguinte forma. Para a libertação de citoquinas da célula T auxiliar, esplenócitos de animais vacinados foram cultivados a  $6 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI-FCS 10% suplementado com piruvato de sódio e aminoácidos não essenciais. Um mL de células foi transferido para cada poço de uma placa de 24 poços e, por cada sujeito, um poço = apenas meio (para controlo) e um poço = antigénio de eleição ou peptídeo de classe II de eleição. As placas foram depois incubadas numa incubadora de cultura de tecidos durante 3 dias. Para a libertação de IFN- $\gamma$  precursor CTL, esplenócitos de animais vacinados foram cultivados a  $6 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI-FCS -10% suplementado com piruvato de sódio e aminoácidos não essenciais. Um mL de células foi transferido para cada poço de uma placa de 24 poços e a placa foi incubada durante 2 dias, após o que foi adicionado o peptídeo CTL aos poços de peptídeos. Por cada sujeito, um poço = só meio, um poço = peptídeo CTL de eleição a  $10^{-5}$  M e um poço = peptídeo CTL irrelevante. As placas foram depois incubadas durante mais

24 horas após a adição do peptídeo e antes da cultura em placas ELISPOT das células.

Executou-se o revestimento e bloqueio das placas ELISPOT da seguinte forma: As placas ELISPOT foram revestidas um dia antes da cultura das células com 50 µL por poço de 15 µg/mL de anticorpo de revestimento em tampão de carbonato estéril, pH 9,6. As placas revestidas foram incubadas de um dia para o outro a 4 °C, após o que foram lavadas por seis vezes com 100 µL de PBS para remover Ab de revestimento não ligado e depois foram sujeitas a uma coloração suave. Cada poço foi bloqueado com 200 µL de meio RPMI-FCS 10% durante 1 a 2 horas numa incubadora de cultura de tecidos à temperatura ambiente. O meio de bloqueio foi integralmente removido imediatamente antes da cultura das células nas placas. As células foram aplicadas nas placas da seguinte forma: Passados 3 dias, as células e o sobrenadante foram recolhidos de cada poço e transferido para um tubo cônico de 15 mL. As células foram centrifugadas para recolher o sobrenadante, que foi depois reservado a -80 °C até ser utilizado em ensaios ELISA das citoquinas. As células reduzidas a pellets foram ressuspensas em 2 a 5 mL de meio e depois ajustou-se a uma concentração final de  $1 \times 10^7$ /mL. As células foram adicionadas aos poços ELISPOT a  $1 \times 10^6$ /poço.

As placas ELISPOT foram reveladas da seguinte forma: As células foram retiradas e as placas foram lavadas duas vezes com PBS, recorrendo a um esguicho. Os poços foram lavados com água desionizada (deixando a água nos poços durante alguns minutos para lisar as restantes células), e as placas foram lavadas duas mais vezes. Diluiu-se o anticorpo de detecção até µg/mL em PBS estéril e depois

adicionou-se a 50 µL/poço e incubou-se durante 2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas cinco vezes com PBS e 50 µL de conjugado de estreptavidina com fosfatase alcalina (diluição 1:1000 em PBS) e as placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 2 horas. As placas foram depois lavadas cinco vezes com PBS e 50 µL de conjugado de estreptavidina com substrato de fosfatase alcalina cromogénico e as placas foram deixadas incubar à temperatura ambiente até emergirem manchas negras (cerca de 2 horas). A reacção de coloração foi parada por meio de lavagem por três vezes com 200 µL de água canalizada, as placas foram deixadas secar ao ar e as manchas foram contadas com um microscópio de dissecção (40x).

Ensaios CTL pulsados- peptídeo de ratinho: Os materiais e reagentes foram os seguintes: Meio RPMI-10 (500 mL de RPMI 1640 com L-glutamina e Hepes, 55 mL de soro de bovino fetal inactivado termicamente (FBS), 0,5 mL de gentamicina, 5,5 mL de antibióticos antimicolítica); meio de sensibilização ("SM") sem IL-2 (500 mL de RPMI-10, 5,0 mL de 100 mM de piruvato de Na, 5,0 mL de aminoácidos não essenciais 100x); e SM com IL-2 (SM com concentração final de 20 U/mL de IL-2 de ratinho recombinante); peptídeo epítopo CTL (peptídeo dissolvido em DMSO com qualidade de cultura de tecidos para concentração mãe de  $10^{-2}$ M); tampão de lise ACK (BioWhittaker); IL-2 recombinante de rato (Collaborative); Mitomycin C C (Aldrich dissolvido em PBS estéril para obter 500 µg/mL de solução mãe; tubo cónicos de 50 mL (Falcon), elementos para copos com colector celular de nylon (Falcon); Placas  $^{51}\text{Chromium}$  e Lumaplates (Packard).

Para estimuladores pulsados com peptídeos são apresentados baços singénicos virgens (aprox. 1,2x estimuladores/ratinho) recolhendo os baços e triturando por compressão entre duas lâminas geladas, autoclavadas para fragmentar o saco e libertar as células para uma pequena placa de petri. Aglomerados de células foram separados por meio de pipetação das células acima e abaixo com uma pipeta de transferência de 3 mL e a suspensão de células resultante foi passada através de um coletor celular de 70 µm de nylon oara dentro de um tubo cônico de 50 mL utilizando 5 a 10 mL de meio RPMI-10 para lavar bem as células. Os esplenócitos recuperados são centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos para formarem um pellet e o sobrenadante é eliminado. Os RBCs foram lisados por meio de ressuspensão dos esplenócitos em 5 mL de tampão de lise ACK durante 1 a 2 minutos, após o que as células foram lavadas por duas vezes com 20 mL de RPMI sem suplemento e uma vez com RPMI-10. As células foram depois ressuspensas a aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/mL. Os estimuladores foram tratados com mitocina C (por cada 10 mL de células, adicionou-se 500 µL de 0,5 mg/mL de mitomicina C) e as células foram incubadas com a mitomicina C durante 25 a 45 minutos a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Depois do tratamento, as células foram lavadas por duas vezes com RPMI sem suplemento e uma vez com RPMI-10. As células lavadas foram ressuspensas a  $2 \times 10^6$  células/mL em SM com 20 U/mL de IL-2 de rato e o foi adicionado o peptídeo epítopo CTL mãe. As células estimuladoras foras dispensadas a uma proporção de 3/1 responder/estimuladoras em placas de 24 poços e incubadas de um dia para o outro a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>.

Executou-se a estimulação *in vitro* das células responder da seguinte forma:

Foram recolhidos os baços de ratinhos vacinados e de controlo e foram isolados os esplenócitos responder por trituração dos baços como anteriormente descrito. Os RBCs foram lisados em 5 mL de tampão de lise ACK durante 2 a 3 minutos, após o que as células foram lavadas por duas vezes com 20 mL de RPMI sem suplemento e uma vez com RPMI-10. Os esplenócitos foram depois ressuspensos a  $6 \times 10^6$  células/mL em SM sem IL-2. Por cada ratinho foi dispensado 1 mL de esplenócitos em cada poço de uma placa de 24 poços contendo 1 mL de  $2 \times 10^6$  células/mL de células estimuladoras pulsadas com peptídeo descritas anteriormente em SM com IL-2 (concentração final de IL-2 foi 10 U/mL) e as placas foram incubadas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 a 7 dias.

Ensaio de libertação de <sup>51</sup>crómio CTL: Para a lise específica do peptídeo foram utilizadas as seguintes técnicas. Células alvo singénicas log-fase foram cultivadas em placa de 96 poços a aproximadamente 30.000 alvos/poço. Uma quantidade apropriada de células alvo foram aglomeradas em pellets em tubos cónicos e ressuspensas em 20 µL de FBS inactivado termicamente. 100 a 200 µL de <sup>51</sup>Cr (cromato de sódio) foi adicionado a cada pellet, bem misturado, depois foi incubado durante 1 hora a 37 °C. As células foram então lavadas quatro vezes com 6 a 10 mL de RPMI-10 por pellet e depois foram ressuspensas a  $3 \times 10^5$  células/mL em RPMI-10. Para alvos pulsados com peptídeos adicionou-se uma quantidade apropriada do peptídeo epítopo Ctl mãe para atingir a concentração final de peptídeo óptima (aproximadamente  $10^{-5}$ M). As células alvo foram deixadas pulsar com os peptídeos durante pelo menos 30

minutos (a 37 °C) antes da cultura em placas com as células efectoras.

Passados 5-7 dias de estimulação *in vitro*, os esplenócitos efectores foram recolhidos das placas de 24 poços e as células de cada ratinho foram reunidas em tubos cónicos de 15 mL e depois ressuspensas a  $1,5 \times 10^7$  células/mL. Para a cultura em placas, os esplenócitos de cada ratinho foram cultivados em placas a proporções de 50, 17, 5,6 e 1,9 efectoras/alvo. Após diluições, 100 µL dos alvos marcados com  $^{51}\text{Cr}$  foram adicionados a cada poço. As placas foram centrifugadas rapidamente e depois incubadas durante 4 a 6 horas a 37 °C. A lise foi medida em comparação com os alvos tanto pulsados com peptídeo como controlos não pulsados por cada ratinho.

Para lise não específica, foi cumprido o mesmo protocolo, excepto 100 µ de alvos não pulsados que foram também aplicados em placa. Após uma incubação de 4 a 6 horas, as placas foram centrifugadas para agregar as células em pellets e as lisar. 25 µL do sobrenadante foram transferidos para Lumaplates e deixados secar durante 2 horas ou de um dia para o outro. As placas foram seladas e contadas utilizando um programa padrão para  $^{51}\text{Cr}$  sólido. Para calcular a % de lise (cpm ensaio - cpm espont.) foi dividido por (cpm max.-cpm espont.) e multiplicado 100. Para obter a % de lise específica, a % de lise de alvos não pulsados foi subtraída da % de lise de alvos pulsados com peptídeos.

**ELISA:** A resposta dos anticorpos às várias composições de vacina foi determinada por um procedimento ELISA standard. Mais especificamente, placas de ligação médias

(Costar) foram revestidas com 100 µL/poço de uma solução mãe de抗igenios de 1 µg/mL (em PBS) e incubadas de um dia para o outro a 4 °C. A solução de抗igenios foi aspirada e as placas foram bloqueadas com 5% leite em pó/PBS durante pelo menos uma hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas por três vezes com tampão de lavagem (10 mM TBS/0,1 % Brij-35) e foram adicionados 100 µL de soro de amostra e incubou-se durante duas horas à temperatura ambiente (tampão de diluição: 2% de leite em pó/PBS/0,05 % de Tween 20). As placas foram lavadas três vezes e incubadas com anticorpos de cabra marcados com biotina, específicos para imunoglobulina IgG de ratinho ou subclasses IgG específicas para 1 hora à temperatura ambiente.

Após três lavagens adicionais, as placas ELISA foram incubadas com conjugados de estreptavidina com peroxidase de rábano silvestre durante 1 hora à temperatura ambiente. Finalmente, as placas foram lavadas e reveladas com substrato TMB (conjunto da Bio-Rad, Richmond, CA) e deixadas revelar durante 30 minutos. As reacções foram paradas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N e as placas foram lidas a A<sub>450</sub>. Foi determinada a absorvância de fundo média com poços que receberam todos os reagentes excepto os soros de ensaio.

#### Exemplo 2

Co-administração intracelular de Quil A com ADN em microesferas de ouro para intensificar uma resposta imunitária específica de NP influenza

Para determinar se a co-administração de uma composição contendo o vector de vacina de ADN que codifica o抗igenio NP da influenza e adjuvante Quil A directamente nas células pode intensificar uma resposta imunitária específica do

antigénio foi realizado o estudo seguinte. Grupos experimentais de ratinhos Balb/c foram preparados da seguinte forma: (Grupo 1) 3 ratinhos de controlo a receber microesferas de ouro revestidas com ADN irrelevante por dispositivo de transporte mediado por particular PowderJect XR; (grupo 2) 3 ratinhos a receber microesferas de ouro revestidas com vector de ADN NP por dispositivo PowderJect XR device e inoculados com tealose ou soro fisiológico antes da administração de ADN; (grupo 4) 3 ratinhos a receber microesferas de ouro com vector de ADN NP e o adjuvante Quil A; (grupo 5) 3 ratinhos a receber microesferas de ouro revestidas com vector ADN NP, co-administrado imediatamente após uma injecção intradérmica de Quil A e (grupo 6) 3 ratinhos a receber microesferas de ouro revestidas com vector ADN NP, co-administrado imediatamente após uma injecção subcutânea de uma solução contendo Quil A.

O vector ADN NP continha na sequência codificadora do antigénio NP da influenza (da estirpe PR8) e encontra-se descrito em Pertmer et al. (1995) Vaccine 13: 1427- 1430. Todas as microesferas de ouro foram carregadas como anteriormente descrito a uma taxa de carregamento das microesferas de 0,5 mg Au/alvo e a uma taxa de carregamento do ADN de 2,0 µg/mg de Au. A administração com o dispositivo PowderJect XR tem dois locais alvo a uma pressão operacional de 400 psi e foi uma experiência de iniciador só. Passado um mês, os ratinhos foram sacrificados e foram recolhidas amostras de sangue e dos baços para análise, tal como descrito anteriormente. Para o ensaio ELISPOT, o peptídeo utilizado para estimular os

precursores CTL foi TYQRTRALV (a  $10^{-8}$ M) e o vírus PR8 influenza foi utilizado a 5 µg/mL para a estimulação Th.

Para o ensaio crómio, o peptídeo utilizado para estimular os respondedores foi TYQRTRALV (a  $10^{-8}$ M) e o peptídeo utilizado para pulsar os alvos foi TYQRTRALV (a  $10^{-5},^5$ M). Para o ELISA, o antigénio de captura foi o antigénio PR8 NP (Sprafas) a 1 mg/mL.

Os resultados do estudo encontram-se representados seguidamente no quadro 1. Como se pode observar, a administração intracelular de Quil A associado ao vector ADN (grupo 4) intensifica a resposta das auxiliares T específicas do antigénio, respostas CTL e de anticorpos e é superior à co-administração extracelular intradérmica (grupo 5) ou subcutânea (grupo 6) do Quil A imediatamente antes da administração do ADN tanto para a indução de respostas CTL como respostas de anticorpos

QUADRO 1

Grupo nº	Med. Células CTLp SFC/ $10^6$	% med. Lise (40: 1 E/T)	Resposta Th1 (IFN- $\gamma$ )	Resposta Th2 (IL-4)	IgG (título)
1	0	0	0	0	<100
2	18	12,6	15	3	14,642
3	nd	17,5	nd	nd	5,171
4	52	43,0	53	14	40,637
5	6	5,7	55	28	5,283

6	4	19,7	nd	nd	25,600
---	---	------	----	----	--------

Exemplo 3

Co-administração intracelular de Quil A com ADN em microesferas de ouro para intensificar uma resposta imunitária específica de NP influenza

Para ajudar a confirmar os resultados encontrados anteriormente, no exemplo 2, foi realizado o seguinte estudo. Grupos experimentais de ratinhos Balb/c foram preparados da seguinte forma: (Grupo 1) 4 ratinhos de controlo a receber microesferas de ouro revestidas com ADN irrelevante por dispositivo de transporte mediado por partículas PowderJect XR; (grupo 2) 4 ratinhos a receber microesferas de ouro revestidas com ADN irrelevante e Quil A co-administrado por particular PowderJect XR; (grupo 3) 4 ratinhos a receber microesferas de ouro revestidas com vector ADN NP apenas por dispositivo PowderJect XR e (grupo 4) 4 ratinhos a receber microesferas de ouro revestidas com vector ADN NP, e o adjuvante Quil A.

Uma vez mais, o vector ADN NP continha na sequência codificadora do antígeno NP da influenza (da estirpe PR8) e encontra-se descrito em Pertmer et al. (1995) Vaccine 13: 1427- 1430. Todas as microesferas de ouro foram carregadas como anteriormente descrito a uma taxa de carregamento das microesferas de 0,5 mg Au/alvo e a uma taxa de carregamento do ADN de 2,0 µg/mg de Au. A administração com o dispositivo PowderJect XR tem dois locais alvo a uma pressão operacional de 400 psi e foi uma experiência de iniciador só. A vacinação foi administrada uma só vez e, passado um mês, os ratinhos foram sacrificados e foram

recolhidas amostras de sangue e dos baços para análise, tal como descrito anteriormente. Para o ensaio ELISPOT, o peptídeo utilizado para estimular os precursores CTL foi TYQRTRALV (a  $10^{-8}$ M) e o vírus PR8 influenza foi utilizado a 5 µg/mL para a estimulação Th. Para o ensaio crómio, o peptídeo utilizado para estimular os respondedores foi TYQRTRALV (a  $10^{-8}$ M) e o peptídeo utilizado para pulsar os alvos foi TYQRTRALV (a  $10^{-5.5}$ M). Para o ELISA, o抗igénio de captura foi o抗igénio PR8 NP (Sprafas) a 1 mg/mL.

Os resultados do estudo encontram-se representados seguidamente no quadro 2. Como se pode verificar, a administração intracelular de Quil A associada ao vector ADN (grupo 4) proporcionou uma resposta de auxiliares T específicas do抗igénio intensificada, resposta CTL e resposta de anticorpos.

QUADRO 2

Grupo nº	Med. Células CTLp SFC/ $10^6$	% med. Lise (50: 1 E/T)	IgG (título)
1	6,5	0,3	<100
2	0,5	0	<100
3	14,5	17,0	16,846
4	25,0	28,8	62,706

Exemplo 4

Co-administração intracelular de Quil A com ADN em microesferas de ouro para intensificar uma resposta imunitária CTL específica de gp120 de HIV

Para determinar se a co-administração de uma composição contendo o vector de vacina de ADN que codifica o抗igénio gp120 do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e adjuvante Quil A directamente nas células pode intensificar uma resposta imunitária específica do抗igénio foi realizado o estudo seguinte. Grupos experimentais de ratinhos Balb/c foram preparados da seguinte forma: (Grupo 1) 4 ratinhos de controlo a receber microesferas de ouro revestidas com ADN irrelevante por dispositivo de transporte mediado por partículas PowderJect XR; (grupo 2) 4 ratinhos a receber microesferas de ouro revestidas com ADN irrelevante e Quil A co-administrado por dispositivo PowderJect XR; (grupo 3) 3 ratinhos a receber microesferas de ouro revestidas com vector ADN de gp120 de HIV, administrado apenas por dispositivo PowderJect XR, iniciado uam vez e reforçados três vezes; (grupo 4) 3 ratinhos a receber microesferas de ouro com vector ADN de gp120 de HIV, administrado apenas por dispositivo PowderJect XR, iniciado uam vez e reforçados uma vez; (grupo 5) 3 ratinhos a receber microesferas de ouro revestidas com vector ADN de gp120 de HIV e o adjuvante Quil A, co-administrado pelo dispositivo de transporte mediado por partículas PowderJect XR, iniciado uma vez e reforçados três vezes e (grupo 6) 3 ratinhos a receber microesferas de ouro revestidas com vector ADN de gp120 de HIV e o adjuvante Quil A e administrado pelo dispositivo de transporte mediado por partículas PowderJect XR, iniciado uma vez e reforçado uma vez.

O vector ADN de gp120 de HIV continha na sequência codificadora do抗igénio gp120 de HIV (da estirpe LAI) e encontra-se descrito em Heydenburg et al. (1994) AIDS Res.

and Hum. Retroviruses 10: 1433-1441. Todas as microesferas de ouro foram carregadas como anteriormente descrito a uma taxa de carregamento das microesferas de 0,5 mg Au/alvo e a uma taxa de carregamento de 2,0 µg/mg de Au. A administração com o dispositivo PowderJect XR tem dois locais-alvo a uma pressão operacional de 400 psi. Foram executados vários números de vacinações (alguns apenas com um reforço, outros com três reforços), com vacinação administrada a cada quatro semanas. Todos os ratinhos foram sacrificados na semana 14 do estudo e foram recolhidas amostras dos baços para análise como anteriormente descrito. Para o ensaio ELISPOT, o peptídeo utilizado para estimular os precursores CTL foi RGPGRAFVTI (a  $10^{-7}$ M). Para a análise crómio, o peptídeo utilizado para estimular os respondedores CTL e pulsar os alvos foi RGPGRAFVTI (a  $10^{-7}$ M).

Os resultados do estudo encontram-se apresentados seguidamente no quadro 3. Como se pode observar, os resultados confirmam que os dados observados anteriormente com o antigénio influenza na co-administração intracelular de Quil A e vector ADN intensificaram as respostas CTL específicas de gp120 de HIV após uma iniciação e um reforço nos ratinhos vacinados, sem diferenças significativas quando os ratinhos foram reforçados três vezes.

#### QUADRO 3

Grupo nº	% med. Lise (50: 1 E/T)
1	3,2
2	3,5

3	36,7
4	14,7
5	32,7
6	35,4

#### Exemplo 5

Co-administração intracelular de Quil A com ADN em microesferas de ouro para intensificar uma resposta imunitária CTL específica de HBsAg

Para determinar se a co-administração de uma composição contendo o vector de vacina de ADN que codifica o抗igénio de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) e adjuvante Quil A directamente nas células pode intensificar uma resposta imunitária específica do抗igénio foi realizado o estudo seguinte. Grupos experimentais de ratinhos Balb/c foram preparados da seguinte forma: (Grupo 1) 4 ratinhos de controlo a receber microesferas de ouro revestidas com ADN irrelevante por dispositivo de transporte mediado por partículas PowderJect XR; (grupo 2) 4 ratinhos a receber microesferas de ouro revestidas com ADN vector HBsAg e administrado por dispositivo de transporte mediado por partículas PowderJect XR e (grupo 3) 4 ratinhos a receber microesferas de ouro revestidas com vector ADN HBsAg a adjuvante Quil A e administrados pelo dispositivo de transporte mediado por partículas PowderJect XR. A experiência foi repetida exactamente com os mesmos grupos experimentais utilizados.

O vector ADN HBsAg continha uma sequência codificadora do抗igenio de superficie HBV é designado pWRG7128. O plasmídeo pWRG7128 contém, para além de elementos de controlo adequados, uma sequência codificadora do抗igenio de superficie da hepatite B (HbsSAg), que está sob o controlo transcricional de um promotor citomegalovírus (CMV) e que se demonstrou produzir partículas HbsAg com a transfecção na maioria dos tipos de células. O plasmídeo pWRG7128 foi construído da seguinte forma. Um vector de clonagem pWRG7077 (Schmaljohn et al. (1997) J. Virol. 71: 9563-9569) foi preparado para aceitar uma sequência codificadora HbsAg por digestão do vector até ficar completo com *Bam*H1, seguido de digestão parcial com *Hind*3. Depois de embotar a saliência 5' por tratamento com fragmento Klenow e desoxirribonucleótidos, o fragmento do vector de 4,3 kB foi isolado. O fragmento de inserção HbsAg de 1,35 kB (contendo a sequência pre-S2 não traduzida, a sequência codificadora de HbsAg de 226 aminoácidos da estirpe adw e o elemento intensificador HBV) foi excisado do plasmídeo pAM6 (ATCC, Rockford, MD) por digestão com *Bah*M1. Depois de embotar por tratamento com o fragmento Klenow e desoxirribonucleótidos, o fragmento foi isolado e ligado ao fragmento do vector de 4,3 kB anteriormente descrito. Os recombinantes resultantes foram examinados para verificar a orientação adequada da inserção e foi identificado um isolado correcto e designado como plasmídeo intermediário (pWRG7074). Para remover o início do codão da proteína X (presente no termino 3' da inserção pAM6 1,35 kB) foi isolado um fragmento de vector de 4,86 kB do plasmídeo pWRG7074 por digestão com *Bgl*I2, embotamento com o fragmento Klenow e desoxirribonucleótidos e depois digestão

com *BstX1*. Seguidamente, foi isolado um fragmento de inserção de 754 bp da construção pWRG7074 por digestão com *Ncol*, tratamento com nuclease de feijão mungo e digestão com *BstX1*. O vector resultante e fragmentos de inserção foram então ligados para formar o plasmídeo clínico pWRG7128. Todas as microesferas de ouro foram carregadas como anteriormente descrito a uma taxa de carregamento das microesferas de 0,5 mg Au/alvo e a uma taxa de carregamento do ADN de 2,0 µg/mg de Au. A administração com o dispositivo PowderJect XR tem dois locais-alvo a uma pressão operacional de 400 psi. A vacinação foi administrada uma só vez e, passado um mês, os ratinhos foram sacrificados e foram recolhidas amostras dos baços para análise da libertação do crómio (lise específica), tal como descrito anteriormente. Para o ensaio ELISPOT, o peptídeo utilizado para estimular os precursores CTL foi IPQSLDSWWTSL (a  $10^{-6}$ M). Para a análise do crómio, foi utilizada uma linha de células que expressa um抗igénio de superfície HBV em vez do peptídeo para estimular os respondedores (a 40.000/poço) e para efectores (a 30.000/poços).

Os resultados do estudo encontram-se apresentados seguidamente no quadro 4. Como se pode observar, os resultados confirmam os dados observados anteriormente tanto com o抗igénio da influenza como o抗igénio HIV na co-administração intracelular de Quil A e vector ADN intensificaram as respostas CTL específicas de HBsAg.

QUADRO 4

% de lise específ ica na proporção efector: alvo	Animais do grupo 2, primeira experiênci a	Animais do grupo 3, primeira experiênci a	Animais do grupo 2, segunda experiênci a	Animais do grupo 3, segunda experiênci a
17:1	26,9	44,2	53,4	78,6
5,6:1	16,5	36,3	34,7	70,9
1,9:1	7,4	18,0	22,3	41,9

## LISTA DE SEQUÊNCIAS

&lt;110&gt; POWDERJECT VACCINES, INC.

&lt;120&gt; ADJUVANTED GENETIC VACCINES

&lt;130&gt; N85436C

&lt;140&gt; EP07015414.1

&lt;141&gt; 1999-11-03

&lt;150&gt; EP99956885.0

&lt;151&gt; 1999-11-03

&lt;150&gt; PCT/US99/25854

&lt;151&gt; 1999-11-03

&lt;160&gt; 7

&lt;170&gt; PatentIn versão 3.1

&lt;210&gt; 1

<211> 10  
<212> ADN  
<213> Sequência artificial  
<220>  
<223> sequência de iniciação da tradução  
<400> 1  
gccaccatgg 10  
<210> 2  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial  
<220>  
<223> sequência de iniciação da tradução  
<400> 2  
gccccccatgg 10  
<210> 3  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Sequência artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido sintético  
<400> 3  
tccatgacgt tcctgatgct 20  
<210> 4

<211> 17

<212> ADN

<213> Clostridium limosum

<400> 4

gactctcgag cgttctc 17

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> peptídeo

<400> 5

Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val  
1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> peptídeo

<400> 6

Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile  
1 5 10

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> peptídeo

<400> 7

Ile	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp	Ser	Trp	Trp	Thr	Ser	Leu
1						5					10

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista das referências citadas pelo requerente serve apenas para conveniência do leitor. Não faz parte do documento da patente europeia. Apesar da compilação cuidadosa das referências, os erros ou as omissões não podem ser excluídos e o EPO rejeita toda a responsabilidade a este respeito.

**Documentos de patente citados na descrição:**

EP 0500799 A [0002] [0004]

US 5589466 A [0002] [0054]

WO 8904669 A [0045]

WO 9011089 A [0045]

WO 9014436 A [0045]

US 5378814 A [0045]

US 5171568 A [0046]

US 5399346 A [0054]

US 5580859 A [0054]

US 5057540 A [0055] [0056]

US 5688772 A [0056]

US 4432969 A [0056]

WO 8809336 A [0056]

US 5204253 A [0071]

US 4945050 A [0071]

US 5120657 A [0071]

US 5149655 A [0071]

US 5733600 A [0072]

US 5780100 A [0072]

US 9500780 W [0082]

US 5865796 A [0082]

US 5584807 A [0082]

EP 07015414 A [0111]

EP 99956885 A [0111]

US 9925854 W [0111]

Literatura, não relacionada com patentes, citada na descrição:

Wang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, vol. 90, 4156-4160 [0002]

Tang et al. Nature, 1992, vol. 356, 152-154 [0002]

Ulmer et al. Science, 1993, vol. 259, 1745-1749 [0002]

Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives. Marcel Dekker, Inc, 1989 [0021]

Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications. Marcel Dekker Inc, 1987 [0021]

Transdermal Delivery of Drugs. CRC Press, 1987, vol. 1-3 [0021]

Bergmann et al. Eur. J. Immunol., 1993, vol. 23, 2777 - 2781 [0022]

Bergmann et al. J. Immunol., 1996, vol. 157, 3242-3249 [0022]

Suhrbier, A. Immunol. and Cell Bioi., 1997, vol. 75, 402-408 [0022]

Gardner et al. 12th World AIDS Conference, 28 June 1998 [0022]

Smith; Waterman. Advances in Applied Mathematics, 1981, vol. 2, 482-489 [0029]

Dayhoff. Atlas of Protein Sequences and Structure. National Biomedical Research Foundation, vol. 5, 353-358 [0029]

Gribskov. Nucl. Acids Res., 1986, vol. 14 (6), 6745-6763 [0029]

Harris et al. Mol. Cell. Bioi., 1986, vol. 6, 4650-4656 [0044]

Ganem et al. Annu. Rev. Biochem., 1987, vol. 56, 651-693 [0045]

Hollinger, F.B. Hepatitis B virus, 1990, vol. II, 2171-2235 [0045]

Virology. Raven Press [0045]

The nucleotide Sequence of the Hepatitis B viral Genome and the Identification of the Major Viral Genes.

Valenzuela et al. Animal Virus Genetics. Academic Press, 1980, 57-70 [0045]

Yokosuka et al. N. Engl. J. Med., 1986, vol. 315, 1187-1192 [0045]

Imazeki et al. Hepatology, 1987, vol. 7, 753-757 [0045]

Kaneko et al. J. Virol., 1988, vol. 62, 3979-3984 [0045]

Ou et al. J. Virol., 1990, vol. 64, 4578-4581 [0045]

- Houghton et al. Hepatology, 1991, vol. 14, 381-388 [0045]
- Chee et al. Cytomegaloviruses. Springer-Verlag, 1990, 125-169 [0046]
- Baer et al. Nature, 1984, vol. 310, 207-211 [0046]
- Davison et al. J. Gen. Virol., 1986, vol. 67, 1759-1816 [0046]
- Myers et al. Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, 1992 [0047]
- Modrow et al. J. Virol., 1987, vol. 61, 570-578 [0047]
- Virology. 1988 [0048]
- Fundamental Virology. 1991 [0048]
- Hoyne et al. Immunology, 1994, vol. 83, 190-195 [0050]
- Akdis et al. J. Clin. Invest., 1996, vol. 98, 1676-1683 [0050]
- Bauer et al. Clin. Exp. Immunol., 1997, vol. 107, 536-541 [0050]
- Cao et al. Immunology, 1997, vol. 90, 46-51 [0050]
- Mullis et al. Methods Enzymol., 1987, vol. 155, 335-350 [0052]
- Edge. Nature, 1981, vol. 292, 756 [0053]
- Nambair et al. Science, 1984, vol. 223, 1299 [0053]
- Jay et al. J. Biol. Chem., 1984, vol. 259, 6311 [0053]
- Imoto et al. Tet. Lett., 1985, vol. 26, 1545-1548 [0055]

Bixler et al. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1989, vol. 251, 175 [0055]

Krieg et al. *Nature*, 1995, vol. 374, 546 [0055]

Medzhitov et al. *Curr Opin Immunol.*, 1997, vol. 9, 4-9 [0055]

Davis et al. *J. Immunol.*, 1998, vol. 160, 870-876 [0055] Payne et al. *Vaccines*, 1998, vol. 16, 92-98 [0055]

Fast et al. *Vaccine*, 1997, vol. 15, 1748-1752 [0056]

Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company, 1990 [0061]

REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES. Mack Pub. Co, 1991 [0063]

Brown et al. *Chemical Society Reviews*, 1980, vol. 9, 271-311 [0068]

Pertmer et al. *Vaccine*, 1995, vol. 13, 1427-1430 [0100] [0103]

Heydenburg et al. *AIDS Res. and Hum. Retroviruses*, 1994, vol. 10, 1433-1441 [0106]

Schmaljohn et al. *J. Viral.*, 1990, vol. 71, 9563-9569 [0109]

Lisboa, 29/04/2010

**REIVINDICAÇÕES**

1. Utilização de uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência codificadora de um抗igénio para a preparação de, como medicamento, partículas revestidas compreendendo partículas transportadoras nucleares revestidas com a molécula de ácido nucleico mencionada para utilização na imunização com ácido nucleico mediada por partículas, em que as partículas revestidas mencionadas são co-administradas com um adjuvante sob uma forma que não é de ADN, que é eficaz na intensificação de pelo menos um componente de uma resposta imunitária desencadeada contra o抗igénio, em que o adjuvante é revestido em partículas transportadoras nucleares separadas.
2. Utilização de um adjuvante numa outra forma de ADN que é eficaz para intensificar pelo um componente de uma resposta imunitária desencadeada contra o抗igénio, para a preparação de, como medicamento, partículas revestidas compreendendo partículas transportadoras nucleares, revestidas com o adjuvante mencionado para utilização na imunização com ácido nucleico mediada por partículas, em que as partículas revestidas mencionadas são co-administradas com uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência codificadora de um抗igénio, em que a molécula de ácido nucleico é revestida em partículas transportadoras nucleares separadas.

3. Produtos compreendendo partículas transportadoras nucleares revestidas com a molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1 ou 2 e partículas transportadoras nucleares revestidas com um adjuvante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, como uma preparação combinada para administração separada ou concomitante na administração de ácido nucleico mediada por partículas.

Lisboa, 29/04/2010

**ANTICORPOS ANTI CEA PÓS-INICIAÇÃO  
INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO MPL**



