

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

(22) Data de pedido: 2004.01.06	(73) Titular(es): CORIXA CORPORATION CORPORATION SERVICE COMPANY 2711 CENTERVILLE ROAD, SUITE 400 WILMINGTON, DE 19808 US
(30) Prioridade(s): 2003.01.06 US 438585 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.11.02	
(45) Data e BPI da concessão: 2015.09.23 017/2016	(72) Inventor(es): DAVID A. JOHNSON US
	(74) Mandatário: ÁLVARO ALBANO DUARTE CATANA AVENIDA MARQUÊS DE TOMAR, Nº 44, 6º 1069-229 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **DETERMINADOS COMPOSTOS DE FOSFATO DE AMINOALQUIL GLUCOSAMINIDA E SEU USO**

(57) Resumo:

COMPOSTOS QUE SÃO ADJUVANTES E IMUNOEFETORES SÃO DESCRITOS E REIVINDICADOS. OS COMPOSTOS AUMENTAM A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM ANIMAIS IMUNIZADOS ASSIM COMO ESTIMULAM A PRODUÇÃO DE CITOCINAS E ATIVAM MACRÓFAGOS. AS COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA USAR OS COMPOSTOS COMO ADJUVANTES E IMUNOEFETORES SÃO TAMBÉM DESCRITOS.

RESUMO

"DETERMINADOS COMPOSTOS DE FOSFATO DE AMINOALQUIL GLUCOSAMINIDA E SEU USO"

Compostos que são adjuvantes e imunoefetores são descritos e reivindicados. Os compostos aumentam a produção de anticorpos em animais imunizados assim como estimulam a produção de citocinas e ativam macrófagos. As composições e métodos para usar os compostos como adjuvantes e imunoefetores são também descritos.

DESCRIÇÃO

"DETERMINADOS COMPOSTOS DE FOSFATO DE AMINOALQUIL GLUCOSAMINIDA E SEU USO"

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

O presente pedido reivindicada prioridade do pedido provisório nos EUA 60/438,585 depositado em 6 de janeiro de 2003.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os recetores semelhantes a Toll (TLRs) foram ligados à resposta imune inata potente e reconhecem os componentes estruturais distintos que são únicos para patógenos; esta interação aciona o sistema imunitário num estado ativado, com consequências a curto e longo prazo. Existe um interesse significativo no desenvolvimento de agonistas e antagonistas de TLRs porque a manipulação farmacológica de respostas imunes inatas pode levar a vacinas mais eficazes e a novas abordagens terapêuticas para doenças autoimunes, atópicas, malignas e infecciosas. O primeiro produto microbiano descoberto como sendo um agonista do recetor semelhante a Toll foi o LPS, um componente de membrana bacteriana específico para bactérias gram-negativas, que ativa o recetor semelhante a toll 4 (TLR-4). Apesar de o LPS ser um agente imunomodulador potente, o seu uso medicinal é limitado devido à sua extrema toxicidade, incluindo a indução de síndrome de resposta inflamatória sistémica. A porção subestrutural endotóxica biologicamente ativa de LPS é o lipídeo A, um dissacarídeo de glucosamina acilado por múltiplos ácidos gordos, fosforilado, que serve para ancorar toda a estrutura na membrana externa de bactérias gram-negativas. Os efeitos tóxicos de lipídeo A

podem ser melhorados por modificação química seletiva de lipídeo A para produzir compostos de lipídeo A monofosforilado (imunostimulante MPL™; Corixa Corporation; Seattle, WA). Métodos de fabricar e usar o imunostimulante MPL™ e compostos estruturalmente semelhantes em adjuvante de vacinas e outras aplicações foram descritos (ver, por exemplo, patentes nos EUA nº 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 e 4,912,094; 4,987,237; Johnson *et al*, J Med Chem 42: 4640 - 4649 (1999); Ulrich e Myers, em Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach; Powell e Newman, Eds.; Plenum: Nova Iorque, 495-524, 1995). Em particular, estas e outras referências demonstraram que o imunostimulante MPL™ e compostos relacionados têm atividades adjuvantes significantes quando usados em formulações de vacinas com antígenos de hidratos de carbono e proteína para melhorar a imunidade mediada por células e/ou humoral para os antígenos e interagem com os recetores semelhantes a Toll.

A partir da experiência com imunostimulante MPL™ e outros componentes da parede celular bacteriana, uma família de novos compostos sintéticos, os fosfatos de aminoalquil glucosaminida (AGPs) foram desenvolvidos. Os compostos AGP também interagem com TLR-4, como agonistas e antagonistas. Os AGPs incluem tanto compostos acíclicos e como cíclicos (patente nos EUA nº 6,113,918, e 6,303,347, WO 98/50399 publicado em 12 de outubro de 1998, WO 01/34617, publicado em 17 de maio de 2001, WO 01/90129, publicado em 29 de novembro de 2001, e WO 02/12258, publicado em 14 de fevereiro de 2002). Como imunostimulante MPL™ estes compostos têm demonstrado reter características de adjuvantes significativas quando formulados com antígenos nas composições de vacina e, além disso, têm perfis de

toxicidade similares ou melhorados quando comparados com o imunostimulante MPL™. Os AGPs também demonstram atividade de adjuvante mucosal e são eficazes na ausência de antígeno, tornando-os compostos atraentes para o uso profilático e/ou terapêutico.

Outra vantagem significativa oferecida por AGPs sobre imunostimulantes MPL™ e semelhantes é que os AGPs são prontamente produzidos numa escala comercial por meios sintéticos. Uma vez que são produzidos sinteticamente, os AGPs são livres de contaminantes biológicos de traço encontrados em MPL. Como tal, os AGPs devem ter uma vantagem sobre MPL como adjuvantes de vacinas em alguns ambientes, como em protocolos de imunização pediátrica onde a pirogenicidade do adjuvante deve ser minimizada. No entanto, uma vez que os AGPs são quimicamente sintetizados, uma estabilidade de composto menor do que a ótima pode levar à acumulação de produtos de degradação que podem resultar em atividade biológica variável e estabilidade de lote-a-lote. Do ponto de vista do desenvolvimento de processos GMP para a fabricação de materiais para experiências clínicas com seres humanos, a estabilidade do lote e a variabilidade lote-a-lote são aspectos principais. Assim, são desejáveis os compostos que tem atividade biológica aumentada em comparação com o imunostimulante MPL™ e semelhantes, interagem com os recetores semelhantes a Toll e/ou são otimizados para síntese de GPL em larga escala. A presente invenção refere-se a estas necessidades e mais ao fornecerem compostos modificados para uma melhorada atividade biológica, estabilidade com resistência aumentada à degradação enzimática e química e/ou perfis de segurança melhorados.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Num aspeto, esta invenção compreende alguns compostos de fosfato de aminoalquil glucosaminida, como aqui definido, e sais farmacologicamente aceitáveis dos mesmos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

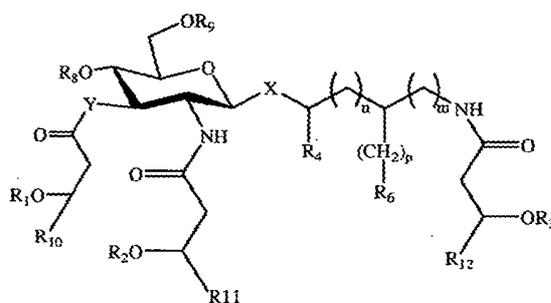
Os compostos da presente invenção são membros da família de 4-fosfato de aminoalquil glucosaminida (AGP). Como descrito abaixo, os compostos da invenção possuem, de modo variado, modificações nos comprimentos das seis cadeias acilo (primárias e secundárias), modificações estruturais do braço alquilo para incluir uma porção fosfato, modificação estrutural para incluir um lipídeo de éter primário na posição de açúcar C-3, assim como três lipídeos de éter secundários, e/ou um grupo de bloqueio de 6-hidroxilo.

Quimicamente conhecidos como ω -aminoalquil 2-amino-2-desóxi-4-fosfono- β -D-glicopiranosídeos, os AGPs são uma classe de miméticos de lipídeo A sintéticos que são estruturalmente relacionados com o componente biologicamente ativo principal do componente em monofosforil lipídeo A. Em AGPs, o açúcar redutor foi substituído por uma unidade N[(R)-3-n-alcanoiloxitetradecanoil] aminoalquil aglicon. Como outros derivados de dissacarídeo lipídeo A, os AGPs compreendem seis ácidos gordos para uma atividade biológica máxima, mas ao contrário dos derivados dissacarídeos, os AGPs contêm uma unidade aglicon β -ligada conformacionalmente flexível que permite uma compactação íntima energeticamente favorecida das seis cadeias de acilo gordo. A compactação

filme dos seis ácidos gordos numa matriz hexagonal desempenha, como se acredita, um papel essencial na bioatividade de moléculas semelhantes a lipídeo A (Seydel *et al.*, *Immunobiol*; 187 (3 - 5): 191 - 211, 1993).

Os compostos da presente invenção são considerados como sendo membros da família AGP. Estes compostos incluem modificações nos comprimentos das seis cadeias acilo (primárias e secundárias).

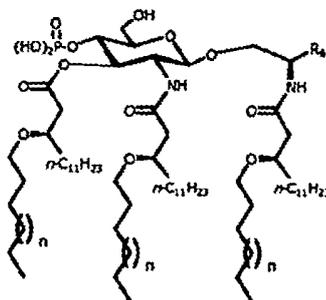
É divulgado um composto AGP tendo a fórmula (III):



(III)

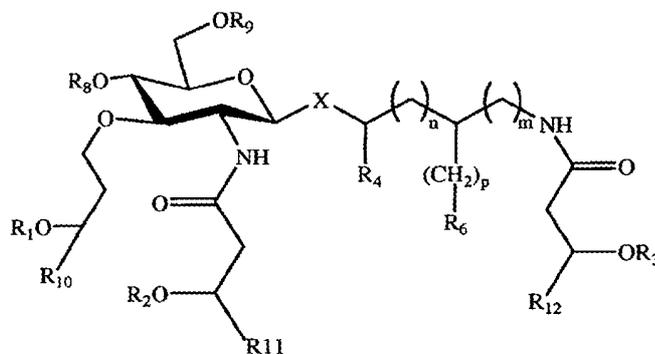
em que X é selecionado dentre o grupo consistindo em O e S na posição axial ou equatorial; Y é selecionado dentre o grupo consistindo em O e NH; n e m são 0; R₁, R₂ e R₃ são iguais ou diferentes e são grupos alquilo de cadeia linear possuindo de 1 a 20 átomos de carbono e em que um dentre R₁, R₂ ou R₃ é opcionalmente hidrogénio; R₄ é selecionado a partir do grupo consistindo de H e metilo; p é 1 e R₆ é COOH ou p é 2 e R₆ é OPO₃H₂; R₈ e R₉ são iguais ou diferentes e são selecionados a partir do grupo que consiste em fosfeno e H, e pelo menos um de R₈ e R₉ é fosfeno; e R₁₀, R₁₁ e R₁₂ são selecionados independentemente a partir de grupos alifáticos saturados não substituídos de cadeia linear com 1 a 11 átomos de carbono; ou um seu sal farmacologicamente aceitável.

A presente invenção proporciona um composto com a fórmula:



em que n é 1 ou 5 e R_6 é COOH ou $\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$.

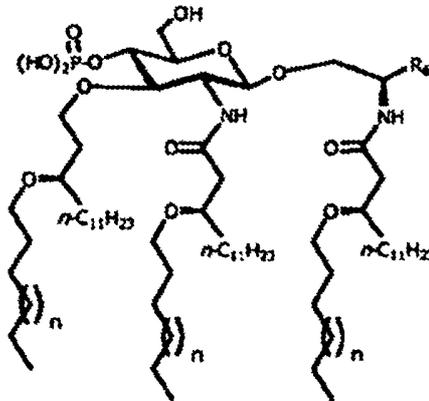
É também divulgado um composto com a fórmula (IV):



(IV)

em que X é selecionado dentre o grupo consistindo em O e S na posição axial ou equatorial; n e m são 0; R_1 , R_2 e R_3 são iguais ou diferentes e são grupos alquilo de cadeia linear possuindo de 1 a 20 átomos de carbono e em que um dentre R_1 , R_2 ou R_3 é opcionalmente hidrogénio; R_4 é selecionado a partir do grupo consistindo de H e metilo; p é 1 e R_6 é COOH ou p é 2 e R_6 é OPO_3H_2 ; R_8 e R_9 são iguais ou diferentes e são selecionados a partir do grupo que consiste em fosfeno e H , e pelo menos um de R_8 e R_9 é fosfeno; e R_{10} , R_{11} e R_{12} são selecionados independentemente a partir de grupos alifáticos saturados não substituídos de cadeia linear com 1 a 10 átomos de carbono; ou um seu sal farmacologicamente aceitável.

A presente invenção também proporciona um composto com a fórmula:



em que n é 1 ou 5 e R_6 é COOH ou CH_2OPO_3 .

Estes compostos tem atributos que permitem resistência a metabolismo e/ou hidrólise aquosa não favoráveis. A remoção seletiva dos ácidos gordos normais em moléculas de lipídeo A estruturalmente diversas por aciloxiacil hidrolase humana (AOAH) para dar o antagonista de lipídeo IVA foi postulada como tendo evolvido como mecanismo de defesa para reduzir a toxicidade de lipídeo A (Erwin e Munford., J Biol Chem 265 (27):16444 - 16449, 1990). No entanto, a maior toxicidade de 3-D-MPL naturalmente derivado com relação ao de componente hexaacilo principal é provavelmente devido à presença de componentes menos altamente acilados com estruturas distintas de lipídeo IVA (Ulrich e Myers, Monophosphoryl lipid A as an Adjuvant. Past experiences and new directions. In: Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. Ed. Powell M.F., Newman M.J. Plenum Press, Nova Iorque, 1995; p. 495-524, Johnson *et al.*, J Med Chem; 42:4640-4649, 1999). A variabilidade estrutural em 3-D-MPL e outras preparações de lipídeo A surge inerentemente do LPS cognato assim como da clivagem de éster durante procedimentos de isolamento e semissintéticos. De facto,

foi registado que a clivagem hidrolítica fácil de grupos acilo ligados a éster durante a síntese química de um lipídeo A de *R. capsulatus* putativo, um antagonista potente de produção de TNF- α induzida por LPS, produz quantidades menores de subprodutos agonísticos indesejáveis (Christ et al., Science; 268: 80 - 83, 1995). Assim, a instabilidade química e/ou enzimática pode ser o calcanhar de Aquiles de um fármaco à base de lipídeo A potencial contendo ligações éster lábeis. A instabilidade química e metabólica de ácidos gordos ligados a éster presentes tanto em moléculas de agonista e antagonista de lipídeo A foi superada com análogos hidroliticamente estáveis contendo ligações éter em vez de ácidos gordos de éster primário e/ou secundário (Christ et al. supra, Lien et al., J Biol Chem; 276 (3): 1873-1880, 2001).

Tal como aqui discutido, o termo "alifático", por si próprio ou como parte de outro substituinte, significa, a menos que afirmado em contrário, um radical hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificada, ou cíclico, ou respetiva combinação, que pode ser totalmente saturado, mono- ou poli-insaturado e pode incluir radicais di- e multivalentes, possuindo o número de átomos de carbono designado (isto é, C₁-C₁₀ significa um a dez carbonos). Exemplos de radicais hidrocarboneto saturados incluem grupos tais como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclo-hexilo, (ciclo-hexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros, por exemplo, de n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo e semelhantes. Um grupo alifático insaturado é um grupo que tem uma ou mais ligações duplas ou ligações triplas. Exemplos de grupos alifáticos insaturados incluem vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-

(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- e 3-propinilo, 3-butinilo e os homólogos e isómeros de cadeia mais longa. Tipicamente, um grupo alifático terá de 1 a 24 átomos de carbono. Um grupo "alifático inferior" é um grupo alifático de cadeia mais curta, geralmente possuindo oito ou menos átomos de carbono.

O termo "acilo" refere-se a um grupo derivado de um ácido orgânico por remoção do grupo hidróxi. Exemplos de grupos acilo incluem acetilo, propionilo, dodecanoílo, tetradecanoílo, isobutirilo, e semelhantes. Consequentemente, o termo "acilo" como usado aqui significa incluir um grupo de outra forma definido como $-C(O)-$ alifático, onde o grupo alifático é preferivelmente um grupo alifático saturado.

O termo "sais farmacologicamente aceitáveis" significa incluir sais dos compostos ativos que são preparados com ácidos ou bases relativamente não tóxicos, dependendo dos substituintes particulares encontrados nos compostos descritos aqui. Quando compostos da presente invenção contêm funcionalidades relativamente acídicas, podem obter-se sais de adição de bases por contacto da forma neutra de tais compostos com uma quantidade suficiente da base desejada, pura ou num solvente inerte adequado. Exemplos de sais de adição de bases farmacologicamente aceitáveis incluem sal de sódio, potássio, cálcio, amónio, amino orgânico ou magnésio, ou um sal semelhante. Quando os compostos da presente invenção contêm funcionalidades relativamente básicas, podem obter-se sais de adição de ácidos por contacto da forma neutra de tais compostos com uma quantidade suficiente do ácido desejado, puro ou num

solvente inerte adequado. Exemplos de sais de adição de ácidos farmacologicamente aceitáveis incluem os derivados de ácidos inorgânicos, tais como os ácidos clorídrico, bromídrico, nítrico, carbónico, mono-hidrogenocarbónico, fosfórico, mono-hidrogenofosfórico, di-hidrogenofosfórico, sulfúrico, mono-hidrogenossulfúrico, iodídrico ou fosforoso e semelhantes, bem como os sais derivados de ácidos orgânicos relativamente não tóxicos, tais como acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, benzenossulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanossulfónico e semelhantes. Também estão incluídos sais de aminoácidos, tais como arginato e semelhantes, e sais de ácidos orgânicos, tais como ácidos glucurónico ou galacturónico, e semelhantes (ver, por exemplo, Berge *et al.*, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 1-19, 1977). Certos compostos específicos da presente invenção contêm funcionalidades básicas e acídicas que permitem a conversão dos compostos em sais de adição de bases ou ácidos.

As formas neutras dos compostos podem ser regeneradas por contacto do sal com uma base ou ácido e isolamento do composto parental de modo convencional. A forma parental do composto difere das várias formas de sais quanto a certas propriedades físicas, tais como solubilidade em solventes polares, mas quanto ao restante os sais são equivalentes à forma parental do composto para as finalidades da presente invenção.

Para além das formas de sais, a presente invenção proporciona compostos que estão numa forma de um pró-fármaco. Pró-fármacos dos compostos descritos no presente

documento são aqueles compostos que sofrem facilmente alterações químicas em condições fisiológicas para proporcionar os compostos da presente invenção. Adicionalmente, os pró-fármacos podem ser convertidos nos compostos da presente invenção por métodos químicos ou bioquímicos num ambiente *ex vivo*. Por exemplo, os pró-fármacos podem ser lentamente convertidos nos compostos da presente invenção quando colocados no reservatório de um penso transdérmico com uma enzima ou reagente químico adequado.

Certos compostos da presente invenção podem existir em formas não solvatadas bem como em formas solvatadas, incluindo formas hidratadas. Em geral, as formas solvatadas são equivalentes às formas não solvatadas e pretende-se que estejam abrangidas no âmbito da presente invenção. Certos compostos da presente invenção podem existir em múltiplas formas cristalinas ou amorfas. Em geral, todas as formas físicas são equivalentes para as utilizações contempladas pela presente invenção e é pretendido que pertençam ao âmbito da presente invenção.

Certos compostos da presente invenção possuem átomos de carbono assimétricos (centros óticos) ou ligações duplas; os racematos, diastereómeros, isómeros geométricos e isómeros individuais estão pretendem estar abrangidos no âmbito da presente invenção.

Os compostos da presente invenção também podem conter proporções não naturais de isótopos atômicos num ou mais dos átomos que constituem tais compostos. Por exemplo, os compostos podem ser radioetiquetados com isótopos radioativos, por exemplo, trítio (^3H), iodo-125 (^{125}I) ou

carbono-14 (^{14}C). É pretendido que todas as variações isotópicas dos compostos da presente invenção, sejam ou não radioativas, estejam abrangidas no âmbito da presente invenção.

Os compostos da presente invenção podem ser preparados por quaisquer meios apropriados; ver a secção de Exemplos abaixo, sendo vários descritos. Por exemplo, os processos para preparar os compostos determinados úteis na presente invenção são descritos na Patente nos EUA nº 6,113,918; na Patente nos EUA nº 6,303,347; e PCT/US98/09385 (WO 98/50300, 12 de outubro de 1998). Ainda os outros compostos podem ser preparados usando métodos descritos em Johnson, *et al.*, J. Med Chem. 42:4640-4649 (1999), Johnson, *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2273-2278 (1999), e PCT/US98/50399 (WO 98/50399, 12 de novembro de 1998). Em geral, os métodos sintéticos descritos nas referências notadas acima e outros métodos sintéticos, de outra forma conhecidos na técnica, são amplamente aplicáveis na preparação destes compostos. Por exemplo, na fabricação dos compostos tendo grupos e substituições acilo diferentes, um perito na técnica irá notar que os métodos convergentes descritos aqui podem ser modificados para usar agentes acilantes alternados, ou podem ser iniciados com materiais comercialmente disponíveis tendo grupos acilo apropriados fixados.

Em composições para elicitar ou melhorar uma resposta imune, os compostos da presente invenção são administrados a um animal de sangue quente, incluindo seres humanos, com um antígeno, como um antígeno de proteína ou polipeptídeo, ou um polinucleotídeo que expressa um antígeno de proteína ou polipeptídeo. A quantidade de antígeno administrada para

elicitar uma resposta desejada pode ser facilmente determinada por um perito na técnica e irá variar com o tipo de antígeno administrado, via de administração e esquema de imunização.

Os compostos da presente invenção também podem ser administrados sem um antígeno exógeno, para elicitar proteção imediata através de um efeito de resistência não específico, como descrito abaixo; ver Persing *et al.*, Publicação OMPI WO 01/90129, 29 de novembro de 2001. Os compostos com capacidade de estimular resistência não específica e/ou elicitar um efeito adjuvante podem ser usados em formulação de vacina de efeito rápido. A administração dos compostos da presente invenção com antígeno leva a uma resposta imune mucosal adquirida dentro de três a quatro semanas. A administração semanal destes compostos, por uma via intranasal, por exemplo, durante um período de quatro semanas, fornece proteção rápida e durável combinando a proteção fornecida pela resposta imune inata inicial, seguido por resposta imune adquirida ao antígeno de interesse.

Os compostos da presente invenção podem ser avaliados numa variedade de formatos de testes para identificar e selecionar os que têm as características mais apropriadas para uma dada aplicação da invenção. Por exemplo, modelos animais podem ser usados para identificar e avaliar perfis de libertação de citocina na circulação sistémica após administração de um composto da presente invenção. Além disso, vários modelos *in vitro* e *in vivo* existem para examinar mudanças num ou mais aspetos de uma resposta imune aos diferentes componentes antigénicos a fim de identificar os compostos mais apropriados para elicitar uma resposta

imune específica de interesse. Por exemplo, um composto pode ser contactado com células de marcação, como macrófagos, células dendríticas ou células Langerhans *in vitro*, e citocinas elaboradas podem ser medidas. Além disso, conjuntos de expressão de genes podem ser usados para identificar as vias ativadas ou inibidas por um composto particular de interesse.

A indução/produção de citocina pode ser determinada usando o tratamento de sangue humano e/ou células com os compostos da presente invenção e medição da indução por ELISA (R & D Systems). Estes métodos também podem ser usados para determinar se a indução é dependente do recetor Toll. A resposta de linfócitos T citotóxicos após a administração dos compostos da presente invenção é determinada por teste de citotoxicidade baseado em ^{51}Cr . Se desejado, o desempenho dos compostos da invenção sob este aspeto pode ser comparado a outros compostos que, como se sabe, são funcionais neste aspeto, como lipídeo A, MPL, AGPs ou semelhantes. Além disso, os compostos da invenção podem ser avaliados em combinação com um ou mais adjuvantes e/ou agentes imunomoduladores para identificar os efeitos sinérgicos (ver, por exemplo, patentes nos EUA nº: 6,303,347 e 6,113,918, e WO 01/90129, publicado em 29 de novembro de 2001).

Modelos animais como modelo de desafio de influenza de murinos e modelo de desafio com *Listeria monocytogenes* de murinos são úteis para avaliar a atividade de adjuvante e imunomoduladora. Brevemente, o composto é administrado seguido por um desafio com influenza ou *L monocytogenes*. O índice de doença (pelo ondulado, postura encurvada e respiração ofegante), perda de peso e mortalidade, no caso

de influenza ou número de unidades formadoras de colônias nos baços de ratinhos tratados/não-tratados, no caso de *L monocytogenes*, são monitorizados como uma indicação de proteção dada pela administração dos compostos da invenção (ver, por exemplo, WO 01/90129 publicado em 29 de novembro de 2001).

Como usado aqui, o termo "polipeptídeo" é usado no seu significado convencional, isto é, como uma sequência de aminoácidos. Os polipeptídeos não estão limitados a um comprimento específico do produto; assim, peptídeos, oligopeptídeos e proteínas estão incluídos na definição de polipeptídeo, e estes termos podem ser usados intercambiavelmente aqui, salvo especificamente indicado em contrário. Este termos também não se referem a ou excluem modificações pós-expressão do polipeptídeo, por exemplo, glicosilações, acetilações, fosforilações e outros, bem como outras modificações conhecidas na técnica, tanto ocorrendo naturalmente como ocorrendo não naturalmente. Um polipeptídeo pode ser uma proteína total, ou uma subsequência da mesma. Polipeptídeos particulares de interesse no contexto desta invenção são subsequências de aminoácidos compreendendo epítomos, isto é, determinantes antigénicos substancialmente responsáveis pelas propriedades imunogénicas de um polipeptídeo e sendo capazes de suscitar uma resposta imune.

Os polipeptídeos úteis na presente invenção são aqui, às vezes, referidos como proteínas de tumor ou polipeptídeos de tumor, como uma indicação de que a sua identificação é baseada pelo menos em parte nos seus níveis de expressão aumentados em amostras de tumor. Assim, um "polipeptídeo de tumor" ou "proteína de tumor" refere-se geralmente a uma

sequência de polipeptídeos da presente invenção, ou uma sequência de polinucleotídeos codificando um polipeptídeo, que é expresso numa proporção substancial de amostras de tumor, por exemplo, preferivelmente maior do que cerca de 20%, mais preferivelmente maior do que cerca de 30%, e mais preferivelmente maior do que cerca de 50% ou mais de amostras de tumor testadas, num nível que é pelo menos duas vezes, e preferivelmente pelo menos cinco vezes, maior do que o nível de expressão em tecidos normais, como determinado usando um teste representativo aqui apresentado.

Em determinadas formas de realização, os polipeptídeos úteis da presente invenção são imunogénicos, isto é, eles reagem detetavelmente num imunoteste (como uma ELISA ou teste de estímulo de células T) com antissoro e/ou células T de um paciente com cancro. Triagens para atividade imunogénica podem ser realizadas usando técnicas bem conhecidas dos peritos na técnica. Por exemplo, estas triagens podem ser realizadas usando métodos como os descritos em Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Num exemplo ilustrativo, um polipeptídeo pode ser imobilizado num suporte sólido e ser contactado com soro do paciente para permitir a ligação de anticorpos com o soro no polipeptídeo imobilizado. Soro não-ligado pode então ser removido e os anticorpos ligados detetados usando, por exemplo, proteína A rotulada com ^{125}I .

Como pode ser reconhecido pelos peritos na técnica, porções imunogénicas dos polipeptídeos aqui descritos também são úteis na presente invenção. Uma "porção imunogénica", como usado aqui, é um fragmento de um polipeptídeo imunogénico

da invenção que, sozinho, é imunologicamente reativo (isto é, liga-se especificamente) com as células B e/ou recetores de antígeno de superfície de células T que reconhecem o polipeptídeo. As porções imunogénicas podem, geralmente, ser identificadas usando técnicas bem conhecidas, como as resumidas em Paul, *Fundamental Immunology*, 3ª ed., 243-247 (Raven Press, 1993) e referências aqui citadas. Estas técnicas incluem polipeptídeos de triagem para a capacidade de reagir com anticorpos específicos de soro, antissoro e/ou linhagens de células T ou clones. Como usado aqui, antissoro e anticorpos são "específicos de antígenos" se eles se ligarem especificamente a um antígeno (isto é, reagirem com a proteína num ELISA ou outro imunoteste, e não reagirem detetavelmente com proteínas não relacionadas). Os antissoros e anticorpos podem ser preparados como descrito aqui, usando técnicas bem conhecidas.

Numa forma de realização preferida, uma porção imunogénica de um polipeptídeo útil da presente invenção é uma porção que reage com antissoro e/ou células T num nível que não é substancialmente menor do que a reatividade do polipeptídeo de comprimento completo (por exemplo, num teste ELISA e/ou de reatividade de células T). Preferivelmente, o nível de atividade imunogénica da porção imunogénica é pelo menos cerca de 50%, preferivelmente pelo menos cerca de 70% e mais preferivelmente mais do que cerca de 90% da imunogenicidade para o polipeptídeo de comprimento completo. Em alguns casos, porções imunogénicas preferidas serão identificadas como tendo um nível de atividade imunogénica maior do que o do polipeptídeo de comprimento completo correspondente, por exemplo, tendo mais do que cerca de 100% ou 150% ou mais de atividade imunogénica.

Em outras formas de realização determinadas, porções imunogénicas ilustrativas podem incluir peptídeos em que uma sequência líder N-terminal e/ou domínio de transferência são delatados. Outras porções imunogénicas ilustrativas irão conter uma deleção N- e/ou C-terminal pequena (por exemplo, 1-30 aminoácidos, preferivelmente 5-15 aminoácidos), com relação à proteína madura.

Noutra forma de realização, uma composição de polipeptídeos útil na presente invenção também pode compreender um ou mais polipeptídeos que são imunologicamente reativos com células T e/ou anticorpos gerados contra um polipeptídeo da invenção, particularmente um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácidos aqui descrita, ou um fragmento imunogénico ou variante da mesma.

Noutra forma de realização, são fornecidos polipeptídeos que compreendem um ou mais polipeptídeos que são capazes de elicitar células T e/ou anticorpos que são imunologicamente reativos com um ou mais polipeptídeos aqui descritos, ou um ou mais polipeptídeos codificados por sequências de ácido nucleico contíguas contidas nos polinucleotídeos aqui descritos, ou fragmentos imunogénicos ou variantes dos mesmos.

Os polipeptídeos podem compreender uma sequência de sinal (ou líder) na extremidade N-terminal da proteína, que, co-traducionalmente ou pós-traducionalmente, dirige a transferência da proteína. O polipeptídeo também pode ser conjugado a um ligante ou outra sequência para facilidade de síntese, purificação ou identificação do polipeptídeo (por exemplo, poli His), ou para melhorar a ligação do

polipeptídeo a um suporte sólido. Por exemplo, um polipeptídeo pode ser conjugado a uma região Fc de imunoglobulina.

Noutras formas de realização ilustrativas, um polipeptídeo pode ser um polipeptídeo de fusão que compreende polipeptídeos múltiplos como aqui descrito, ou que compreende pelo menos um polipeptídeo como aqui descrito e uma sequência não relacionada, como uma proteína de tumor conhecida. Um parceiro de fusão pode, por exemplo, ajudar no suprimento de epítomos auxiliares T (um parceiro de fusão imunológico), de preferência epítomos auxiliares T reconhecidos por humanos, e pode ajudar na expressão da proteína (um melhorador de expressão) em rendimentos mais elevados do que os da proteína recombinante nativa. Determinados parceiros de fusão preferidos são tanto parceiros de fusão intensificadores de expressão como imunológicos. Outros parceiros de fusão podem ser selecionados de modo a aumentar a solubilidade do polipeptídeo ou para possibilitar que o polipeptídeo seja marcado nos compartimentos intracelulares desejados. Ainda outros parceiros de fusão incluem etiquetas de afinidade, que facilitam a purificação do polipeptídeo.

Os polipeptídeos de fusão podem, geralmente, ser preparados usando técnicas padrão, incluindo conjugação química. Preferivelmente, um polipeptídeo de fusão é expresso como um polipeptídeo recombinante, permitindo a produção de níveis aumentados, com relação a polipeptídeo não fundido, num sistema de expressão. Brevemente, sequências de ADN que codifica os componentes de polipeptídeo podem ser reunidas separadamente e ligadas num vetor de expressão apropriado. A extremidade 3' da sequência de ADN que codifica um

componente de polipeptídeo é ligada, com ou sem um ligante de peptídeo, à extremidade 5' de uma sequência de ADN que codifica o segundo componente de polipeptídeo de modo que os quadros de leitura das sequências se encontrem em fase. Isto permite a tradução num polipeptídeo de fusão única que retém a atividade biológica de ambos os polipeptídeos componentes.

Uma sequência de ligante de peptídeo pode ser empregada para separar os primeiro e segundo componentes de polipeptídeo por uma distância suficiente para assegurar que cada polipeptídeo se duplique nas suas estruturas secundárias e terciárias. Esta sequência de ligante de peptídeo é incorporada no polipeptídeo de fusão usando técnicas padrão bem conhecidas na técnica. Sequências de ligante de peptídeo apropriadas podem ser selecionadas com base nos seguintes fatores: (1) sua capacidade para adotar uma conformação estendida flexível; (2) sua incapacidade de adotar uma estrutura secundária que pode interagir com epítomos funcionais nos primeiro e segundo polipeptídeos; e (3) a falta de resíduos hidrofóbicos ou carregados que podem reagir com os epítomos funcionais de polipeptídeos. Sequências de ligante de peptídeo preferidas contêm resíduos de Gly, Asn e Ser. Outros aminoácidos quase neutros, como Thr e Ala também podem ser usados na sequência de ligante. Sequências de aminoácidos que podem ser utilmente empregadas como ligantes incluem as descritas em Maratea *et al.*, Gene 40:39-46, 1985; Murphy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262, 1986; Patente nos EUA nº 4,935,233 e Patente US nº 4,751,180. A sequência de ligante pode, geralmente, ter de 1 a cerca de 50 aminoácidos de comprimento. As sequências de ligante não são requeridas quando os primeiro e segundo polipeptídeos

têm regiões de aminoácidos Nterminais não essenciais que podem ser usadas para separar os domínios funcionais e evitar uma interferência estereoquímica.

As sequências de ADN ligadas são ligadas de modo operativo a elementos reguladores traducionais e transcripcionais apropriados. Os elementos reguladores responsáveis pela expressão de ADN estão localizados somente em 5' na sequência de ADN que codifica os primeiros polipeptídeos. Similarmente, dois codões de paragem requeridos para terminar os sinais de terminação de tradução e de transcrição estão somente presentes em 3' na sequência de ADN que codifica o segundo polipeptídeo.

O polipeptídeo de fusão pode compreender um polipeptídeo, como aqui descrito, junto com uma proteína imunogénica não relacionada, como uma proteína imunogénica capaz de elicitar uma resposta de evocação. Exemplos destas proteínas incluem proteínas de tétano, tuberculose e de hepatite (ver, por exemplo, Stoute et al. New Engl. J. Med., 336:86-91, 1997).

Numa forma de realização preferida, o parceiro de fusão imunológico é derivado de uma *Mycobacterium sp.*, como um fragmento de Ra12 derivado de *Mycobacterium tuberculosis*. As composições de Ra12 e métodos para seu uso na melhoria da expressão e/ou imunogenicidade de sequências de polinucleotídeos/polipeptídeos heterólogos são descritas no pedido de patente nos EUA nº 60/158,585. Brevemente, Ra12 refere-se a uma região de polinucleotídeos que é uma subsequência de um ácido nucleico de *Mycobacterium tuberculosis* MTB32A. MTB32A é uma serina protease de peso molecular de 32 KD codificada por um gene em estirpes

virulentas e avirulentas de *M. tuberculosis*. A sequência de nucleotídeos e sequência de aminoácidos de MTB32A são descritas (por exemplo, no pedido de patente nos EUA 60/158,585; ver também, Skeiky *et al.*, *Infection and Immun.* (1999) 67:3998-4007). Os fragmentos C-terminais da sequência de codificação de MTB32A expressam em altos níveis e permanecem como polipeptídeos solúveis por todo o processo de purificação. Além disso, Ra12 pode melhorar a imunogenicidade de polipeptídeos imunogênicos heterólogos com os quais está fundido. Um polipeptídeo de fusão de Ra12 preferido compreende um fragmento C-terminal de 14 KD correspondente a resíduos de aminoácidos 192 a 323 de MTB32A. Outros polinucleotídeos de Ra12 preferidos compreendem geralmente pelo menos cerca de 15 nucleotídeos consecutivos, pelo menos cerca de 30 nucleotídeos, pelo menos cerca de 60 nucleotídeos, pelo menos cerca de 100 nucleotídeos, pelo menos cerca de 200 nucleotídeos, ou pelo menos cerca de 300 nucleotídeos que codificam uma porção de um polipeptídeo de Ra12. Os polinucleotídeos de Ra12 podem compreender uma sequência nativa (isto é, uma sequência endógena que codifica um polipeptídeo de Ra12 ou uma porção do mesmo) ou podem compreender uma variante desta sequência. Variantes de polinucleotídeos de Ra12 podem conter uma ou mais substituições, adições eliminações e/ou inserções de modo que a atividade biológica do polipeptídeo de fusão codificado não é substancialmente diminuída, com relação a um polipeptídeo de fusão compreendendo um polipeptídeo de Ra12 nativo. As variantes demonstram, preferivelmente, pelo menos cerca de 70% de identidade, mais preferivelmente pelo menos cerca de 80% de identidade e mais preferivelmente pelo menos cerca de 90% de identidade com uma sequência de polinucleotídeos que

codifica um polipeptídeo de Ral2 nativo ou uma porção do mesmo.

Noutras formas de realização preferidas, um parceiro de fusão imunológico é derivado da proteína D, uma proteína de superfície da bactéria Gram-negativa *Haemophilus influenza B* (WO 91/18926). Preferivelmente, um derivado de proteína D compreende aproximadamente a primeira terça parte da proteína (por exemplo, os primeiros 100-110 aminoácidos N-terminais), e um derivado de proteína D pode ser lipidado. Em determinadas formas de realização preferidas, os primeiros 109 resíduos de um parceiro de fusão de lipoproteína D são incluídos no N-término para fornecer um polipeptídeo com epítomos de células T exógenos adicionais e para aumentar o nível de expressão em *E. coli* (funcionando, assim, como um intensificador de expressão). A cauda do lipídeo assegura uma ótima apresentação do antígeno em células apresentando antígenos. Outros parceiros de fusão incluem a proteína não estrutural do vírus de influenza, NS1 (hemaglutinina). Tipicamente, os 81 aminoácidos N-terminais são usados, apesar de fragmentos diferentes que incluem epítomos auxiliares T poderem ser usados.

Noutra forma de realização, o parceiro de fusão imunológico é a proteína conhecida como LYTA, ou uma porção da mesma (preferivelmente uma porção C-terminal). LYTA é derivada de *Streptococcus pneumoniae*, que sintetiza uma N-acetil-L-alanina amidase conhecida como amidase LYTA (codificada pelo gene *LytA*; Gene 43: 265-292, 1986). LYTA é uma autolisina que especificamente degrada determinadas ligações na estrutura principal de peptidoglicano. O domínio C-terminal da proteína LYTA é responsável pela

afinidade para colina ou para alguns análogos de colina como DEAE. Esta propriedade foi explorada para o desenvolvimento de plasmídeos que expressam C-LYTA de *E. coli*, úteis para expressão de proteínas de fusão. A purificação de proteínas híbridas contendo o fragmento de C-LYTA como o término amino é descrita (ver Biotechnology 10: 795-798, 1992). Numa forma de realização preferida, uma porção de repetição de LYTA pode ser incorporada num polipeptídeo de fusão. Uma porção de repetição é encontrada no início da região C-terminal no resíduo 178. Uma porção de repetição particularmente preferida incorpora os resíduos 188-305.

Ainda outra forma de realização ilustrativa envolve polipeptídeos de fusão, e os polinucleotídeos que codificam os mesmos, em que o parceiro de fusão compreende um sinal de marcação capaz de dirigir um polipeptídeo no compartimento endossômico/lisossômico, como descrito na patente US nº 5,633,234. Um polipeptídeo imunogénico da invenção, quando fundido com este sinal de marcação, irá se associar mais eficazmente com as moléculas de classe II de MHC e, assim, fornecer estímulo *in vivo* melhorado de células T de CD4⁺ específicas para o polipeptídeo.

Os polipeptídeos úteis na presente invenção são preparados usando qualquer uma de uma variedade de técnicas sintéticas e/ou recombinantes bem conhecidas. Polipeptídeos, porções e outras variantes geralmente menores do que cerca de 150 aminoácidos podem ser gerados por meios sintéticos, usando técnicas bem conhecidas dos peritos na técnica. Num exemplo ilustrativo, estes polipeptídeos são sintetizados usando qualquer uma das técnicas de fase sólida comercialmente disponíveis, como o método de síntese de fase sólida de

Merrifield, onde os aminoácidos são sequencialmente adicionados a uma cadeia de aminoácidos em crescimento. Ver Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146, 1963. Equipamento para síntese automática de polipeptídeos encontra-se comercialmente disponível a partir de fornecedores como Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, CA), e pode ser operado de acordo com as instruções do fabricante.

Em geral, as composições de polipeptídeos (incluindo polipeptídeos de fusão) úteis na presente invenção são isoladas. Um polipeptídeo "isolado" é um que é removido do seu ambiente original. Por exemplo, um polipeptídeo ou proteína de ocorrência natural é isolado se for separado de algum ou de todos os materiais co-existentes no sistema natural. Preferivelmente, estes polipeptídeos também são purificados, por exemplo, são pelo menos cerca de 90% puros, mais preferivelmente pelo menos cerca de 95% puros e mais preferivelmente pelo menos cerca de 99% puros.

Noutros aspetos, são proporcionados compostos compreendendo um ou mais polinucleotídeos que codificam um antígeno de polipeptídeo como especificado aqui acima. Os termos "ADN" e "polinucleotídeo" são usados essencialmente intercambiavelmente aqui para se referirem a uma molécula de ADN que é isolada livre de ADN genómico total de uma espécie particular. "Isolado", como usado aqui, significa que um polinucleotídeo está substancialmente fora de outras sequências de codificação, e que a molécula de ADN não contém grandes porções de ADN de codificação não relacionada, como fragmentos cromossómicos grandes ou outros genes funcionais ou regiões de codificação de polipeptídeos. Naturalmente, isto refere se à molécula de

ADN como originalmente isolada, e não exclui genes ou regiões de codificação posteriormente adicionadas ao segmento pela mão do homem.

Os polinucleotídeos podem compreender uma sequência nativa (isto é, uma sequência endógena que codifica um polipeptídeo/proteína útil na presente invenção ou uma porção dos mesmos) ou podem compreender uma sequência que codifica uma variante ou derivado, preferivelmente, e derivado ou variante imunogénico, desta sequência. Tipicamente, as variantes de polinucleotídeos conterão uma ou mais substituições, adições, eliminações e/ou inserções, preferivelmente de modo que a imunogenicidade do polipeptídeo codificado pelo polinucleotídeo variante não seja substancialmente diminuída com relação a um polipeptídeo codificado por uma sequência de polinucleotídeos especificamente descrita aqui). O termo "variantes" também deve ser entendido como englobando genes homólogos de origem xenogénica.

Em determinadas formas de realização preferidas, os polinucleotídeos descritos acima, por exemplo, variantes de polinucleotídeos, fragmentos e sequências de hibridização, codificam polipeptídeos que são imunogenicamente reativos cruzados com um polipeptídeo antigénico ou imunogénico, como descrito aqui acima. Em outras formas de realização preferidas, estes polinucleotídeos codificam polipeptídeos que têm um nível de atividade imunogénica de pelo menos cerca de 50%, preferivelmente pelo menos cerca de 70%, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 90% do que para uma sequência de polipeptídeos específica aqui descrita.

Os polinucleotídeos divulgados, ou fragmentos dos mesmos, com relação ao comprimento da sequência de codificação propriamente dita, podem ser combinados com outras sequências de ADN, como promotores, sinais de poliadenilação, sítios de enzima de restrição adicionais, sítios de clonagem múltiplos, outros segmentos de codificação, e outros, de modo que o seu comprimento total pode variar consideravelmente. Assim, contempla-se que um fragmento de ácido nucleico de qualquer comprimento dado pode ser empregado, com o comprimento total preferivelmente limitado pela facilidade de preparação e uso no protocolo de ADN recombinante pretendido. Por exemplo, contempla-se que segmentos de polinucleotídeos ilustrativos com comprimentos totais de cerca de 10.000, cerca de 5.000, cerca de 3.000, cerca de 2.000, cerca de 1.000, cerca de 500, cerca de 200, cerca de 100, cerca de 50 pares de bases de comprimento, e outros, (incluindo todos os comprimentos intermediários) são úteis em muitas implementações desta invenção.

As composições de polinucleotídeos úteis na presente invenção podem ser identificadas, preparadas e/ou manipuladas usando qualquer uma dentre várias técnicas bem estabelecidas (ver geralmente, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1989, e outras referências semelhantes). Por exemplo, um polinucleotídeo pode ser identificado, como descrito em maiores detalhes abaixo, triando-se um microconjunto de ADNc para expressão associada a tumor (isto é, expressão que é pelo menos duas vezes maior num tumor do que em tecido normal, como determinado usando um teste representativo fornecido aqui). Estas triagens podem ser

realizadas, por exemplo, usando a tecnologia de microconjunto de Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA), de acordo com as instruções do fabricante (e essencialmente como descrito por Schena *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 93:10614-10619, 1996 e Heller *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 94:2150-2155, 1997). Alternativamente, os polinucleotídeos podem ser amplificados a partir de ADNc preparado a partir de células que expressam as proteínas aqui descritas, como células de tumor.

Muitos processos dependentes de gabarito encontram-se disponíveis para amplificar uma sequência de marcação de interesse presente numa amostra. Um dos melhores métodos de amplificação conhecidos é a reação de cadeia de polimerase (PCR™) que é descrita em detalhes nas patentes nos EUA nº 4,683,195, 4,683,202 e 4,800,159. Brevemente, em PCR™, duas sequências de iniciadores são preparadas as quais são complementares a regiões em estirpes complementares opostas da sequência de marcação. Um excesso de trifosfatos desoxinucleosídeos é adicionado a uma mistura de reação em conjunto com uma ADN polimerase (por exemplo, Taq polimerase). Se a sequência de marcação estiver presente numa amostra, os iniciadores se ligarão à marcação e a polimerase fará com que os iniciadores sejam estendidos ao longo da sequência de marcação por adição em nucleotídeos. Por aumento e diminuição da temperatura da mistura de reação, os iniciadores estendidos dissociar-se-ão da marcação para formar produtos da reação, os iniciadores em excesso se ligarão à marcação e ao produto da reação e o processo é repetido. Preferivelmente, um procedimento de transcrição reversa e amplificação PCR™ pode ser realizado a fim de quantificar a quantidade de ARNm amplificado.

Metodologias de reação de cadeia de polimerase são bem conhecidas na técnica.

Qualquer um dentre vários outros processos dependentes de gabarito, muitos dos quais são variações da técnica de amplificação PCRTM, são prontamente conhecidos e disponíveis na técnica. Ilustrativamente, alguns destes métodos incluem a reação de cadeia de ligase (referida como LCR), descrita, por exemplo, na publicação do Ped. de Patente Eur. n°. 320,308 e a Patente nos EUA n° 4,883,750; Qbeta Replicase, descreveu na Publicação de Pedido de PCT internacional n° PCT/US87/00880; Strand Displacement Amplification (SDA) and Repair Chain Reaction (RCR). Ainda outros métodos de amplificação são descritos no Pedido de Patente britânica n° 2 202 328, e Pedido de PCT n° PCT/US89/01025. Outros procedimentos de amplificação de ácido nucleico incluem sistemas de amplificação baseados em transcrição (TAS) (publicação do pedido de PCT internacional n° WO 88/10315), incluindo amplificação baseada em sequência de ácido nucleico (NASBA) e 3SR. A Publicação de pedido de Patente Europeia n° 329,822 descreve um processo de amplificação de ácido nucleico envolvendo ARN de cadeia simples de síntese cíclica ("ARNss"), ADNss, e ADN de cadeia dupla (ADNds). A Publicação do Pedido de PCT n° WO 89/06700 descreve um esquema de amplificação de sequência de ácido nucleico baseado na hibridização de uma sequência de promotor/iniciador num ADN de cadeia simples de marcação

("ADNss") seguido por transcrição de muitas cópias de ARN da sequência. Outros métodos de amplificação como "RACE" (Frohman, 1990), e "PCR unilateral" (Ohara, 1989) também são bem conhecidos dos peritos na técnica.

Uma porção amplificada de um polinucleotídeo da presente invenção pode ser usada para isolar um gene de comprimento completo de uma biblioteca apropriada (por exemplo, uma biblioteca de ADNc de tumor) usando técnicas bem conhecidas. Nestas técnicas, uma biblioteca (de ADNc ou genómica) é triada usando uma ou mais sondas de polinucleotídeos ou iniciadores apropriados para amplificação. Preferivelmente, uma biblioteca é selecionada por tamanho para incluir moléculas grandes. Bibliotecas iniciadas aleatórias também podem ser preferidas para identificar regiões 5' e a montante de genes. As bibliotecas genómicas são preferidas para obter intrões e estender as sequências de 5'.

Para técnicas de hibridização, uma sequência parcial pode ser rotulada (por exemplo, por deslocamento do corte ou rotulação final com ^{32}P) usando técnicas bem conhecidas. Uma biblioteca bacteriana ou de bacteriófagos é então geralmente triada por filtros de hibridização contendo colónias bacterianas desnaturadas (ou placas de fago contendo tecidos finos) com a sonda rotulada (ver Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1989). Colónias de hibridização ou placas são selecionadas e expandidas, e o ADN é isolado para outras análises. Clones de ADNc podem ser analisados para determinar a quantidade de sequência adicional, por exemplo, por PCR, usando um iniciador da sequência parcial e um iniciador do vetor. Mapas de restrição e sequências parciais podem ser gerados para identificar um ou mais clones em sobreposição. A sequência completa pode então ser determinada usando técnicas padrão, que podem envolver a geração de um

conjunto de clones de eliminação. As sequências de sobreposição resultantes podem então se reunir numa sequência contígua única. Uma molécula de ADNc de comprimento completo pode ser gerada ligando fragmentos apropriados, usando técnicas bem conhecidas.

Alternativamente, as técnicas de amplificação, como as descritas acima, podem ser úteis para obter uma sequência de codificação de comprimento completo a partir de uma sequência de ADNc parcial. Uma destas técnicas de amplificação é o PCR inverso (ver Triglia *et al.*, Nucl. Acids Res. 16:8186, 1988), que usa enzimas de restrição para gerar um fragmento na região conhecida do gene. O fragmento então é circularizado por ligação intramolecular e usado como um gabarito para PCR com iniciadores divergentes derivados da região conhecida. Numa abordagem alternativa, sequências adjacentes a uma sequência parcial podem ser recuperadas por amplificação com um iniciador numa sequência de ligante e um iniciador específico numa região conhecida. As sequências amplificadas são tipicamente submetidas a um segundo ciclo de amplificação com o mesmo iniciador ligante e um segundo iniciador específico na região conhecida. Uma variação neste procedimento, que emprega dois iniciadores que iniciam extensão em direções opostas da sequência conhecida, é descrita no documento WO 96/38591. Uma outra técnica é conhecida como "amplificação rápida de extremidades de ADNc" ou RACE. Esta técnica envolve o uso de um iniciador interno e um iniciador externo, que hibridiza numa região polyA ou sequência de vetores, para identificar sequências que são 5' e 3' de uma sequência conhecida. Técnicas adicionais incluem PCR de captura (Lagerstrom *et al.*, PCR Methods Applic. 1:111-19, 1991) e PCR "walking" (Parker *et al.*, Nucl. Acids. Res.

19:3055-60, 1991). Outros métodos que empregam a amplificação também podem ser empregados para obter uma sequência de ADNc de comprimento completo.

Em alguns casos, é possível obter uma sequência de ADNc de comprimento completo por análises de sequências fornecidas numa base de dados de etiquetas da sequência (EST) expressa, como as disponíveis de GenBank. Pesquisas para sobrepor ESTs podem ser geralmente realizadas usando programas bem conhecidos (por exemplo, buscas NCBI BLAST) e os ESTs podem ser usados para gerar uma sequência de comprimento completo contígua. Sequências de ADN de comprimento completo também podem ser obtidas por análises de fragmentos genómicos.

Noutras formas de realização, as sequências de polinucleotídeos ou fragmentos das mesmas que codificam os polipeptídeos descritos acima, ou proteínas de fusão ou equivalentes funcionais das mesmas, podem ser usadas em moléculas de ADN recombinante para dirigir a expressão de um polipeptídeo em células hospedeiras apropriadas. Devido à degeneração inerente do código genético, outras sequências de ADN que codificam substancialmente a mesma ou uma sequência de aminoácidos funcionalmente equivalente podem ser produzidas e estas sequências podem ser usadas para clonar e expressar um dado polipeptídeo.

As sequências que codificam um polipeptídeo desejado podem ser sintetizadas, no todo ou em parte, usando métodos de química bem conhecidos na técnica (ver Caruthers, M. H. *et al.* (1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215-223, Horn, T. *et al.* (1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232).

A fim de expressar um polipeptídeo desejado, as sequências de nucleotídeos que codificam o polipeptídeo, ou equivalentes funcionais, podem ser inseridas no vetor de expressão apropriado, isto é, um vetor que contém os elementos necessários para a transcrição e tradução da sequência de codificação inserida. Métodos bem conhecidos dos peritos na técnica podem ser usados para construir vetores de expressão contendo sequências que codificam um polipeptídeo de interesse e elementos de controlo traducionais e transcripcionais apropriados. Estes métodos incluem técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas e recombinação genética *in vivo*. Estas técnicas são descritas, por exemplo, em Sambrook, J. *et al.* (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, Nova Iorque, e Ausubel, F. M. *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nova Iorque.

Os "elementos de controlo" ou "sequências reguladoras" presentes num vetor de expressão são as regiões não-traduzidas do vetor - intensificadores, promotores, regiões não-traduzidas 5' e 3' - que interagem com proteínas celulares hospedeiras para realizar transcrição e tradução. Estes elementos podem variar na sua potência e especificidade. Dependendo do sistema de vetor e hospedeiro utilizado, qualquer número de elementos de tradução e transcrição apropriados, incluindo promotores constitutivos e indutíveis, podem ser usados.

Em células de mamíferos, vários sistemas de expressão baseados em vírus encontram-se geralmente disponíveis. Por exemplo, nos casos onde um adenovírus é usado como um vetor de expressão, sequências que codificam um polipeptídeo de

interesse podem ser ligadas num complexo de transcrição/tradução de adenovírus consistindo na última sequência líder tríplice e de promotor. A inserção numa região E1 ou E3 não essencial do genoma viral pode ser usada para obter um vírus viável que é capaz de expressar o polipeptídeo em células hospedeiras infetadas (Logan, J. e Shenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3655-3659). Além disso, intensificadores de transcrição, como o melhorador do vírus do sarcoma Rous (RSV), podem ser usados para aumentar a expressão em células hospedeiras de mamíferos.

Sinais de iniciação específicos também podem ser usados para obter uma tradução mais eficiente de sequências que codificam um polipeptídeo de interesse. Estes sinais incluem o codão de iniciação ATG e sequências adjacentes. Nos casos onde as sequências que codificam o polipeptídeo, seu codão de iniciação, e sequências a montante são inseridas no vetor de expressão apropriado, nenhum sinal de controlo traducional ou transcripcional adicional pode ser necessário. No entanto, em casos onde somente a sequência de codificação, ou uma porção da mesma, é inserida, sinais de controlo traducionais exógenos, incluindo o codão de iniciação ATG, devem ser fornecidos. Além disso, o codão de iniciação deve estar no quadro de leitura correto para assegurar a tradução do inserto total. Elementos traducionais exógenos e codões de iniciação podem ser de origens variadas, tanto naturais como sintéticas. A eficácia da expressão pode ser melhorada pela inclusão de intensificadores que são apropriados para o sistema de células particular que se usa, como os descritos na literatura (Scharf, D. *et al.* (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125-162).

Vários protocolos para detetar e medir a expressão de produtos codificados por polinucleotídeos, usando tanto anticorpos policlonais como monoclonais específicos para o produto, são conhecidos na técnica. Exemplos incluem teste imunossorvente ligado a enzima (ELISA), radioimunoteste (RIA) e classificação de células ativadas por fluorescência (FACS). Um imunoteste baseado em anticorpos monoclonais, de dois sítios, utilizando anticorpos monoclonais reativos a dois epítomos não-interferentes num dado polipeptídeo, pode ser preferidos para algumas aplicações, mas um teste de ligação competitivo também pode ser empregado. Estes e outros testes são descritos, dentre outros locais, em Hampton, R. *et al.* (1990; *Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St Paul. Minn.) e Maddox, D. E. *et al.* (1983; *J. Exp. Med.* 158:1211-1216).

Composições Farmacêuticas e Métodos

Será compreendido que, se desejado, os compostos aqui descritos podem ser administrados em combinação com outras modalidades terapêuticas, como compostos ou terapias antimicrobianos, antivirais e antifúngicos, várias terapêuticas baseadas em ADN, terapêuticas baseadas em ARN, terapêuticas baseadas em polipeptídeos e/ou com outros imunofatores. De facto, essencialmente qualquer outro componente também pode ser incluído, dado que o(s) componente(s) adicional(ais) não causa(m) um efeito adverso significativo quando em contacto com as células de marcação ou tecidos hospedeiros. As composições podem, assim, ser libertadas em conjunto com vários outros agentes como requerido ou desejado para a(s) forma(s) de realização específica(s) da invenção a ser implementada(s). Ilustrativamente, as composições farmacêuticas da invenção podem incluir, ou serem usadas em conjunto com, uma ou mais

proteínas terapêuticas que codificam ADN, ARNs antissentido, ribozimas ou semelhantes.

Os métodos aqui descritos são aplicáveis contra essencialmente qualquer tipo de agente infeccioso, incluindo bactérias, vírus, parasitas e fungos. Ilustrativamente, a invenção é útil para o tratamento profilático e/ou terapêutico de infecções bacterianas por espécies de *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Candida*, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Chlamydia*, *Mycoplasma* e inúmeras outras. Condições virais ilustrativas que podem ser tratadas de acordo com a invenção incluem as causadas, por exemplo, por vírus de influenza, adenovírus, vírus de parainfluenza, rinovírus, vírus sincicial respiratório (RSVs), vírus do herpes, citomegalovírus, vírus de hepatite, por exemplo, vírus de hepatite B e C, e outros. Fungos representativos incluem, por exemplo, *Aspergillus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, e outros.

Também são aqui descritos métodos para o tratamento de indivíduos, particularmente indivíduos imunocomprometidos que desenvolveram ou estão em risco de desenvolver infecções, como infecções virais e bacterianas nosocomiais. Cerca de 2 milhões dentre os 40 milhões de indivíduos hospitalizados todos os anos desenvolvem infecção nosocomial durante a sua permanência e cerca de 1% destes, ou cerca de 400.000 pacientes, desenvolvem pneumonia nosocomial, sendo que acima de 7.000 morrem. Isto torna a pneumonia nosocomial a causa líder de morte em infecções adquiridas em hospitais. Assim, esta modalidade atende a uma necessidade significativa de abordagens profiláticas eficazes no tratamento de infecções nosocomiais.

Também são aqui descritos tratamentos profiláticos para pacientes imunocomprometidos, como pacientes com HIV positivo, que desenvolveram ou estão em risco de desenvolver pneumonia tanto de uma infecção oportunística como da reativação de uma infecção latente ou suprimida. Em 1992, cerca de 20.000 casos de infecções por *Pneumocystis carinii* em pacientes com SIDA foram descritos somente nos EUA. Além disso, 60-70% de todos os pacientes com SIDA adquirem *P. carinii* nalgum período durante a sua enfermidade. Assim, são aqui descritos métodos profiláticos eficazes para esta população em risco.

Os métodos aqui descritos podem ser usados para tratar outras populações de pacientes que podem estar imunocomprometidos e/ou em risco de desenvolver doenças infecciosas, incluindo, por exemplo, pacientes com fibrose cística, doença pulmonar obstrutiva crónica e outros pacientes imunocomprometidos e/ou institucionalizados.

Os compostos e composições aqui descritos podem ser empregados (sem o antígeno exógeno) em métodos para tratar, melhorar ou substancialmente prevenir condições e distúrbios alérgicos, como sinusite, rinosinusite crónica, asma, dermatite atópica e psoríase. Esta abordagem baseia-se pelo menos em parte na capacidade dos compostos em ativar a produção de citocinas de células de marcação que podem competir com respostas de citocina do tipo alérgicas estereotípicas caracterizadas por produção de IL-4 ou uma hipersensibilidade à atividade de IL-4. A administração de certos compostos mono- e dissacarídeos aqui descritos resulta em expressão de IFN-gama e IL-12 de células que apresentam e processam antígenos, bem como outras células,

resultando em regulação descendente de citocinas associadas com respostas alérgicas como IL-4, 5, 6, 10 e 13.

Os compostos e composições aqui descritos podem ser empregados (sem antígeno exógeno) em métodos para tratar condições e doenças autoimunes. Os compostos serão tipicamente selecionados dentre os capazes de antagonizar, inibir ou de outro modo modular negativamente um ou mais recetores como Toll, particularmente Tlr2 e/ou Tlr4, de modo que uma resposta autoimune associada com uma dada condição é melhorada ou substancialmente evitada. Ilustrativamente, os métodos podem ser usados no tratamento de condições como doença do intestino inflamatória, artrite reumatoide, artrite crónica, esclerose múltipla e psoríase.

Os compostos da presente invenção também podem ser usados como adjuvantes e imunoefetores que melhoram a geração de anticorpos em animais imunizados, estimulam a produção de citocinas e estimulam uma resposta imune mediada por células incluindo uma resposta de linfócito T citotóxica.

Nos métodos aqui descritos, por exemplo, para efetuar a resposta imune de um indivíduo, os compostos e composições aqui descritos podem ser formulados com um veículo farmacologicamente aceitável para injeção ou ingestão. Como usado aqui, "veículo farmacologicamente aceitável" significa um meio que não interfere com a atividade imunomoduladora do ingrediente ativo e não é tóxico para o paciente ao qual ele é administrado. Veículos farmacologicamente aceitáveis incluem emulsões óleo-em-água ou água-em-óleo, composições aquosas, lipossomas, microcontas e microsommas. Por exemplo, o veículo pode ser uma microesfera ou micropartícula tendo um composto desta invenção na matriz

da esfera ou partícula ou adsorvido na superfície da esfera ou partícula. O veículo também pode ser uma solução aquosa ou dispersão micelar contendo trietilamina, trietanolamina ou outro agente que torne a formulação alcalina por natureza, ou uma suspensão contendo hidróxido de alumínio, hidróxido de cálcio, fosfato de cálcio ou adsorvato de tirosina. Os veículos também podem incluir todos os solventes, meios de dispersão, veículos, revestimentos, diluentes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardamento de absorção, tampões, soluções veículos, suspensões, coloides, e outros. O uso destes meios e agentes para substâncias ativas farmacêuticas é bem conhecido na técnica. Exceto que, à medida que quaisquer outros meios convencionais ou agentes sejam incompatíveis com o ingrediente ativo, o seu uso nas composições terapêuticas é contemplado.

As formulações dos compostos da presente invenção, que podem ser administradas parenteralmente, isto é, intraperitonealmente, subcutaneamente ou intramuscularmente, incluem os seguintes veículos preferidos. Exemplos de veículos preferidos para uso subcutâneo incluem uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) e 0,01-0,1% de trietanolamina em água USP para injeção. Veículos apropriados para injeção intramuscular incluem 10% de etanol USP, 40% de propileno glicol e o resto uma solução isotônica aceitável como 5% de dextrose.

Exemplos de veículos preferidos para uso intravenoso incluem 10% de etanol USP, 40% de propileno glicol USP e o restante água USP para injeção. Outro veículo aceitável inclui 10% de etanol USP e água USP para injeção; ainda outro veículo aceitável é 0,01-0,1% de trietanolamina em

água USP para injeção. Solventes parenterais farmacologicamente aceitáveis são selecionados de modo a fornecer uma solução ou dispersão que pode ser filtrada através de um filtro de 5 micrómetros sem remover o ingrediente ativo.

Um método de administração preferido das composições aqui descritas é administração mucosal, particularmente a administração intranasal ou administração por inalação (administração pulmonar). A libertação do fármaco pulmonar pode ser obtida por várias experiências diferentes, incluindo nebulizadores líquidos, inaladores de dose medida baseados em aerossol (MDIs) e dispositivos de dispersão de pó seco. As composições para uso em administrações deste tipo são tipicamente pós secos ou aerossóis. Para administração de aerossóis, que é o método preferido de administração desta invenção, as composições são libertadas por inaladores, sendo alguns tipos descritos abaixo.

Os pós secos contêm, além do ingrediente ativo, um veículo, um melhorador de absorção, e, opcionalmente, outros ingredientes. O veículo é, por exemplo, um mono-, di- ou polissacarídeo, um álcool de açúcar ou outro poliol. Veículos apropriados incluem lactose, glicose, rafinose, melezitose, lactilol, maltitol, trehalose, sacarose, manitol; e amido. A lactose é particularmente preferida, especialmente na forma do seu monohidrato. Também estão incluídos intensificadores de absorção como polipeptídeos, tensoativos, alquil glicosídeos, sais de amina de ácidos graxos ou fosfolipídeos. Os ingredientes da formulação devem, tipicamente, estar numa forma finamente dividida, isto é, o seu diâmetro médio de volume deve geralmente ser de cerca de 30 a cerca de 200 micrómetros, como medido por

um instrumento de difração a laser ou um contador coulter. O tamanho de partícula desejado pode ser produzido usando métodos conhecidos na técnica, por exemplo, moagem, micronização ou precipitação direta.

A via intranasal de administração fornece numerosas vantagens sobre muitas outras formas de administração para os compostos desta invenção. Por exemplo, uma vantagem de administração intranasal é a conveniência. Um sistema injetável requer esterilização da seringa hipodérmica e da instituição, ocasionando preocupações entre a equipa médica sobre o risco de contrair doença ao ser acidentalmente espetado por uma agulha contaminada. Requisitos rigorosos para o descarte seguro da agulha e da seringa usadas também devem ser impostos à instituição. Em contraste, a administração intranasal requer pouco tempo por parte do paciente e da equipa médica em serviço, sendo bem menos complicada para a instituição do que a forma injetável.

Uma segunda vantagem importante de administração nasal é a aceitação pelo paciente do sistema de libertação do fármaco. A administração intranasal é percebida como não-invasiva, não é acompanhada de dor, não tem nenhum efeito secundário posterior significativo e produz uma gratificação de alívio imediato no paciente que apresenta o sintoma. Isto é de vantagem particular quando o paciente é uma criança. Outra consideração importante é que o paciente pode ser capaz de autoadministrar a(s) dosagem(ens) prescrita(s) de pulverização nasal.

Para administração intranasal, as composições desta invenção podem ser formuladas como líquidos ou como sólidos. Estas composições podem conter um ou mais

adjuvantes, agentes para melhorar a absorção dos ingredientes ativos por permeação através da membrana nasal, e (para composições líquidas) um diluente aquoso, por exemplo água. Alternativamente, o diluente pode compreender um tampão aquoso como tampão fosfato. A composição pode ainda opcionalmente incluir um ou mais álcoois polihídricos e um ou mais agentes conservantes como, por exemplo, gentamicina, bacitracina (0,005%), ou cresol. As composições podem ser administradas na cavidade nasal na forma de uma pulverização, usando um atomizador, nebulizador, pulverizador, conta-gotas ou outro dispositivo que assegure o contacto da solução com a membrana da mucosa nasal. O dispositivo pode ser um simples, como um pulverizador nasal simples que pode ser usado pelo paciente, ou pode ser um instrumento mais elaborado para administração mais precisa das composições, que pode ser usado num consultório médico ou numa instalação para fins medicinais.

Composições em pó nasais podem ser preparadas misturando se o agente ativo e o excipiente, ambos possuindo o tamanho de partícula desejado. Primeiramente, uma solução do agente ativo e dos excipientes de ciclodextrina preparada, seguido por precipitação, filtração e pulverização. Também é possível remover o solvente por secagem por congelamento, seguido por pulverização dos pós no tamanho de partícula desejado usando técnicas convencionais, conhecidas da literatura farmacêutica. A etapa final é a classificação por tamanho, por exemplo, peneirando, para obter partículas que estão preferivelmente entre 30 e 200 micrómetros de diâmetro. Os pós podem ser administrados usando um insuflador nasal, ou podem ser colocados numa cápsula colocada num dispositivo de insuflação ou inalação. Uma

agulha é penetrada através da cápsula para produzir poros no topo e no fundo da cápsula e ar é enviado para soprar as partículas em pó. A formulação em pó também pode ser administrada numa pulverização de jato de um gás inerte ou colocada em suspensão em fluidos orgânicos líquidos.

Numa forma de realização específica, a composição farmacêutica pode ser libertada num sistema de libertação controlada ou sustentada. Numa forma de realização, uma bomba pode ser usada para obter uma libertação controlada ou sustentada (ver Langer, *Science*, 249:1527-1533 (1990); Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:10; Buschwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507; Saudek *et al.*, 1989 *N. Engl. J. Med.* 321:574). Noutra forma de realização, materiais poliméricos podem ser usados para obter libertação controlada ou sustentada do agonista do recetor k-opioide e/ou antagonista opioide (ver, por exemplo, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer e Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida 1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen e Ball (eds.), Wiley, Nova Iorque (1984); Ranger e Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macrol. Chem.* 23:61; ver também Levy *et al.*, 1985 *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105; Patente nos EUA n° 5,679,377; Patente nos EUA n° 5,916,597; Patente nos EUA n° 5,912,015; Patente nos EUA n° 5,989,463; Patente nos EUA n° 5,128,326; Publicação de PCT n° WO 99/12154; e Publicação de PCT n°. WO 99/20253). Exemplos de polímeros utilizados em formulações de libertação sustentada incluem, mas não estão limitados a, poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etilene-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico),

poliglicólidos (PLG), polianidras, poli(N-vinil pirrolidona), poli(álcool vinílico), poliacrilamida, poli(etilenoglicol), polilactidos (PLA), poli(lactido-co-glicólidos) (PLGA), e poliortoésteres. Numa forma de realização preferida, o polímero usado numa formulação de libertação sustentada é inerte, isento de impurezas lixiviáveis, estável em armazenagem, estéril e biodegradável. Ainda noutra forma de realização, um sistema de libertação controlada ou sustentada pode ser colocado em proximidade com a marcação terapêutica, requerendo, assim, somente uma fração da dose sistemática (ver, por exemplo, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pág. 115-138 (1984)).

Os veículos para uso com as composições farmacêuticas são biocompatíveis e também podem ser biodegradáveis. Em certas formas de realização, a formulação preferivelmente fornece um nível relativamente constante de libertação de componente ativo. Noutras formas de realização, no entanto, uma taxa mais rápida de libertação imediatamente aquando da administração pode ser desejada. A formulação destas composições está bem dentro do nível dos peritos na técnica usando técnicas conhecidas. Veículos ilustrativos úteis sob este aspeto incluem micropartículas de poli(lactídeo co-glicolídeo), poliacrilato, látex, amido, celulose, dextrano e outros. Outros veículos de libertação retardada ilustrativos incluem biovetores supramoleculares, que compreendem um núcleo hidrofílico não-líquido (por exemplo, um polissacarídeo ou oligossacarídeo reticulado) e, opcionalmente, uma camada externa compreendendo um composto anfifílico, como um fosfolipídeo (ver, por exemplo, patente nos EUA nº 5,151,254 e pedidos de PCT WO 94/20078, WO 94/23701 e WO 96/06638). A quantidade de composto ativo

contido numa formulação de libertação sustentada depende do sítio de implantação, da taxa de duração esperada de libertação e da natureza da condição a ser tratada ou prevenida.

Os compostos da presente invenção são administrados a um indivíduo numa quantidade eficaz ou uma quantidade farmacologicamente eficaz, para efetuar ou melhorar a resposta imune do indivíduo. Como usado aqui, "quantidade eficaz" ou "quantidade farmacologicamente eficaz" é a quantidade que mostra uma resposta além da dos controlos de veículo ou negativos. Uma "quantidade adjuvante eficaz" é a quantidade do composto em questão que, quando administrado em conjunto com um antígeno, mostra uma resposta além da produzida pelo antígeno sozinho. A dosagem exata dos compostos da presente invenção que pode ser administrada a um paciente dependerá do composto particular usado, da via de administração, da composição farmacêutica e do paciente. Por exemplo, quando administrada subcutaneamente para melhorar uma resposta de anticorpos, a quantidade de composto usada é de 1 a cerca de 250 microgramas, preferivelmente de cerca de 25 a cerca de 50 microgramas com base na administração num paciente adulto típico de 70 kg.

Numa outra forma de realização, composições imunogénicas ilustrativas, por exemplo, composições imunogénicas e/ou de vacina da presente invenção, compreendem ADN que codifica um ou mais dos polipeptídeos como descrito acima, de modo que o polipeptídeo é gerado *in situ*. Como indicado acima, o polinucleotídeo pode ser administrado em qualquer uma de uma variedade de sistemas de libertação conhecidos dos peritos na técnica. Naturalmente, numerosas técnicas de

libertação de genes são bem conhecidas na técnica, como as descritas por Rolland, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 15: 143-198, 1998, e referências ali citadas. Sistemas de expressão de polinucleotídeo apropriados conterão, naturalmente, as sequências reguladoras de ADN regulador necessárias para expressão num paciente (como um sinal de terminação e promotor apropriado).

Assim, em certas formas de realização, os polinucleotídeos que codificam polipeptídeos imunogénicos aqui descritos são introduzidos em células hospedeiras de mamíferos apropriadas para expressão usando qualquer um de um número de sistemas baseados em vírus conhecidos. Numa forma de realização ilustrativa, retrovírus fornece uma plataforma conveniente e eficaz para sistemas de libertação de genes. Uma sequência de nucleotídeos selecionada codificando um polipeptídeo da presente invenção pode ser inserida num vetor e acondicionada em partículas retrovirais usando técnicas conhecidas na arte. O vírus recombinante pode então ser isolado e libertado num indivíduo. Um número de sistemas retrovirais ilustrativos é descrito (por exemplo, a Patente nos EUA nº 5,219,740; Miller e Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa *et al.* (1991) *Virology* 180:849-852; Bums *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90:8033-8037; e Boris-Lawrie e Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109.

Além disso, vários sistemas ilustrativos baseados em adenovírus são descritos. Ao contrário do retrovírus que se integra no genoma hospedeiro, os adenovírus persistem extra cromossomicamente minimizando, assim, os riscos associados com a mutagénese de inserção (Haj-Ahmad e Graham (1986) *J.*

Viol. 57:267-274; Bett *et al.* (1993) J. Virol. 67:5911-5921; Mittereder *et al.* (1994) Human Gene Therapy 5:717-729; Seth *et al.* (1994) J. Virol. 68:933-940; Barr *et al.* (1994) Gene Therapy 1:51-58; Berkner, K. L. (1988) BioTechniques 6:616-629; e Rich *et al.* (1993) Human Gene Therapy 4:461-476).

Vários sistemas de vetor de adenovírus associados (AAV) também são desenvolvidos para a libertação de polinucleotídeos. Os vetores AAV podem ser prontamente construídos usando técnicas bem conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Patentes nos EUA nº 5,173,414 e 5,139,941; Publicações internacionais nº WO 92/01070 e WO 93/03769; Lebkowski *et al.* (1988) Molec. Cell. Biol. 8:3988-3996; Vincent *et al.* (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) Current Opinion in Biotechnology 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158:97-129; Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Shelling e Smith (1994) Gene Therapy 1:165-169; e Zhou *et al.* (1994) J. Exp. Med. 179:1867-1875.

Os vetores virais adicionais, úteis para libertar os polinucleotídeos codificando polipeptídeos da presente invenção por transferência de genes, incluem os derivados da família de vírus, como vírus vaccinia e poxvírus de aves. Para fins de exemplo, vírus recombinantes de vaccinia que expressam as novas moléculas podem ser construídos como se segue. O ADN que codifica um polipeptídeo é primeiramente inserido num vetor apropriado de modo que ele é adjacente a um promotor de vaccinia e sequências de ADN de vaccinia de flanco, como a sequência codificando timidina cinase (TK). Este vetor é então usado para

transfetar células que são infectadas simultaneamente com vaccinia. A recombinação homóloga serve para inserir o promotor de vaccinia mais o gene codificando o polipeptídeo de interesse no genoma viral. O TK.sup.(-) recombinante resultante pode ser selecionado cultivando as células na presença de 5-bromodesoxiuridina e selecionando placas virais resistentes ao mesmo.

Um sistema de infecção/transfecção baseado em vaccinia pode ser convenientemente usado para fornecer co-expressão ou expressão indutível transiente de um ou mais polipeptídeos descritos aqui nas células hospedeiras de um organismo. Neste sistema particular, as células são primeiramente infectadas *in vitro* com um vírus vaccinia recombinante que codifica o ARN polimerase T7 de bacteriófago. Esta polimerase exibe especificidade excelente em que ela somente transcreve gabaritos carregando promotores T7. Após infecção, as células são transfectadas com o polinucleotídeo ou polinucleotídeos de interesse, conduzidos por um promotor T7. A polimerase expressa no citoplasma do vírus vaccinia recombinante transcreve o ADN transfectado em ARN que é então traduzido no polipeptídeo pelo mecanismo traducional do hospedeiro. O método fornece produção citoplasmática de alto nível, transiente, de grandes quantidades de ARN nos seus produtos de tradução. Ver, por exemplo, Elroy-Stein e Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA (1990) 87:6743-6747; Fuerst et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA (1986) 83:8122-8126.

Alternativamente, o avipoxvírus, como o vírus da varíola das aves e canarypox, também pode ser usado para libertar as sequências de codificação de interesse. Sabe-se que os vírus avipox recombinantes, expressando imunógenos de

patógenos de mamífero, conferem imunidade protetora quando administrados a espécies não aves. O uso de um vetor Avipox é particularmente desejável em espécies de mamíferos humanos e outras, desde que os membros do gênero Avipox possam somente replicar produtivamente em espécies de aves suscetíveis e, conseqüentemente, não sejam infecciosos em células de mamíferos. Métodos para produzir avipoxvírus recombinantes são conhecidos na técnica e empregam recombinação genética, como descrito acima com respeito à produção de vírus vaccinia. Ver, por exemplo, os documentos WO 91/12882; WO 89/03429; e WO 92/03545.

Qualquer um dentre vários vetores alfavírus pode ser também usado para a libertação das composições de polinucleotídeos da presente invenção, como os vetores descritos nas patentes nos EUA nº 5,843,723; 6,015,686; 6,008,035 e 6,015,694. Determinados vetores baseados em Encefalite Equina Venezuelana (VEE) também podem ser usados, cujos exemplos ilustrativos podem ser encontrados nas Patentes nos EUA nº 5,505,947 e 5,643,576.

Além disso, vetores conjugados moleculares, como os vetores quiméricos de adenovírus descritos em Michael *et al.* J. Biol. Chem. (1993) 268:6866-6869 e Wagner *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:6099-6103, também podem ser usados para libertação de gene de acordo com a invenção.

Informação ilustrativa adicional sobre estes e em outros sistemas de libertação baseados em vírus conhecidos pode ser encontrada, por exemplo, em Fisher-Hoch *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 86:317-321, 1989; Flexner *et al.*, Ann. Nova Iorque Acad. Sci. 569:86-103, 1989; Flexner *et al.*, Vaccine 8:17-21, 1990; Patentes nos EUA nº 4,603,112,

4,769,330, e 5,017,487; WO 89/01973; Patentes nos EUA nº 4,777,127; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner, *Biotechniques* 6:616-627, 1988; Rosenfeld *et al.*, *Science* 252:431-434, 1991; Kolls *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 91:215-219, 1994; Kass-Eisler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90:11498-11502, 1993; Guzman *et al.*, *Circulation* 88:2838-2848, 1993; e Guzman *et al.*, *Cir. Res.* 73:1202-1207, 1993.

Em certas formas de realização, um polinucleotídeo pode ser integrado no genoma de uma célula de marcação. Esta integração pode estar na orientação e localização específica via recombinação homóloga (substituição de genes) ou pode ser integrada numa localização aleatória, não específica (acréscimo de genes). Ainda noutras formas de realização, o polinucleotídeo pode ser estavelmente mantido na célula como um segmento separado epissômico de ADN. Estes segmentos de polinucleotídeo ou "epissomas" codificam sequências suficientes para permitir manutenção e replicação independentes de ou em sincronização com o ciclo de células hospedeiras. O modo pelo qual o constructo de expressão é libertado numa célula e onde, na célula, o polinucleotídeo permanece é dependente no tipo de constructo de expressão empregado.

Numa outra forma de realização da invenção, um polinucleotídeo é administrado/libertado como ADN "nu", por exemplo como descrito em Ulmer *et al.*, *Science* 259:1745-1749, 1993 e revisto por Cohen, *Science* 259:1691-1692, 1993. A absorção de ADN nu pode ser aumentada revestindo o ADN sobre contas biodegradáveis, que são eficazmente transportadas para dentro das células.

Ainda noutra forma de realização, uma composição da presente invenção pode ser libertada via uma experiência de bombardeio de partículas, tendo muitas sido descritas. Num exemplo ilustrativo, a aceleração de partículas conduzidas por gás pode ser obtida com dispositivos, como os fabricados pela Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, Reino Unido) e Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI), cujos exemplos são descritos nas patentes nos EUA n° 5,846,796; 6,010,478; 5,865,796; 5,584,807; e Patente Europeia n° 0500 799. Esta abordagem oferece uma abordagem de libertação isenta de agulha em que uma formulação em pó seca de partículas microscópicas, como partículas de polinucleotídeos ou de polipeptídeos, é acelerada em velocidade elevada num jato de gás hélio gerado por um dispositivo manual, propelindo as partículas num tecido de marcação de interesse.

Numa forma de realização relacionada, outros dispositivos e métodos que podem ser úteis para uso em injeção sem agulha, conduzida por gás, das composições da presente invenção incluem os fornecidos pela Bioject, Inc. (Portland, OR), dos quais alguns exemplos são descritos nos Pedidos de Patente nos EUA n° 4,790,824; 5,064,413; 5,312,335; 5,383,851; 5,399,163; 5,520,639 e 5,993,412.

A composição farmacêutica é preferivelmente uma que induz uma resposta imune predominantemente do tipo Th1. Os níveis elevados de citocinas do tipo Th1 (por exemplo, IFN- γ , TNF α , IL-2 e IL-12) tendem a favorecer a indução de respostas imunes mediadas por células num antígeno administrado. Em contraste, níveis elevados de citocinas do tipo Th2 (por exemplo, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) tendem a favorecer a indução de respostas imunes humorais. Após

aplicação de uma composição imunogénica como fornecido aqui, um paciente terá uma resposta imune que inclui respostas do tipo Th1 e Th2. Numa forma de realização preferida, em que uma resposta é predominantemente do tipo Th1, o nível de citocinas do tipo Th1 aumentará numa extensão maior do que o nível de citocinas do tipo Th2. Os níveis destas citocinas podem ser prontamente avaliados usando testes padrão. Alternativamente, ou além disso, níveis elevados de citocinas do tipo Th2 (por exemplo, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) podem ser desejados para determinadas aplicações terapêuticas. Os níveis destas citocinas podem ser prontamente avaliados usando testes padrão. Os níveis destas citocinas podem ser prontamente avaliados usando testes padrão. Para um estudo das famílias de citocinas, ver Mosmann e Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989.

Composições ilustrativas para uso na indução de citocinas do tipo Th1 incluem, por exemplo, uma combinação de oligonucleotídeos contendo CpG (em que o dinucleotídeo CpG é não-metilado) como descrito, por exemplo, em WO 96/02555, WO 99/33488 e patentes nos EUA 6 6,008,200 e 5,856,462. As sequências de ADN imunoestimulantes também são descritas, por exemplo, por Sato *et al.*, *Science* 273:352, 1996. Outros imunoestimulantes apropriados compreendem saponinas, como QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), e derivados de saponinas relacionados e miméticos dos mesmos.

Qualquer um dentre uma variedade de imunoestimulantes adicionais pode ser incluído nas composições da invenção. Por exemplo, citocinas, como GM-CSF, interferão ou interleucinas para ainda modular uma resposta imune de interesse. Adicionalmente, Montanide ISA 720 (Seppic,

França), SAF (Chiron, Califórnia, Estados Unidos), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), a série SBAS de adjuvantes (por exemplo, SBAS-2 ou SBAS-4, disponíveis de SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica), e imunoestimulante Enhanzyn™ (Corixa, Hamilton, MT). Imunoestimulantes éter de polioxi-etileno são descritos em WO 99/52549A1 e podem ser usados também.

As composições farmacêuticas aqui descritas compreenderão, ainda, com frequência, um ou mais tampões (por exemplo, solução salina tamponada neutra ou solução salina tamponada com fosfato), hidratos de carbono (por exemplo, glicose, manose, sacarose ou dextranos), manitol, proteínas, polipeptídeos ou aminoácidos como glicina, antioxidantes, bacteriostatos, agentes quelantes como EDTA ou glutathione, adjuvantes (por exemplo, hidróxido de alumínio), solutos que tornam a formulação isotônica, hipotônica ou fracamente hipertônica com o sangue de um recipiente, agentes de suspensão, agentes de espessamento e/ou conservantes. Alternativamente, as composições aqui descritas podem ser formuladas como um liofilizado.

As composições farmacêuticas aqui descritas podem ser apresentadas em recipientes de dose unitária ou de doses múltiplas, como frascos ou ampolas vedadas. Estes recipientes são tipicamente vedados de modo a conservar a esterilidade e a estabilidade da formulação até ao seu uso. Em geral, as formulações podem ser armazenadas como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos. Alternativamente, uma composição farmacêutica pode ser armazenada numa condição seca por congelamento requerendo somente a adição de um veículo líquido estéril imediatamente antes do uso.

O desenvolvimento de regimes de tratamento e de dosagens apropriadas para usar as composições farmacêuticas particulares aqui descritas numa variedade de regimes de tratamento, incluindo, por exemplo, formulação e administração oral, parenteral, intravenosa, intranasal e intramuscular, é bem conhecido na técnica, sendo brevemente discutido abaixo para fins gerais de ilustração.

Em determinadas aplicações, as composições farmacêuticas aqui descritas podem ser libertadas via administração oral num animal. Como tal, estas composições podem ser formuladas com um diluente inerte ou com um veículo comestível assimilável, ou podem ser encerradas em cápsula de gelatina com invólucro duro ou mole, ou podem ser prensadas em comprimidos, ou podem ser incorporadas diretamente com os alimentos da dieta.

Os compostos ativos podem ainda ser incorporados com excipientes e ser usados na forma de comprimidos ingeríveis, comprimidos orais, trociscos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, pastilhas e outros (ver, por exemplo, Mathiowitz *et al.*, *Nature* 1997, 27 de março; 386(6623):410-4; Hwang *et al.*, *Crit Rev Ther Drug Carrier Sits* 1998;15(3):243-84; Patente nos EUA 5,641,515; Patente nos EUA 5,580,579 e Patente nos EUA 5,792,451) Comprimidos, trociscos, pílulas, cápsulas e outros também podem conter qualquer uma de uma variedade de componentes adicionais, por exemplo, um aglutinante, como goma tragacanto, acácia, amido de milho ou gelatina; excipientes, como fosfato de dicálcio; um agente de desintegração, como amido de milho, amido de batata, ácido algínico e outros; um lubrificante, como estearato de magnésio; e um agente adoçante, como

sacarose, lactose ou sacarina podem ser adicionados, ou um agente aromatizante, como aroma de hortelã, óleo de gualtéria ou cereja. Quando a forma de dosagem unitária é uma cápsula, ela pode conter, além dos materiais de adição do tipo acima, um veículo líquido. Vários outros materiais podem estar presentes como revestimentos ou para de outro modo modificar a forma física da dosagem unitária. Por exemplo, comprimidos, pílulas ou cápsulas podem ser revestidos com goma laca, açúcar, ou ambos. Naturalmente, qualquer material usado na preparação de qualquer forma de dosagem unitária deve ser farmacêuticamente puro e substancialmente não tóxico nas quantidades empregadas. Além disso, os compostos ativos podem ser incorporados em formulações e preparações de libertação sustentada.

Tipicamente, estas formulações irão conter pelo menos 0,1% do composto ativo ou mais, apesar da percentagem do(s) ingrediente(s) ativo(s) poder, naturalmente, variar, e pode convenientemente estar entre cerca de 1 ou 2% e cerca de 60% ou 70% ou mais do peso ou volume da formulação total. Naturalmente, a quantidade de composto(s) ativo(s) em cada composição útil terapêuticamente pode ser preparada de um modo em que uma dosagem apropriada será obtida em qualquer certa dose unitária do composto. Fatores como solubilidade, biodisponibilidade, meia-vida biológica, via de administração, vida de armazenamento do produto, bem como outras considerações farmacológicas serão contemplados por um perito na técnica de preparação destas formulações farmacêuticas, e como tal, uma variedade de dosagens e regimes de tratamento pode ser desejável.

Para administração oral, as composições aqui descritas podem ser, alternativamente, incorporadas com um ou mais

excipientes na forma de colutórios, dentifrícios, comprimidos bucais, pulverização oral ou formulação sublingual administrada oralmente. Alternativamente, o ingrediente ativo pode ser incorporado numa solução oral como uma contendo borato de sódio, glicerina e bicarbonato de potássio, ou dispersado num dentifrício, ou adicionado numa quantidade terapêuticamente eficaz a uma composição que pode incluir água, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes, e humectantes. Alternativamente, as composições podem ser moldadas numa forma de comprimido ou solução que pode ser colocada sob a língua ou de outro modo dissolvida na boca.

Em circunstâncias determinadas, será desejável libertar as composições farmacêuticas aqui descritas parenteralmente, intravenosamente, intramuscularmente ou até mesmo intraperitonealmente. Estas abordagens são bem conhecidas dos peritos na técnica, sendo algumas ainda descritas, por exemplo nas patentes nos EUA nº 5,543,158; 5,641,515 e 5,399,363. Em certas formas de realização, soluções dos compostos ativos como base livre ou sais farmacologicamente aceitáveis podem ser preparadas em água apropriadamente misturada com um tensioativo, como hidroxipropilcelulose. Dispersões também podem ser preparadas em glicerol, polietileno glicóis líquidos, e misturas dos mesmos e em óleos. Em condições comuns de armazenagem e uso, estas preparações conterão geralmente um conservante para evitar o crescimento de micro-organismos.

Formas farmacêuticas ilustrativas apropriadas para uso injetável incluem soluções aquosas estéreis ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções injetáveis estéreis ou dispersões (por exemplo, ver patente

nos EUA 5,466,468). Em todos os casos, a forma deve ser estéril e deve ser fluida para facilitar a colocação em seringa. Ela deve ser, estável nas condições de fabricação e armazenagem e deve ser conservada contra a ação contaminante de micro-organismos, como bactérias e fungos. O veículo pode ser um meio solvente ou de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido, e outros), misturas apropriadas dos mesmos, e/ou óleos vegetais. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e/ou pelo uso de tensioativos. A prevenção da ação de micro-organismos pode ser facilitada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabens, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, e outros. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares ou cloreto de sódio. Absorção sustentada das composições injetáveis pode ser realizada pelo uso nas composições de agentes de absorção retardada, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

Numa forma de realização, para administração parenteral numa solução aquosa, a solução deve ser apropriadamente tamponada, se necessário, e o diluente líquido tornado primeiramente isotônico com glicose ou solução salina suficiente. Estas soluções aquosas particulares são especialmente apropriadas para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea e intraperitoneal. Nesta conexão, um meio aquoso estéril que pode ser empregado será conhecido dos peritos na técnica à luz da presente descrição. Por exemplo, uma dosagem pode ser dissolvida em

1 mL de solução de NaCl isotónica e tanto adicionada a 1000 mL de fluido de hipodermóclise ou injetada no sítio de infusão proposto (ver, por exemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edição, páginas 1035-1038 e 1570-1580). Alguma variação na dosagem ocorrerá necessariamente dependendo da condição do indivíduo a ser tratado. Além disso, para administração em ser humano, as preparações naturalmente terão, preferivelmente, esterilidade, pirogenicidade, e os padrões de pureza e de segurança geral como requerido pelas normas do FDA Office of Biologics.

As composições aqui descritas podem ser formuladas numa forma de sal ou neutra. Sais farmacologicamente aceitáveis ilustrativos incluem os sais de adição de ácido (formados com os grupos amino livres da proteína) e que são formados com ácidos inorgânicos como, por exemplo, ácidos clorídrico ou fosfórico, ou como ácidos orgânicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico, e outros. Sais formados com os grupos carboxilo livres também podem ser derivados de bases inorgânicas como, por exemplo, hidróxidos de sódio, potássio, amónio, cálcio ou férrico, e tais bases orgânicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína e outros. Em formulação, as soluções serão administradas de um modo compatível com a formulação da dosagem e numa quantidade como é terapeuticamente eficaz.

Em certas formas de realização, as composições farmacêuticas podem ser libertadas por pulverizações intranasais, inalação, e/ou outros veículos de libertação em aerossol. Métodos para libertar genes, ácidos nucleicos e composições de peptídeos diretamente nos pulmões via pulverização de aerossol são descritos, por exemplo, na

Patente nos EUA 5,756,353 e Patente nos EUA 5,804,212. Do mesmo modo, a libertação de fármacos usando resinas de micropartículas intranasais (Takenaga *et al.*, *J Controlled Release* 1998 2 de março; 52(1-2):81-7) e compostos de lisofosfatidil-glicerol (Patente nos EUA 5,725,871) também são bem conhecidos nas técnicas farmacêuticas. Do mesmo modo, a libertação de fármaco transmucosal ilustrativa na forma de uma matriz de suporte de politetrafluoroetileno é descrita na Patente nos EUA 5,780,045.

Em certas formas de realização, lipossomas, nanocápsulas, micropartículas, partículas de lipídeos, vesículas, e outros, são usados para a introdução das composições da presente invenção em células hospedeiras/organismos apropriados. Em particular, as composições aqui descritas podem ser formuladas para libertar tanto encapsuladas numa partícula de lipídeo, um lipossoma, uma vesícula, uma nanoesfera, como uma nanopartícula ou outros. Além disso, as composições da presente invenção podem ser ligadas, tanto covalentemente como não covalentemente, à superfície dos veículos transportadores.

A formação e uso de lipossoma e preparações como lipossoma como veículos de fármacos potenciais são geralmente conhecidos dos peritos na técnica (ver, por exemplo, Lasic, *Trends Biotechnol* 1998 julho;16(7):307-21; Takakura, *Nippon Rinsho* 1998 Mar;56(3):691-5; Chandran *et al.*, *Indian J Exp Biol.* 1997 agosto;35(8):801-9; Margalit, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1995;12(2-3):233-61; Patente nos EUA nº 5,567,434; Patente nos EUA nº 5,552,157; Patente nos EUA nº 5,565,213; Patente nos EUA nº 5,738,868 e Patente nos EUA nº 5,795,587).

Lipossomas são usados com sucesso com vários tipos de células que são normalmente difíceis de transfetar por outros procedimentos, incluindo suspensões de células T, culturas de hepatócitos primárias e células PC 12 (Renneisen *et al.*, *J Biol Chem.* 1990 setembro 25;265(27):16337-42; Muller *et al.*, *DNA Cell Biol.* 1990 abril;9(3):221-9). Além disso, os lipossomas não apresentam limitações de comprimento de ADN, que são típicas dos sistemas de libertação baseados em vírus. Os lipossomas têm sido usados efetivamente para introduzir genes, vários fármacos, agentes radioterapêuticos, enzimas, vírus, fatores de transcrição, efetadores aloestereoquímicos e outros, em várias linhagens de células cultivadas e animais. Além disso, o uso de lipossomas não parece estar associado com respostas autoimunes ou toxicidade inaceitável após libertação sistêmica.

Em certas formas de realização, os lipossomas são formados a partir de fosfolipídeos que são dispersos num meio aquoso e formam espontaneamente vesículas em bicamadas concêntricas multilamelares (também denominadas vesículas multilamelares (MLVs)).

Alternativamente, são também aqui descritas formulações em nanocápsulas farmacologicamente aceitáveis das composições da presente invenção. As nanocápsulas podem geralmente aprisionar compostos de um modo estável e reprodutível (ver, por exemplo, Quintanar-Guerrero *et al.*, *Drug Dev Ind Pharm.* 1998 dezembro;24(12):1113-28). Para evitar efeitos secundários devido a sobrecarga polimérica intracelular, as partículas ultrafinas (com cerca de 0,1 μm) podem ser designadas usando polímeros capazes de serem degradados *in vivo*. Estas partículas podem ser produzidas como descrito,

por exemplo, por Couvreur *et al.*, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1988;5(1):1-20; zur Muhlen *et al.*, *Eur J Pharm Biopharm.* 1998 março;45(2):149-55; Zambaux *et al.* *J Controlled Release.* 1998 janeiro 2;50(1-3):31-40; e Patente nos EUA 5,145,684.

Terapia de Cancro

Abordagens imunológicas em terapia de cancro são baseadas no reconhecimento de que as células cancerígenas podem frequentemente evadir as defesas do corpo contra moléculas e células aberrantes e estranhas, e que estas defesas podem ser terapeuticamente estimuladas para recuperar o campo perdido, por exemplo, páginas 623-648 em Klein, *Immunology* (Wiley-Interscience, Nova Iorque, 1982). Observações recentes numerosas de que vários efetadores imunes podem inibir diretamente ou indiretamente o crescimento de tumores levam a um interesse renovado nesta abordagem de terapia de cancro, por exemplo, Jager, *et al.*, *Oncology* 2001;60(1):1-7; Renner, *et al.*, *Ann Hematol* 2000 dezembro;79(12):651-9.

Quatro tipos de células básicos cuja função está associada com imunidade de células antitumor e a eliminação de células de tumor do corpo incluem: i) linfócitos B que segregam imunoglobulinas no plasma sanguíneo para identificar e rotular as células não autoinvasoras; ii) monócitos que segregam as proteínas complementares que são responsáveis por lise e processamento das células invasoras de marcação revestidas com imunoglobulina; iii) linfócitos exterminadores naturais tendo dois mecanismos para a destruição de células de tumor, citotoxicidade celular dependente de anticorpos e extermínio natural; e iv) linfócitos T possuindo recetores específicos de antígeno e

tendo a capacidade de reconhecer uma célula de tumor contendo moléculas marcadoras complementares (Schreiber, H., 1989, in *Fundamental Immunology* (ed). W. E. Paul, pp. 923-955).

A imunoterapia de cancro focaliza-se geralmente na indução de respostas imunes humorais, respostas imunes celulares, ou ambas. Além disso, está bem estabelecido que a indução de células auxiliares T CD4⁺ é necessária a fim de induzir secundariamente tanto anticorpos como células T CD8⁺ citotóxicas. Antígenos de polipeptídeo que são seletivos ou idealmente específicos para células de cancro oferecem uma abordagem poderosa para induzir respostas imunes contra o cancro.

As composições farmacêuticas aqui descritas podem ser usadas para estimular uma resposta imune contra o cancro. Nestes métodos, as composições farmacêuticas aqui descritas são administradas a um paciente, tipicamente um animal de sangue quente, preferivelmente um ser humano. Um paciente pode ou não estar afligido com cancro. As composições farmacêuticas e vacinas podem ser administradas tanto antes como após remoção cirúrgica de tumores primários e/ou tratamento como administração de radioterapia ou fármacos quimioterapêuticos. Como discutido acima, a administração das composições farmacêuticas pode ser por qualquer método apropriado, incluindo administração por vias intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, intranasal, intradérmica, anal, vaginal, tópica e oral.

Em certas formas de realização, a imunoterapia pode ser imunoterapia ativa, em que o tratamento conta com o estímulo *in vivo* do sistema imune de hospedeiro endógeno

para reagir contra tumores com a administração de agentes de modificação da resposta imune (como polipeptídeos e polinucleotídeos, como aqui descrito).

As vias e frequência de administração das composições terapêuticas aqui descritas, bem como a dosagem, irão variar de indivíduo a indivíduo, e podem ser prontamente estabelecidas usando técnicas padrão. Em geral, as composições farmacêuticas e vacinas podem ser administradas por injeção (por exemplo, intercutânea, intramuscular, intravenosa ou subcutânea), intranasalmente (por exemplo, por aspiração) ou oralmente. Preferivelmente, entre 1 e 10 doses podem ser administradas durante um período de 52 semanas. Preferivelmente, 6 doses são administradas, em intervalos de 1 mês, e vacinações de reforço podem ser dadas periodicamente depois disso. Protocolos alternados podem ser apropriados para pacientes individuais. Uma dose apropriada é uma quantidade de um composto que, quando administrado como descrito acima, é capaz de promover uma resposta imune antitumor, e está pelo menos 10-50% acima do nível basal (isto é, nãotratado). Esta resposta pode ser monitorizada medindo os anticorpos antitumor num paciente ou por geração dependente de vacina de células efetadoras citolíticas capazes de exterminar as células de tumor do paciente *in vitro*. Estas vacinas também devem ser capazes de causar uma resposta imune que leva a um resultado clínico melhorado (por exemplo, remissões mais frequentes, sobrevivência livre da doença completa ou parcial ou mais longa) em pacientes vacinados quando comparados a pacientes não vacinados. Em geral, para as composições farmacêuticas e vacinas compreendendo um ou mais polipeptídeos, a quantidade de cada polipeptídeo presente numa dose está num intervalo de cerca de 25 µg a 5 mg por kg do hospedeiro. As

dosagens apropriadas irão variar com o tamanho do paciente, mas estarão, tipicamente, no intervalo de cerca de 0,1 mL a cerca de 5 mL.

Em geral, um regime de tratamento e de dosagem apropriado fornece o(s) composto(s) ativo(s) numa quantidade suficiente para fornecer benefício terapêutico e/ou profilático. A resposta pode ser monitorizada estabelecendo-se um resultado clínico melhorado (por exemplo, remissões mais frequentes, sobrevivência sem doença completa ou parcial, ou mais longo) em pacientes tratados quando comparados a pacientes não-tratados. Aumentos em respostas imunes preexistentes numa proteína de tumor correlacionam-se geralmente com um resultado clínico melhorado. Estas respostas imunes podem ser geralmente avaliadas usando testes de proliferação, citotoxicidade ou citocina padrão, que podem ser realizados usando amostras obtidas de um paciente antes e após tratamento.

A presente invenção é ainda descrita por meio dos seguintes Exemplos não limitativos e Exemplos de Testes que são dados somente para fins ilustrativos.

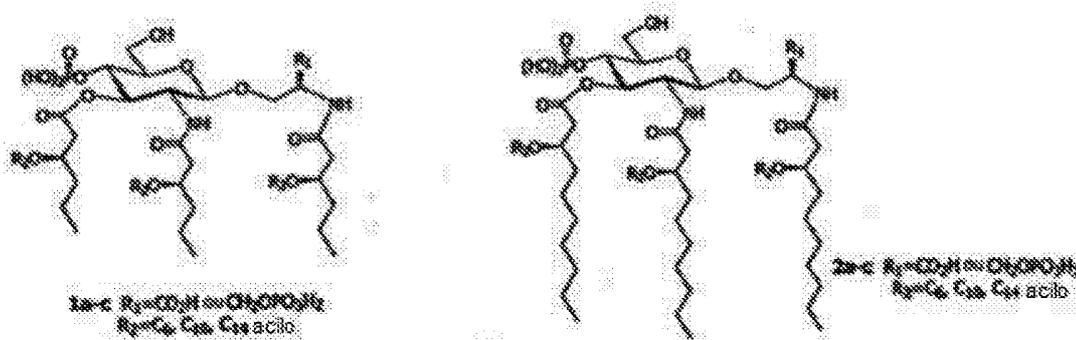
EXEMPLOS

Exemplo 1

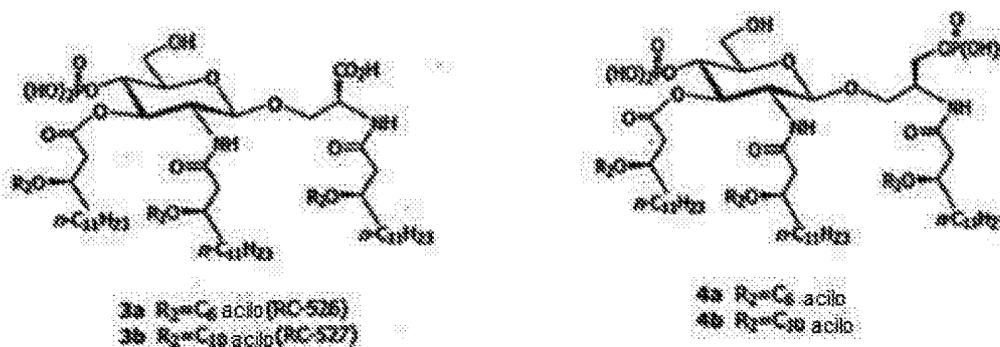
Modificações da cadeia de acilo gordo primário

Este exemplo descreve a preparação de derivados de ácido gordo primário tendo cadeias de acilo gordo primário de comprimento variável, sozinhas ou em combinação com cadeias de ácido gordo secundárias. Por exemplo, os compostos 1a-c e 2a-c, em que os ácidos gordos primários de cadeia (C₁₀)

média e (C₆) curta são combinados com ácidos gordos secundários de cadeia curta, média ou longa.



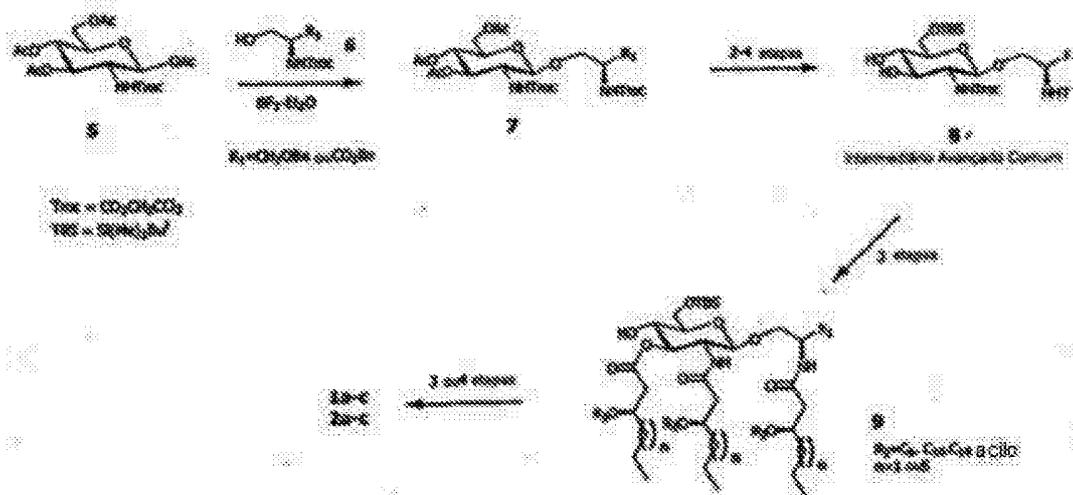
Estes compostos são preparados ou usando serina aglicão bem estabelecido ($R_1=CO_2H$) ou, alternativamente, usando uma unidade serinol fosfato aglicão quimicamente mais estável e ionizável ($R_1=CH_2OPO_3H_2$). A seleção de serilo/serinol fosfato será baseada em comparação às atividades biológicas de derivados serilo 3a,b conhecidos com novos serinol fosfatos 4a,b.



NÃO SÃO COMPOSTOS DA INVENÇÃO REIVINDICADA

Os derivados de compostos modificados de cadeia primária são sintetizados por uma modificação de um método previamente descrito (B1 em Johnson *et al.*, patente nos EIU n° 6,355,251) empregando um intermediário avançado comum que permite a introdução dos ácidos acilóxi ligados a amida e éster próximos da extremidade da síntese (esquema I). A etapa inicial na síntese é glicosilação de recetor 6

com o tetraacetato 5 conhecido (preparado em 4 etapas de glucosamina) para dar β -glicosídeo 7 e conversão de 7 no intermediário avançado comum (CAI) 8, que é otimizado para $R_1=CO_2Bn$. A 4-O-acilação e a N-desproteção/acilação seletivas resultam em derivado hexaacilo 9, que é convertido em 3-4 etapas em 1a-c ou 2a-c via fosforilação e desbloqueio.



NÃO SÃO COMPOSTOS DA INVENÇÃO REIVINDICADA

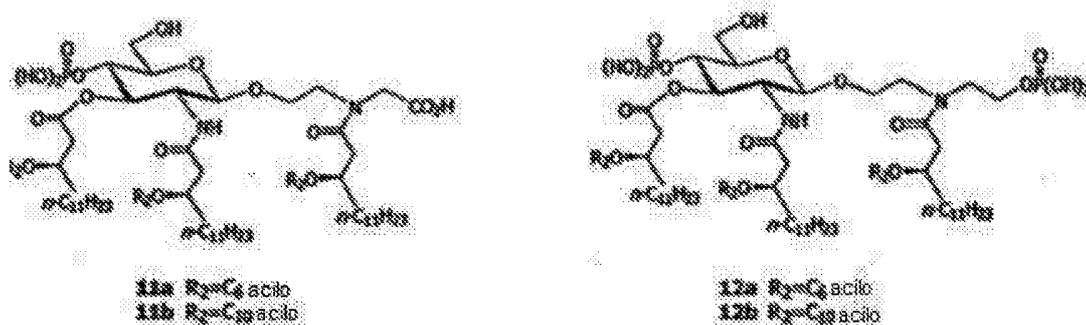
Esquema I

Os ácidos (R)-3-n-alcanoiloxialcanoicos requeridos são preparados de acordo com Keegan *et al.*, *Tetrahedron: Asymmetry*; 7(12):3559-3564, 1996, começando com os ésteres 3-oxo metílicos apropriados. A pureza química e diastereomérica elevada dos produtos 1 e 2 é obtida por ou cromatografia de fase normal em sílica-gel ou, alternativamente, via cromatografia de celulose ou cromatografia de divisão líquido-líquido em gel Sephadex LH-20. A pureza dos sais trietilamônio isolados é estabelecida por meios espectroscópicos (IV, 1H e ^{13}C RMN) e físicos (análise de combustão, FAB-MS), assim como por HPLC.

Exemplo 2

Compostos glicilo e fosfonooxietilo (PE)

Este exemplo descreve a síntese de compostos glicilo 11a,b e compostos fosfonooxietilo 12a,b (PE), que são quase regioisoméricos com 3a,b e 4a,b.

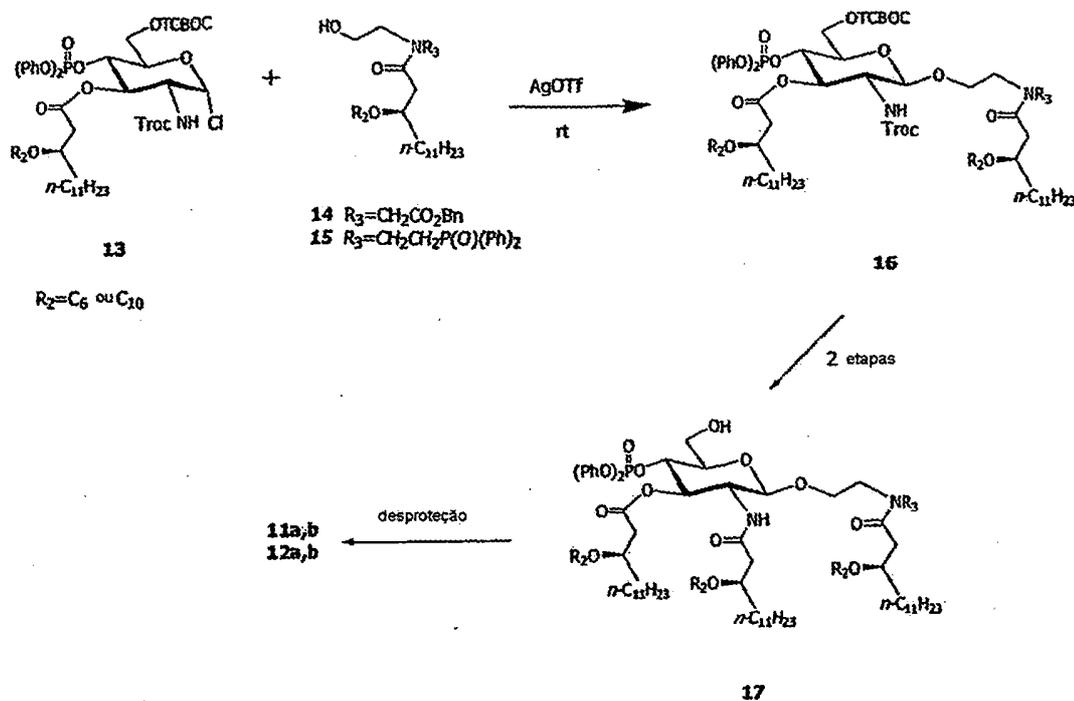


NÃO SÃO COMPOSTOS DA INVENÇÃO REIVINDICADA

Estes compostos são mais facilmente preparados por uma síntese mais convergente do que descrito no Esquema I, em que um doador de glicosilo C_6 ou C_{10} 13 comum é acoplado com uma unidade de recetor N acilado apropriado 14 ou 15 (ou alternativamente, protegido com N-Troc- não-mostrado) na presença de ião de prata para dar β -glicosídeos 16 (esquema II). O recetor de glicina 14 é preparado de acordo com Bulusu *et al.*, *J Med Chem*; 35 (19): 3463 - 3469, 1992, a partir de etanolamina e bromoacetato de benzilo (ou t-butilo) seguido por N-acilação ou proteção. O fosfato 15 é preparado por monofosforilação de dietanolamina N-acilada (ou protegida). A N-desproteção/acilação ou N,N-diacilação no caso de aglicão Troc- protegido (Jiang *et al.*, *Tetrahedron*; 58 (43): 8833- 8842, 2002) dos β -glicosídeos 16 e clivagem de fenilo e de outros grupos de proteção do derivado hexaacilado resultante 17 é esperada como dando os compostos desejados 11a,b e 12a,b, que são isolados e caracterizados como seus sais de trietilamónio após

purificação cromatográfica em sílica ou gel LH-20 ou celulose DEAE.

O Esquema II é mostrado abaixo:



NÃO SÃO COMPOSTOS DA INVENÇÃO REIVINDICADA

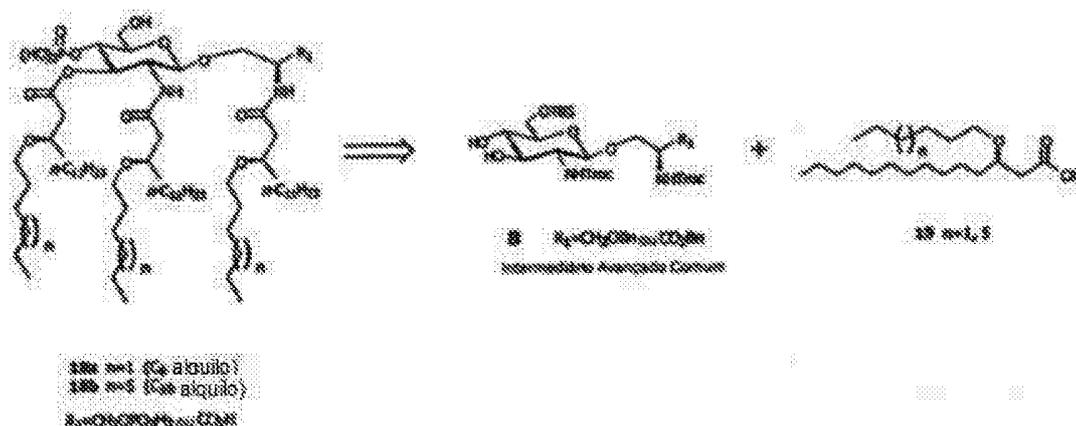
Esquema II

Exemplo 3

Lipídeos de éter secundários

Estes exemplos descrevem a síntese de derivados de ácido (R)-3-alkiloxitetradecanoico (18a,b) que são resistentes a metabolismo e/ou hidrólise aquosa desfavoráveis. Para sintetizar os compostos 18a,b os análogos de lipídios de éter dos compostos de ácidos gordos secundários 3a,b ou os serinol fosfatos 5a,b correspondentes devem ser feitos inicialmente. Como mostrado retro-sinteticamente no Esquema III, a síntese de moléculas de marcação 18a,b pode ser obtida substituindo-se o ácido (R)-3-hexiloxitetradecanoico ou ácido (R)-3-deciloxitetradecanoico pelos aciloxiácidos correspondentes começando com a 3-O-acilação seletiva de

intermediário 8 avançado comum no Esquema I e prosseguindo através do intermediário 9 ($R_2=C_6$ ou C_{10} alquilo, $n = 9$). Os alquiloxiácidos 19 requeridos são sintetizados a partir de ácido (R)-3-hidroxitetradecanoico ou seu éster fenacílico, intermediários nas sínteses de aciloxiácido, pelos métodos conhecidos em rendimento global >50% (Keegan *et al.*, *Tetrahedron: Asymmetry*; 7(12):3559-3564, 1996, Watanabe *et al.*, *Carbohydr Res*; 332(3):257-277, 2001, Jiang., *Bioorg Med Chem Lett*; 12(16):2193-2196, 2002, Christ *et al.*, Patente nos EUA nº 5,530,113. 1996).



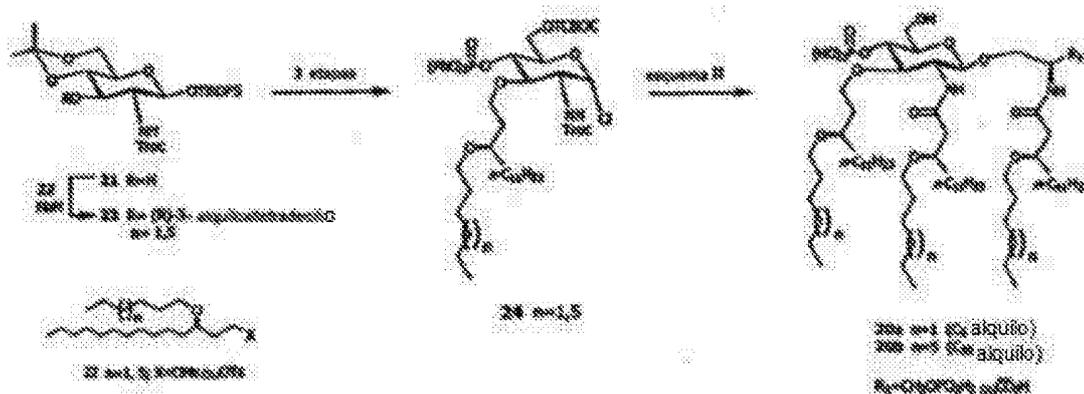
Esquema III

Exemplo 4

Lipídeos de éter primário e secundário

Este exemplo descreve os compostos (20a,b) contendo um lipídeo de éter primário na posição de açúcar C-3, assim como três lipídeos de éter secundários. Estes compostos são sintetizados por alquilação de acetonida 21, um intermediário na síntese de doador de glicosilo 13 (Esquema II), com sulfonato 22, que por sua vez é gerado numa etapa a partir do precursor de álcool 19, para dar diéter 23 (esquema IV). A 4,6-funcionalização e ativação anomérica fornece o cloreto de glicosilo 24, que é então processado

como no Esquema II usando os alquiloxiácidos correspondentes nas etapas de N-acilação. Num esquema alternativo, o derivado 2-azido⁴² ou 2-trifluoroacetamido⁴⁵ pode ser empregado na etapa de 3-O-alquilação.

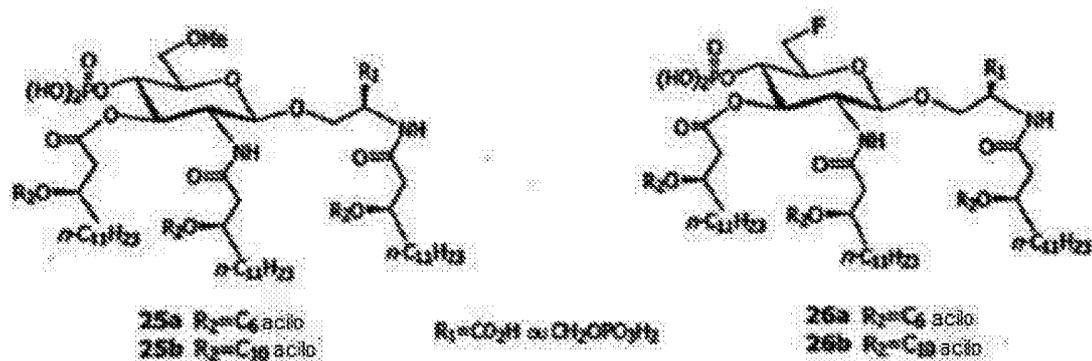


Esquema IV

Exemplo 5

Compostos C-6 modificados

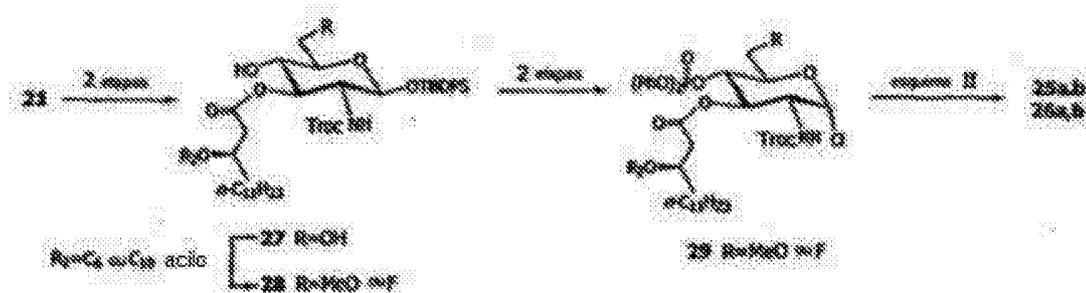
Este exemplo descreve os compostos tendo um 6-hidroxilo bloqueado. Neste exemplo, um éter metílico ou grupo flúor é usado em conjunto com os compostos serilo ou serinol fosfato 25a,b e 26a,b.



NÃO SÃO COMPOSTOS DA INVENÇÃO REIVINDICADA

Os compostos são preparados a partir de diol 27 como mostrado no Esquema V. O intermediário 27, obtido em duas etapas a partir de acetona 21, é funcionalizado na

posição 6 por métodos conhecidos (Christ *et al.*, patente nos EUA 5,530,113, 1996; Watanabe *et al.*, Carbohydr Res; 333(3):203-231, 2001) para dar o álcool **28**. A conversão de **28** nos cloretos **29** nas duas etapas e elaboração de acordo com o Esquema II fornece as moléculas alvo **25a,b** e **26a,b**. Os compostos com ligações éter primário e/ou secundário como descrito no Exemplo 4 acima podem ser modificados como descrito neste exemplo para proteger adicionalmente as moléculas contra a degradação química e enzimática.



NÃO SÃO COMPOSTOS DA INVENÇÃO REIVINDICADA

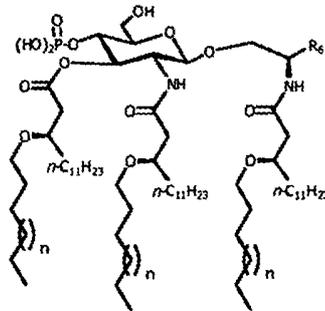
Esquema V

Deve entender-se que os exemplos anteriores são meramente ilustrativos da presente invenção.

Lisboa,

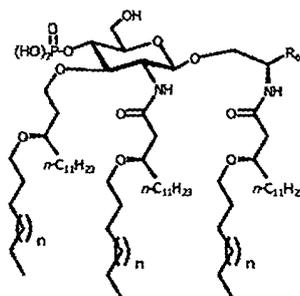
REIVINDICAÇÕES

1. Um composto com a fórmula:



em que n é 1 ou 5 e R_6 é COOH ou $\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$.

2. Um composto de acordo com a reivindicação 1, em que n é 1.
3. Um composto de acordo com a reivindicação 1, em que n é 5.
4. Um composto de acordo com a reivindicação 3, em que $R_6 = \text{COOH}$.
5. Um composto de acordo com a reivindicação 2, em que $R_6 = \text{COOH}$.
6. Um composto com a fórmula:



em que n é 1 ou 5 e R_6 é COOH ou CH_2OPO_3 .

Lisboa,