



República Federativa do Brasil
Ministério de Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0808260-0 A2



* B R P I 0 8 0 8 2 6 0 A 2 *

(22) Data de Depósito: 05/03/2008

(43) Data da Publicação: 08/07/2014
(RPI 2270)

(51) Int.Cl.:

C12N 9/64
C12N 15/85
A61K 48/00

(54) Título: "PLASMÍDEO pORT, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE UM PLASMÍDEO pORT-RDD, PARA A PURIFICAÇÃO DO PLASMÍDEO pORT-RDD, PARA A EXPRESSÃO DE PEPTÍDEOS RDD IN VITRO OU IN VIVO, PARA AVALIAR A POTÊNCIA INIBITÓRIA IN VITRO DE UM PLASMÍDEO pORT-RDD, PARA A PREPARAÇÃO DO PLASMÍDEO pORT-RDD LIOFILIZADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DE UM PLASMÍDEO"

(57) Resumo: Consistindo de um bolso plástico adequadamente posicionado, por exemplo, nas costas de uma camiseta, sendo que dentro desse bolso se pode inserir uma folha de propaganda, de tal modo que essa propaganda possa ser facilmente vista por outras pessoas. Como o bolso plástico é superiormente aberto, se pode trocar com facilidade o dispositivo publicitário, educativo ou informativo, bastando retirar o que estava dentro do bolso e trocá-lo por outro.

(30) Prioridade Unionista: 06/03/2007 EP 07290285.1,
06/03/2007 US 60/893,189

(73) Titular(es): BIOALLIANCE PHARMA

(72) Inventor(es): CÉLINE BOUQUET, SOPHIE LEBEL-BINAY

(74) Procurador(es): Priscila Penha de Barros Thereza

(86) Pedido Internacional: PCT EP2008052691 de
05/03/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/107462de
12/09/2008

“PLASMÍDEO pORT, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM PLASMÍDEO pORT-RDD, MÉTODO PARA A PURIFICAÇÃO DO PLASMÍDEO pORT-RDD, MÉTODO PARA A EXPRESSÃO DE PEPTÍDEOS RDD, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM PLASMÍDEO, MÉTODO PARA AVALIAR A POTÊNCIA INIBITÓRIA *IN VITRO* DE UM PLASMÍDEO pORT-RDD E MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DO PLASMÍDEO pORT-RDD LIOFILIZADO”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a um plasmídeo pORT contendo uma seqüência que codifica todo ou parte de um domínio desintegrina de metargidina (RDD) ou um derivado do mesmo sob o controle do promotor de citomegalovírus forte, em especial, um plasmídeo possuindo a seqüência apresentada na SEQ ID No: 2. Dito plasmídeo possui atividade antitumoral *in vivo* e, portanto, fornece um agente terapêutico promissor para o tratamento do câncer.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Angiogênese, o desenvolvimento de novos capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existentes, é essencial para o crescimento e a progressão dos tumores sólidos primários. A estratégia que visa a inibição de tal neovascularização dentro dos tumores tem sido, portanto, proposta (Folkman, Nat. Med. 1995; 1: 27 – 31). A terapia anti-angiogênica apresenta pelo menos duas vantagens evidentes para conter o câncer: (a) a aplicação a uma grande variedade de cânceres devido ao fato da angiogênese ser um fenômeno comum a todas as doenças malignas, e (b) a restrição e a regressão da neovascularização do tumor deve impedir a passagem de células tumorais para a circulação e, portanto, diminui o risco de metástase.

A família de proteínas adamalisina, também conhecida como “uma desintegrina e proteínas metaloproteinases” (ADAMs), contém um

domínio desintegrina localizado no domínio metaloproteinase. A região desintegrina contém uma seqüência de ligação integrina que interage com as integrinas e pode mediar as interações célula-célula (Wolfsberg, J. Cell Biol. 1995; 131: 275 – 8). A metargidina (proteína metaloprotease – RGD –
5 desintegrina), também denominada ADAM-15 humano, é uma adamalisina transmembrana expressa por células musculares lisas, células mesangiais e em um nível muito mais elevado, células endoteliais angiogênicas ativadas (Krätzschar *et al.*, J. Biol. Chem. 1996; 271: 4593 – 6; Ham *et al.*, Exp. Cell Res. 2002; 279: 239 – 47; Herren *et al.*, FASEB J. 1997; 11: 173 – 80; Martin *et al.*, J. Biol. Chem. 2002; 277: 33683 – 9).

A AMEP (para o Peptídeo de Metargidina Antiangiogênico) é o domínio desintegrina recombinante (RDD) da metargidina. O peptídeo AMEP liga as integrinas, tais como $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$ (Zhang *et al.*, J. Biol. Chem. 1998; 273: 7345 – 50; Nath *et al.*, J. Cell Sci. 1999; 112: 579 – 87), através da
15 seqüência de ligação integrina RGDC, sugerindo que as funções dessas integrinas e metargidinas podem ser mutuamente dependentes. A hipótese de que a AMEP, expressa como proteína recombinante solúvel, pode impedir esta interação, levou a explorar a ação do RDD na angiogênese e no crescimento tumoral.

20 Foi demonstrado previamente que o RDD inibe a proliferação, migração, invasão e organização das células endoteliais no tubo capilar como estruturas *in vitro*. O cDNA RDD, inserido em plasmídeos, foi eletrotransferido em músculos esqueléticos do camundongo em um sistema indutível por tetraciclina. A produção de RDD *in vivo* inibiu o crescimento do tumor MDA-MB-
25 231 s. c. mamário humano em 78% no 14º dia após a eletrotransferência do transgene em músculos e a indução por doxíciclina. Este efeito antitumoral foi associado com uma vascularização do tumor significativamente menor. Além disso, na presença do RDD, a metástase do melanoma B16F10 foi inibida em

74% nos pulmões do rato, após 1 semana de tratamento (Trochon – Joseph *et al.*, *Cancer Res.* 2004; 64: 2062 – 2069).

No entanto, este sistema indutível por tetraciclina requer a co-transfecção de três plasmídeos (plasmídeo PBi-RDD, bem como os vetores
5 Tet-On e Tet-tTS) e a administração associada da doxicilina. Portanto, um método mais simples e eficiente de expressão do RDD DNA *in vivo* foi ponderado para um maior desenvolvimento.

Uma primeira tentativa foi realizada com um plasmídeo pVAX (Invitrogen, V260-20) contendo o promotor do citomegalovírus humano (CMV)
10 direcionando uma expressão constitutiva do transgene, e o gene de resistência à canamicina. No entanto, este vetor não obteve resultados totalmente satisfatórios no que se refere à expressão do transgene e à atividade antiproliferativa *in vitro*.

O cDNA RDD foi ainda clonado em um plasmídeo, desprovido de
15 qualquer gene de resistência a antibióticos, dedicado à aplicação clínica em humanos, fornecido pela Cobra Biomanufacturing: o plasmídeo pORT-RDD. Este novo plasmídeo também é caracterizado por: um promotor constitutivo forte (CMV-IntronA), um sinal de secreção humana (sinal uPA uroquinase humana), um número reduzido de sequências CpG imunoestimulatórias (150
20 em pORT-RDD), um pequeno tamanho e grande número de cópias. Foi revelado que o vetor pORT-RDD alcança inesperadamente um elevado nível de expressão do transgene RDD *in vitro*, associado a uma forte atividade antiproliferativa. Outros experimentos foram realizados *in vivo* que demonstraram atividade antitumoral e antimetastática em modelo animal de
25 melanoma.

Consequentemente, o vetor pORT-RDD fornece uma terapêutica promissora para o tratamento antiangiogênico do câncer e das metástases. Uma vez que é desprovido de qualquer gene de resistência a antibióticos, este

vetor é também particularmente adequado em vista das diretrizes futuras (Diretriz EMEA CPMP/BWP/3088/99; Diretiva 2001/18/CE) relativa aos aspectos clínicos dos medicamentos de transferência de gene.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

5

DEFINIÇÕES

“Metargidina” denota uma proteína desintegrina-RGD-metaloprotease humana, também denominada MDC-15 ou ADAM-15. A clonagem da metargidina foi descrita por Krätzschar *et al.*, (J. Biol. Chem. 1996; 271: 4593 – 6).

10

“RDD” denota o domínio desintegrina da metargidina humana. A seqüência de cDNA do RDD é mostrada na listagem de seqüência anexada como SEQ ID No: 1. “AMEP” ou “Peptídeo de Metargidina Antiangiogênico” denota o peptídeo RDD recombinante.

O termo “derivados” significa uma variante da seqüência de cDNA do RDD, em que um ou mais nucleotídeos são substituídos, adicionados ou deletados da seqüência mencionada acima, contanto que mantenha uma atividade biológica de RDD do tipo selvagem, por exemplo, a inibição da proliferação de células endoteliais e/ou a inibição da angiogênese *in vitro* e/ou *in vivo*. É preferível que tal variante possua uma seqüência com uma identidade de pelo menos 80%, de preferência, pelo menos 85%, pelo menos 90%, de maior preferência, pelo menos 95%, ou pelo menos 98% de identidade com a seqüência do DNA SEQ ID No: 1 mencionada acima.

15

25

A inibição da proliferação celular pode ser avaliada, por exemplo, através da cultura de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), na presença de quantidades crescentes do fragmento de derivados do RDD ou na sua ausência, por exemplo, por 96 h, e através da preparação de um teste de proliferação celular para quantificar a inibição da proliferação celular. A proliferação celular pode ser avaliada por qualquer método apropriado

conhecido pelo técnico no assunto, tal como por meio do teste MT T (por exemplo, a proliferação celular Kit I, Roche Diagnostics, Alemanha).

A inibição da angiogênese pode ser avaliada, por exemplo, pela análise da formação de estruturas tubulares pelas células endoteliais em cultura em uma matriz de suporte, tal como a Matrigel.

O termo “peptídeo” é indiferentemente destinado para um dipeptídeo, um oligopeptídeo ou um polipeptídeo, ou seja, um polímero em que os monômeros são resíduos de aminoácidos unidos através de ligações amida, seja qual for o seu comprimento.

Os “plasmídeos” são moléculas de DNA de fita dupla extracromossomais (dsDNA) que são tipicamente capazes de replicação autônoma dentro de seus hospedeiros, por exemplo, as bactérias. Conforme utilizado no presente, os termos “vetor” e “plasmídeo” indiferentemente denotam o veículo pelo qual a seqüência de cDNA RDD pode ser introduzida em uma célula hospedeira, de modo a transformar o hospedeiro e promover a expressão (por exemplo, transcrição e tradução) da seqüência do RDD.

Um “plasmídeo pORT” denota um plasmídeo que compreende um operador propenso à ligação por um repressor expresso em trans. Dito operador pode ser, por exemplo, o operador lac, operador A, operador trp, operador gal, operador ara, operador Arg e operador Tet. Os plasmídeos pORT foram descritos em Williams *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 1 de maio de 1998, 26 (9): 2120 – 4; Cranenburgh *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 1 de março de 2001; 29 (5): E26; Cranenburgh *et al.*, *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2004; 7 (4): 197 – 203 e no pedido de patente WO 9.709.435.

25

PLASMÍDEO PORT-RDD E SUA PRODUÇÃO

A tecnologia ORT[®] emprega uma titulação do repressor mediada pelo plasmídeo para ativar um marcador selecionável do hospedeiro, removendo a exigência por um gene marcador gerado por plasmídeo. Como

exemplo, uma cepa de bactéria pode ser projetada, que contém um gene essencial, tal como o *dapD* sob o controle transcricional do operador/ promotor lac (*lacO/P*). Na ausência de um indutor, tal como a lactose, esta cepa não pode crescer devido à repressão da expressão de *dapD* pela ligação da

5 proteína repressora LacI ao *lacO/P*. A transformação com um número elevado de cópias do plasmídeo contendo o operador lac (LacO) induz efetivamente a expressão *dapD* pela titulação LacI do operador. A regulação do gene essencial garante o crescimento de bactérias e a manutenção dos plasmídeos recombinantes contendo lacO e uma origem de replicação (Williams *et al.*,

10 *Nucleic Acids Res.* 1 de maio de 1998, 26 (9): 2120 – 4; Cranenburgh *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 1 de março de 2001; 29 (5): E26; Cranenburgh *et al.*, *J Mol Microbiol Biotechnol.*, 2004; 7 (4): 197 – 203).

Um plasmídeo de expressão, pORT-RDD, foi concebido, o que codifica o gene RDD. Mais especificamente, um cassete de expressão

15 contendo o gene RDD conduzido pelo sinal de secreção da uroquinase humana foi inserido em um pORT1aCMV, isto é, um plasmídeo ORT[®] contendo um promotor constitutivo eucariótico forte (CMV-IntronA). O cassete de expressão RDD está, portanto, sob o controle do promotor do citomegalovírus forte (CMV) e colocado *upstream* do sinal de poliadenilação do hormônio de

20 crescimento bovino (bGH). A seqüência do plasmídeo pORT-RDD é mostrada na SEQ ID No: 2.

Portanto, a presente invenção se refere a um plasmídeo pORT contendo uma seqüência de codificação de todo ou parte de um domínio desintegrina de uma metargidina, ou um derivado do mesmo, em que dita

25 seqüência é inserida sob o controle do promotor de citomegalovírus forte (CMV).

Em particular, o plasmídeo pORT pode conter uma seqüência de codificação de um domínio desintegrina de metargidina de seqüência SEQ ID

No: 1 ou uma variante do mesmo, em que um ou mais nucleotídeos são substituídos, adicionados, deletados da SEQ ID No: 1 e que possua pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID No: 1 e que mantenha a capacidade de inibir a proliferação das células endoteliais e/ou a inibição da angiogênese *in vitro* e/ou *in vivo*.

O plasmídeo da presente invenção pode conter uma “parte” de um domínio desintegrina de uma metargidina. Nesse caso, é preferível que a parte (que pode ser denominada de “fragmento”) do domínio desintegrina da metargidina mantenha a atividade biológica do RDD tipo selvagem, por exemplo, a inibição da proliferação de células endoteliais e/ou a inibição da angiogênese *in vitro* e/ou *in vivo*. Em particular, o plasmídeo contendo uma seqüência de codificação do domínio desintegrina da metargidina (RDD) pode possuir a seqüência apresentada na SEQ ID No: 2.

Dito plasmídeo, também denominado plasmídeo pORT-RDD, pode ser produzido de acordo por qualquer método apropriado, em particular, pela tecnologia do DNA recombinante. Por exemplo, o plasmídeo pORT-RDD pode ser amplificado em uma célula hospedeira apropriada, tal como uma célula hospedeira bacteriana, em particular, uma bactéria *Escherichia coli*, mais especificamente, uma *Escherichia coli* manipulada para conter um gene cromossomal essencial, como o *dapD*, sob controle transcricional do operador/promotor lac (*lacO/P*).

Além disso, o plasmídeo pORT-RDD é um plasmídeo de expressão que torna possível expressar o peptídeo RDD quando transfectado em uma célula hospedeira apropriada, por exemplo, uma célula hospedeira de mamífero, em particular, uma célula tumoral.

Portanto, a presente invenção ainda fornece uma célula hospedeira transformada com plasmídeo pORT-RDD. O termo “célula hospedeira” significa qualquer célula de qualquer organismo que é selecionada,

modificada, transformada, está em cultura ou é utilizada ou manipulada de qualquer forma, para a produção de uma substância pela célula, por exemplo, a amplificação pela célula de plasmídeo pORT-RDD, ou para a expressão do peptídeo RDD pela célula.

5 A introdução *ex vivo* ou *in vivo* do plasmídeo pORT-RDD na célula hospedeira pode ser efetuada por qualquer método padrão bem conhecido pelo técnico no assunto, por exemplo, pela transfecção, eletroporação, microinjeção, transdução, fusão celular, dextrano DEAE, precipitação de fosfato de cálcio, uso de uma arma de genes (*gene gun*), ou
10 lipofecção.

A presente invenção ainda fornece um método de: (a) produção do plasmídeo pORT-RDD, cujo método compreende as etapas que consistem no cultivo de uma célula hospedeira transformada com dito plasmídeo pORT-RDD, e (b) a recuperação do plasmídeo pORT-RDD a partir das células
15 hospedeiras cultivadas.

Para a produção e a amplificação do plasmídeo pORT-RDD, poderão ser utilizados, em particular, as linhagens DH1 de *Escherichia coli*, conforme descrito por Cranenburgh *et al.*, (*Nucleic Acids Res.*, 1 de março de 2001; 29 (5): E26), isto é, cepas que contenham o gene *dapD* cromossomal
20 sob o controle do operador/ promotor *lac*. Estas linhagens estão disponíveis pela Cobra Bio-manufacturing. As células hospedeiras transformadas podem ser facilmente isoladas e propagadas porque, salvo em cultura em um meio suplementado com IPTG (que induz a expressão de *dapD*) ou DAP, apenas os transformantes podem crescer em qualquer meio pela seleção por titulação do
25 repressor.

O plasmídeo pORT-RDD pode ser facilmente produzido por um técnico no assunto, por exemplo, através da inoculação de um meio de cultura adequado, como o meio LB (isto é, peptona a 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L,

NaCl 5 g/L), com uma cepa ORT transformada e em cultura. Em uma escala de laboratório, esta pode ser realizada em um frasco de laboratório convencional, incubando a 37° C, de preferência, sob agitação (por exemplo, 200 rpm).

O plasmídeo pORT-RDD também pode ser produzido em uma
5 escala maior em um fermentador. Vantajosamente, uma fermentação pode ser realizada de acordo com o protocolo descrito por Varley *et al.*, (*Bioseparation*. 1999; 8 (1-5): 209 – 17), ou de acordo com uma adaptação da mesma. Um meio de cultura adequado para efetuar a fermentação contém KH₂PO₄ a 3 g/L, Na₂HPO₄ a 6 g/L, NaCl a 0,5 g/L, polipropileno glicol MW 2025 g a 0,2%,
10 solução de elemento traço, CaCl₂.2H₂O a 0,03 g/L, FeSO₄.7H₂O a 0,04 g/L, ácido cítrico a 0,02 g/L, e MgSO₄ a 0,5 g/L de solução de vitamina, tetraciclina a 12 mg/L. O meio pode ainda compreender a peptona a 2 g/L, extrato de levedura a 20 g/L, (NH₄)₂SO₄ a 10 g/L, 2,8% de glicerol. Alternativamente, a peptona, o extrato de levedura, o (NH₄)₂SO₄ e o glicerol podem ser alimentados
15 continuamente no recipiente de fermentação. A fermentação é realizada, de preferência, a 37° C, pH 6,8 com um ponto definido de oxigênio dissolvido de 50% da saturação do ar.

As culturas recolhidas são geralmente centrifugadas para peletizar as células. Os *pellets* de células podem então ser congelados e
20 armazenados a – 70° C antes da purificação.

A escolha de um método apropriado para a purificação do plasmídeo pORT-RDD está dentro das competências comuns do técnico no assunto.

De preferência, a purificação pode ser obtida pelas etapas de: (a)
25 lise alcalina das células hospedeiras em cultura seguida de uma neutralização; (b) filtração da bolsa de malha; (c) cromatografia por troca aniônica, (d) concentração, (e) cromatografias de exclusão por tamanho e fase reversa por pareamento iônico, e (f) filtração.

Conseqüentemente, a presente invenção ainda fornece um método para a produção de um plasmídeo pORT-RDD que compreende as etapas que consistem em:

5 (a) cultura de células hospedeiras transformadas com o plasmídeo pORT-RDD;

(b) recuperação do plasmídeo pORT-RDD das células hospedeiras em cultura; e

10 (c) purificação de dito plasmídeo pORT-RDD por (i) lise alcalina das células hospedeiras em cultura e neutralização, (ii) filtração em bolsa de malha, (iii) cromatografia por troca aniônica, (iv) concentração/diafiltração, (v) cromatografias de exclusão por tamanho e fase reversa por pareamento iônico, e (vi) filtração.

A presente invenção também se refere a um método para a purificação do plasmídeo pORT-RDD de uma célula hospedeira transformada, 15 cujo método compreende as etapas de: (a) lise alcalina das células hospedeiras seguida por uma neutralização; (b) filtração em bolsa de malha; (c) cromatografia por troca aniônica, (d) concentração, (e) cromatografias de exclusão por tamanho e fase reversa por pareamento iônico, e (f) filtração.

Um método para a produção e/ou a purificação do plasmídeo 20 pORT-RDD está mais detalhado no Exemplo 1 a seguir.

Quando a célula hospedeira for uma célula de mamíferos, a presente invenção ainda fornece um método para a expressão *in vitro* ou *in vivo* dos peptídeos RDD em uma célula, que compreende transformar dita célula com plasmídeo pORT-RDD, pelo qual o peptídeo RDD (ou AMEP, uma 25 vez que é o peptídeo recombinante RDD) é expresso na célula. As células de mamíferos são, em particular, células tumorais.

A expressão do peptídeo RDD pode encontrar aplicação em situações onde a atividade angiogênica deve ser inibida, por exemplo, no

câncer. Além disso, os Depositantes demonstraram, inesperadamente, que o peptídeo RDD exibe uma atividade antitumoral direta *in vitro*. Em particular, foi demonstrado que o plasmídeo pORT-RDD inibe a proliferação de células tumorais em culturas de células de melanoma transfectadas com o plasmídeo.

5 As aplicações terapêuticas estão detalhadas abaixo.

**TESTE DE POTÊNCIA *IN VITRO* PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS LOTES DE PLASMÍDEO
pORT-RDD**

Um método foi desenvolvido pelos Depositantes para testar, *in vitro*, a potência do plasmídeo pORT-RDD, a fim de poder comparar ou
10 normalizar a potência de lotes diferentes de plasmídeo pORT-RDD. A presente invenção, portanto, fornece um método *in vitro* de avaliação da potência inibitória do plasmídeo pORT-RDD sobre a proliferação de células tumorais, que compreende as etapas que consistem em:

(a) fornecer as culturas sub-confluentes de uma linhagem de
15 célula tumoral;

(b) transfectar as culturas de células da etapa (a), separadamente, com quantidades crescentes de um plasmídeo pORT-RDD de acordo com a presente invenção, ou com um controle;

(c) cultivar as células transfectadas da etapa (b) sob condições
20 adequadas para a obtenção da proliferação das células transfectadas com o controle;

(d) para cada determinada quantidade de plasmídeo pORT-RDD transfectado, determinar a porcentagem de células sobreviventes, em comparação com o número de células em cultura celular fornecida na etapa
25 (a), que foi submetida à transfecção com dita quantidade específica de plasmídeo pORT-RDD;

(e) para as células transfectadas com o controle, determinar a porcentagem de células sobreviventes, e em comparação com o número de

células na cultura celular fornecida na etapa (a), que foi submetida à transfecção com dito controle;

em que o plasmídeo pORT-RDD é determinado como possuindo o potencial inibitório se a porcentagem de células sobreviventes calculadas na etapa (d) for menor do que a porcentagem de células sobreviventes calculadas na etapa (e).

A linhagem celular do tumor, que pode ser utilizada de acordo com o método da presente invenção pode ser, em particular, uma linhagem de células de melanoma, tais como as células B16F10, células C9 ou células 451 Lu.

De preferência, a cultura da linhagem celular do tumor é fornecida em 50 a 80% de confluência, de maior preferência, a 50% de confluência. As sub-culturas confluentes de uma linhagem de célula tumoral podem ser preparadas, por exemplo, ao cultivar 15.000 células B16F10, ou 30.000 células C9, ou 30.000 células 451 Lu por cavidade em uma placa de 24 cavidades múltiplas.

Quantidades crescentes do plasmídeo pORT-RDD que podem ser utilizadas para a transfecção podem ser facilmente determinadas pelo técnico no assunto. Por exemplo, quantidades variando de 0,1 a 2,0 µg de plasmídeo pORT-RDD podem ser utilizadas para transfectar 15.000 células B16F10, ou 30.000 células C9 ou 30.000 células 451 Lu.

A taxa de transfecção *in vitro* pode ser melhorada através da lipofecção, por exemplo, utilizando o reagente Lipofectamine® e Plus®, tal conforme comercializado pela Invitrogen.

No método da presente invenção, o “controle” consiste na mistura de transfecção que é utilizado de outra forma para transfectar as células com quantidades diferentes de plasmídeo pORT-RDD. O controle é desprovido de plasmídeo.

A transfecção pode ser normalmente realizada pelas células incubadas a 37° C, 5% de CO₂, por exemplo, por 4 horas, em um meio livre de soro contendo, por exemplo, reagentes para a lipofecção, e nenhum DNA plasmidial (controle), ou diferentes quantidades de DNA plasmidial.

5 As células estão, deste modo, classicamente em cultura, isto é, em um meio completo (isto é, um meio de suporte do crescimento celular), a 37° C, a 5% de CO₂, por exemplo, 72 a 120 horas, de preferência, por 96 horas.

A sobrevivência celular é avaliada no final do período de cultura, por qualquer método adequado conhecido pelo técnico no assunto, por exemplo, utilizando o reagente MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio), ou o azul de tripano.

10 Para efeito de comparação entre os lotes, as porcentagens determinadas de sobrevivência celular podem ser representadas como a porcentagem de células sobreviventes como uma função da quantidade de DNA plasmidial transfectado, conforme mostrado nas Figuras de 12 a 14.

LIOFILIZAÇÃO DO PLASMÍDEO PORT-RDD

A presente invenção ainda apresenta um método para a preparação do plasmídeo pORT-RDD liofilizado que compreende as etapas que consistem em:

(a) congelamento de uma solução de plasmídeo pORT-RDD de -40° C a -60° C;

(b) uma etapa de sublimação que é realizada através do aumento da temperatura a uma temperatura de +5° C a +15° C durante um período de 10 a 20 horas sob uma pressão de 20 a 30 Pa (200 a 300 µbars) e

(c) uma etapa de secagem secundária que é realizada à temperatura ambiente, de preferência, a 20° C, a 20 a 30 Pa (200 a 300 µbars), até o plasmídeo pORT-RDD atingir a temperatura ambiente (+20° C), então a 3

- 7 Pa (30 – 70 μ bars) por até 20 horas.

A etapa de congelamento pode ser realizada através da diminuição da temperatura da solução pORT-RDD à temperatura ambiente (em especial, 20° C) de -40° C a -60° C dentro de 1 a 2 horas, e mantendo a temperatura por 2 horas. De preferência, a etapa de congelamento é realizada a uma temperatura de -50° C.

A etapa de sublimação é realizada, de preferência, abaixo de 25 Pa (250 μ bars) de pressão de 50° C a 10° C por 3 horas, então, a 10° C (temperatura de mesa) por 12 horas.

A secagem secundária é realizada, de preferência, a 5 Pa (50 μ bars), a + 20° C por até 20 horas.

Vantajosamente, o manitol e a glicose podem ser utilizados como crioprotetores durante o curso do processo de liofilização. Deste modo, o plasmídeo pORT-RDD pode ser formulado em uma solução contendo manitol e glicose.

Por exemplo, manitol a 2% (a 100 mg/mL) e glicose a 1% (a 500 mg/mL) (as porcentagens são expressas em volume de solução de manitol ou glicose sobre o volume da solução de plasmídeo) podem ser adicionados em uma solução plasmidial de pORT-RDD, em especial, em uma solução de plasmídeo pORT-RDD formulada a 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, pH 7,5, antes do congelamento.

Portanto, a solução de plasmídeo pORT-RDD submetida ao congelamento, de preferência, contém de 1,9 a 2,0 mg/mL de manitol e de 4,8 a 4,9 mg/mL de glicose.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

A presente invenção ainda fornece a utilização do plasmídeo pORT-RDD para a preparação de um medicamento destinado ao tratamento de tumor.

A presente invenção também diz respeito à utilização do plasmídeo pORT-RDD para o tratamento de tumores.

É também apresentado um método para o tratamento do tumor que compreende a administração a um indivíduo que dele necessita, de uma
5 quantidade terapêuticamente eficaz de plasmídeo pORT-RDD.

No contexto da presente invenção, o termo “tratar” ou “tratamento” significa reverter, aliviar, inibir o progresso, ou prevenir a disfunção ou condição a que tal termo se aplica, ou um ou mais sintomas de tal disfunção ou condição.

10 “Quantidades terapêuticamente eficazes” são aquelas quantidades eficazes para produzir os resultados benéficos, especialmente com relação ao tratamento de câncer, no indivíduo destinatário. Essas quantidades podem ser inicialmente determinadas pela revisão da literatura publicada, através da realização de testes *in vitro* ou pela realização de
15 estudos metabólicos em animais de experimentação saudáveis.

Conforme utilizado no presente, o termo “indivíduo” designa um mamífero, tal como um roedor, um felino, um canino e um primata. De preferência, um indivíduo de acordo com a presente invenção é um ser humano.

20 À medida que o peptídeo RDD possui atividade anti-angiogênica, a terapia com o plasmídeo pORT-RDD pode encontrar aplicação em grande variedade de tipos de câncer e pode impedir a passagem de células tumorais para a circulação, isto é, prevenir a ocorrência e/ou o desenvolvimento de metástases.

25 De acordo com a presente invenção, o tumor pode ser qualquer tumor, por exemplo, um tumor primário ou metastático, um tumor sólido ou tumor de partes moles, ou uma malignidade hematológica. Na verdade, existem provas crescentes de que a angiogênese também desempenha um

papel importante em doenças hematológicas (Dong *et al.*, *Crit. Ver. Oncol. Hematol.*, 21 de dezembro de 2006). Os exemplos de tumor sólido ou moles incluem câncer de bexiga, mama, osso, cérebro, útero, colo-retal, endométrio, rim, fígado, pulmões, sistema nervoso, ovário, próstata, testículo, tireóide, útero e pele, especialmente o melanoma. As neoplasias hematológicas incluem, por exemplo, leucemias agudas ou crônicas, tais como a leucemia mielóide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide crônica ou leucemia linfocítica crônica, linfoma, mieloma múltiplo e síndromes mielodisplásicas.

De acordo com uma realização, o medicamento, o plasmídeo ou o método de tratamento de acordo com a presente invenção é destinado à prevenção e/ou ao tratamento de um tumor metastático.

Embora seja possível para o plasmídeo pORT-RDD ser administrado isoladamente, é preferível apresentar o pORT-RDD como uma composição farmacêutica.

Deste modo, a presente invenção ainda apresenta uma composição farmacêutica que compreende o plasmídeo pORT-RDD, juntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável.

Conforme utilizado no presente, o termo “farmaceuticamente aceitável” e suas variações gramaticais, tal como eles se referem às composições, veículos, transportadores, diluentes e reagentes, é utilizado intercambiavelmente e representa que os materiais são capazes de administração ao indivíduo, ou sobre o mesmo, sem a produção dos efeitos fisiológicos indesejáveis, tais como náusea, tontura, indisposição gástrica e outros. Os transportadores farmacêuticamente aceitáveis adequados conhecidos no estado da técnica incluem, mas não estão limitados a, água estéril, soro fisiológico, glicose, dextrose ou soluções tampão. Os veículos podem incluir agentes auxiliares incluindo, mas não limitados a, diluentes, estabilizantes (isto é, açúcares e aminoácidos), conservantes, agentes

molhantes, agentes emulsionantes, agentes de tampão do pH, aditivos de reforço da viscosidade, cores e similares.

A composição farmacêutica que compreende o plasmídeo pORT-RDD pode ser administrada por via intravenosa, intradérmica, intra-arterial, intraperitoneal, intralesional, intracranial, intra-articular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, rectal, tópica, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutânea, intravesicular, mucosa, intrapericardial, oral, tópica, localmente e/ou utilizando aerosol, injeção, infusão, infusão contínua, perfusão localizada banhando as células alvo diretamente ou através de um cateter e/ou lavagem. Por exemplo, uma composição pORT-RDD da presente invenção pode ser formulada para administração parenteral, por exemplo, formulada para a injeção pela via intravenosa, intramuscular ou subcutânea, embora outras vias, tais como a administração em aerossol possam ser utilizadas. A preparação de uma composição aquosa que contém o plasmídeo pORT-RDD da presente invenção e/ou do agente adicional, como um ingrediente ativo, será conhecida pelo técnico no assunto à luz do presente relatório descritivo, conforme exemplificado por *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Mack Publishing Company, 1980.

Tipicamente, tais composições são preparadas como soluções líquidas ou como suspensões injetáveis; também podem ser preparadas formas sólidas apropriadas para a preparação de soluções ou suspensões na adição de um líquido antes da injeção. A preparação também pode ser emulsionada. Em particular, as composições farmacêuticas podem ser formuladas na forma de dosagem sólida, por exemplo, cápsulas, comprimidos, pílulas, pós, drágeas ou grânulos. As soluções estéreis injetáveis são preparadas pela incorporação do plasmídeo na quantidade requerida, no solvente adequado, com vários dos outros ingredientes enumerados acima,

conforme necessário, seguido da esterilização filtrada. O meio líquido deve ser imediatamente tamponado, caso necessário, e o diluente líquido primeiro tornado isotônico antes da injeção com solução salina ou glicose suficiente. A preparação de composições altamente concentradas para a injeção direta é também contemplada, em que a utilização de DMSO como solvente é prevista para resultar em penetração extremamente rápida, proporcionando alta concentração de agentes ativos em uma pequena área. As composições serão estéreis, fluidas na medida em que existe uma seringabilidade fácil, estável nas condições de fabricação e armazenamento, e preservadas contra a ação contaminante dos microrganismos. Os exemplos de solventes adequados utilizáveis para a preparação das composições injetáveis incluem uma solução de TENaCl consistindo em 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, 150 mM de NaCl, pH 7,5, ou soro fisiológico (NaCl a 0,9%).

As formulações podem ser preparadas em forma de dosagem unitária por qualquer um dos métodos bem conhecidos no estado da técnica da farmácia. Tais métodos incluem a etapa de associar o plasmídeo pORT-RDD com o veículo, que constitui um ou mais ingredientes acessórios. Em geral, as formulações são preparadas de maneira uniforme e íntima ao associar o plasmídeo pORT-RDD com os veículos líquidos ou veículos sólidos finamente divididos ou ambos, e, em seguida, caso necessário, moldar o produto.

A quantidade real de dosagem de uma composição de plasmídeo pORT-RDD da presente invenção (e/ou um agente adicional), para a administração a um indivíduo, pode ser determinada por fatores físicos e fisiológicos, como o peso corporal, volume do tumor, gravidade da doença, idiopatia do indivíduo e a via de administração. Em vista destas considerações, a dosagem de uma composição lipídica para um indivíduo particular e/ou para o curso do tratamento pode ser facilmente determinada.

O tratamento pode variar dependendo do indivíduo e do modo

específico de administração. Por exemplo, na presente invenção, o intervalo de dose do plasmídeo pORT-RDD pode ser de cerca de 0,05 mg/kg de peso corporal a cerca de 500 mg/kg de peso corporal. O termo “peso” é aplicável quando o animal está sendo tratado. Quando as células isoladas estão sendo tratadas, o “peso corporal”, utilizado no presente deve ser interpretado como “peso celular total”. O termo “peso total” pode ser utilizado para se aplicar a ambas as células isoladas e o tratamento do animal. No entanto, os técnicos no assunto irão reconhecer a utilidade de uma variedade da gama de dosagem, por exemplo, de 0,05 mg/kg de peso corporal a 300 mg/kg de peso corporal, de 0,1 mg/kg de peso corporal a 100 mg/kg de peso corporal, de 0,2 mg/kg de peso corporal a 50 mg/kg de peso corporal, ou de 0,5 mg/kg de peso corporal a 10 mg/kg de peso corporal. O regime de dosagem preferido pode estar entre 0,1 e 1 mg/kg de peso corporal. Evidentemente, todas essas dosagens são exemplares e também é esperado que qualquer dosagem entre esses pontos também seja utilizada na presente invenção. O nível de dose específica para qualquer indivíduo em particular dependerá de uma variedade de fatores, incluindo o peso do corpo, saúde geral, sexo, dieta, tempo e via de administração, taxas de absorção e excreção, combinação com outras drogas e da gravidade do câncer particular sendo tratado.

Qualquer forma adequada de administração do plasmídeo pORT-RDD pode ser utilizada por um técnico no assunto. Tais métodos incluem, mas não estão limitados, ao fornecimento direto do plasmídeo por: injeção, microinjeção, eletroporação, eletrotransferência, injeção sem agulha, precipitação de fosfato de cálcio, utilizando DEAE-dextrano seguido por polietileno glicol, carregamento sônico direto, transfecção mediada por lipossomos, transfecção mediada por receptor, bombardeio de microprojéteis, agitação com fibras de carbeto de silício, transformação mediada por PEG de protoplastos, dessecação/inibição mediada pela absorção de DNA, ou qualquer

combinação desses métodos. De preferência, o plasmídeo pORT-RDD é administrado por eletrotransferência, conforme descrito abaixo.

PROTOCOLO DE ELETROTRANSFERÊNCIA

O plasmídeo pORT-RDD foi administrado com sucesso por
5 eletrotransferência intratumoral ou intramuscular a camundongos com tumores subcutâneos. Deste modo, a presente invenção se refere à utilização do plasmídeo pORT-RDD para o tratamento de tumores por eletrotransferência, em particular, através da eletrotransferência intratumoral e/ou intramuscular.

A presente invenção ainda fornece a utilização do plasmídeo
10 pORT-RDD para a preparação de um medicamento destinado a ser eletrotransferido *in vivo* para células tumorais. A presente invenção também se refere à utilização do plasmídeo pORT-RDD para a eletrotransferência *in vivo* em células tumorais.

O plasmídeo a ser administrado pode ser eletrotransferido de
15 acordo com qualquer método adequado conhecido no estado da técnica.

Vantajosamente, a eletrotransferência pode ser realizada de acordo com o protocolo descrito no pedido de patente PCT/IB2006/002401.

De acordo com este protocolo, o plasmídeo ou o medicamento é colocado em contato com as células tumorais ou musculares e o tumor ou o
20 músculo é eletricamente estimulado conforme segue:

- primeiro, com pelo menos um pulso de intensidade do campo de Alta Tensão (HV) entre 200 e 2.000 volts/cm;

- segundo, com um único pulso de intensidade do campo de Baixa Tensão (BT) entre 50 e 200 volts/cm e com uma duração entre 300 e
25 2.000 ms.

O plasmídeo pode ser colocado em contato com as células tumorais ou musculares de alguns segundos a 10 minutos, por exemplo, de 30 segundos a 5 minutos, antes de aplicar o(s) pulso(s) HV.

A eletrotransferência intramuscular é realizada, de preferência, nos músculos que estão acessíveis para os eletrodos de eletrotransferência, isto é, os músculos na superfície do corpo.

O plasmídeo pode ser colocado em contato através da injeção intratumoral direta, através da administração sistêmica (por exemplo, por via intravenosa ou intra-arterial) ou pela administração tópica ou subcutânea. A injeção intramuscular do plasmídeo pode ser utilizada para colocar o plasmídeo em contato com as células tumorais ou musculares.

Em particular, o tecido tumoral ou muscular pode ser eletricamente estimulado primeiro com pelo menos um pulso de uma intensidade do campo HV entre 400 e 2.000 volts/cm, de preferência, entre 600 e 2.000, de preferência, entre 800 e 1.600 volts/cm, de maior preferência, entre 900 e 1.200, tipicamente em cerca de 1.000 volts/cm. O pulso HV pode possuir uma duração entre 10 e 1.000 μ s, de preferência, entre 50 e 200 μ s, tipicamente, de cerca de 100 μ s.

Pode haver diversos pulsos HV, isto é, de 2 a 10 pulsos HV possuindo as especificações descritas no presente. É mais conveniente, neste caso, ter pulsos HV idênticos. A frequência dos pulsos HV pode ser de 1 Hz. No entanto, um único pulso HV, tal conforme indicado acima é suficiente para permeabilizar a membrana celular. Portanto, na realização preferida, a utilização é feita de um único pulso HV.

Onde há um único pulso HV, é preferível um pulso quadrado. No caso dos diversos pulsos HV, pode ser feita a utilização de pulsos unipolares ou bipolares, ou de pulsos possuindo direções e/ou polaridades diferentes, de preferência, do tipo quadrado.

De acordo com uma realização, pelo menos um pulso de uma força de campo HV consiste em um pulso HV = 1.500 V/cm, 100 μ s, 1 Hz.

Os pulsos HV e LV podem ser separados por lapso e esse lapso

ode estar vantajosamente entre 300 ms e 3.000 s, de preferência, entre 500 ms e 1.000 s, de preferência, entre 500 ms e 10 s, tipicamente de cerca de 1.000 ms. Em uma realização particular, não há lapso ou apenas um pequeno, de menos de 300 ms, e o pulso HV tem um campo de força entre 300 e 1.000 volts/cm, de preferência, entre 400 e 800 volts/cm.

O único pulso LV pode possuir um campo de força entre 100 e 200 volts/cm, de preferência, entre 120 e 160 volts/cm, tipicamente, cerca de 140 volts/cm. O único pulso LV pode possuir uma duração de entre 300 e 800 ms, de preferência, de entre 350 e 600 ms, tipicamente de cerca de 400 ms.

O pulso LV pode ser da mesma polaridade que o pulso HV, ou pode possuir uma polaridade oposta àquela do pulso HV. De preferência, o único pulso LV é um pulso quadrado. Também pode ser trapezoidal ou descontínuo.

De acordo com uma realização, o pulso LV possui uma força de campo de 140 V/cm e tem uma duração de 400 ms.

O protocolo de eletrotransferência que pode ser implementado de acordo com a presente invenção é:

- HV: 1000 – 1600 V/cm, 50 – 200 μ s, 1 pulso, 1 Hz,
- Pausa: entre 500 ms e 10 s,
- LV = 100 – 200 V/cm, 300 – 800 ms, 1 pulso.

De preferência, o seguinte protocolo eletrotransferência pode ser utilizado:

- HV = 1300 V/cm, 100 μ s, 1 Hz, 1 pulso,
- Pausa = 1.000 ms,
- LV = 140 V/cm, 400 ms, 1 pulso.

Alternativamente, o seguinte protocolo de eletrotransferência também pode ser utilizado, de preferência:

- HV = 1500 V/cm, 100 μ s, 1 Hz, 1 pulso,

- Pausa: 1.000 ms,
- LV = 140 V/cm, 400 ms, 1 pulso.

A presente invenção será ainda ilustrada, em vista das Figuras e Exemplos a seguir.

5

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é o mapa do plasmídeo pORT1aCMV.

A Figura 2 é o mapa de plasmídeo pORT-RDD.

A Figura 3 é o mapa de pVAX1 plasmídeo.

A Figura 4 é uma representação do crescimento dos tumores B16F10 subcutâneos durante 14 dias, após a eletrotransferência intratumoral dos vetores baseados em pORT. 50 µg de plasmídeo (em 50 µL de Tris a 10 mM, EDTA a 1 mM, NaCl a 0,9%, pH 7,5) foram injetados e pulsos elétricos foram aplicados, quando os volumes do tumor eram > 30 mm³ (dia 0). Os dados representam o volume do tumor (média ± SD) para cada grupo (no dia 0, pORT1aCMV n = 10 (uma morte natural durante o experimento) e pORT-RDD n = 11 (duas mortes naturais durante o experimento), no dia 14, n = 9 para cada grupo). Estrelas indicam significância estatística.

A Figura 5 é uma representação do crescimento tumoral dos tumores B16F10 subcutâneos durante os primeiros 7 dias, após a eletrotransferência intratumoral dos vetores com base em pORT. Os dados representam o volume do tumor (média ± SD) para cada grupo. Estrelas indicam significância estatística.

A Figura 6 mostra a análise do volume do tumor em mm³ para pequenos tumores B16F10 subcutâneos tratados por eletrotransferência intratumoral dos vetores com base em pORT. Os volumes do tumor estavam compreendidos entre 33,51 e 65,45 mm³ no dia 0. Os dados representam o volume do tumor (média ± SD) para cada grupo. Os camundongos mortos foram excluídos deste gráfico: pORT1aCMV n = 6 e pORT-RDD n = 7. Não há

significância estatística.

A Figura 7 demonstra a análise de acompanhamento do tumor, expresso em relação V/V_0 para os tumores pequenos B16F10 subcutâneos tratados por eletrotransferência intratumoral dos vetores com base em pORT.

5 Os volumes dos tumores estavam compreendidos entre 33,51 e 65,45 mm^3 no dia 0. V/V_0 representa a razão entre o volume do tumor no dia 0 e o volume do tumor no dia D. Os dados representam a razão do tumor (média \pm SD) para cada grupo. Os camundongos mortos foram excluídos deste gráfico: pORT1aCMV $n = 6$ e pORT-RDD $n = 7$. Estrelas indicam significância
10 estatística.

A Figura 8 mostra a análise do crescimento do tumor dos tumores B16F10 subcutâneos após eletrotransferência intratumoral de doses crescentes de plasmídeo pORT-RDD. As doses crescentes de plasmídeo pORT-RDD foram injetadas em tumores subcutâneo B16F10 pré-estabelecido
15 e pulsos elétricos foram aplicados, quando o volume do tumor compreendiam entre 30 e 50 mm^3 (dia 0). Os dados representam o volume do tumor (média \pm SD) para cada grupo.

A Figura 9 mostra a análise do controle do volume do tumor em mm^3 para os tumores B16F10 subcutâneos tratados por eletrotransferências
20 intratumorais repetidas do plasmídeo pORT-RDD. Os dados representam o volume do tumor (média \pm SD) para cada grupo (TE veículo $n = 20$; pORT-RDD 1X $n = 10$; pORT-RDD 2X $n = 20$).

A Figura 10 mostra o controle do volume do tumor por ultrasonografia, após uma única eletrotransferência intratumoral de 200 μg do
25 plasmídeo pORT-RDD.

A Figura 11 mostra o controle do vaso sanguíneo do tumor por ultra-som Doppler, após uma única eletrotransferência intratumoral de 200 μg de plasmídeo pORT-RDD.

A Figura 12 mostra a inibição da proliferação de células B16F10 após transfecção com quantidades crescentes de plasmídeo pORT-RDD (BA015-VCC-004).

5 A Figura 13 mostra a inibição da proliferação celular C9 após transfecção com quantidades crescentes de plasmídeo pORT-RDD (BA015-VCC-004).

A Figura 14 mostra a inibição da proliferação celular 451Lu após transfecção com quantidades crescentes de plasmídeo pORT-RDD (BA015-VCC-004).

10 A Figura 15 mostra os resultados da análise de gel de agarose das formas de plasmídeo sobre as amostras de plasmídeo não-lioofilizadas e liofilizadas (M: marcador da fita de DNA de 1Kb, Invitrogen).

A Figura 16 mostra os resultados da análise da proliferação das células do melanoma C9. As células foram transfectadas com doses crescentes de plasmídeo pORT-RDD não-lioofilizados (lote 3) e liofilizados (lote 4) segundo um protocolo da Lipofectamina plus (n = 4 para cada dose). Os dados representam a média \pm SD.

20 A Figura 17 mostra os resultados da análise da proliferação de células de melanoma 451Lu. As células foram transfectadas com doses crescentes de plasmídeo pORT-RDD não-lioofilizados (lote 3) e liofilizados (lote 4) segundo um protocolo da Lipofectamina plus (n = 4 para cada dose). Os dados representam a média \pm SD.

A Figura 18 mostra a análise do controle do volume do tumor em mm^3 para os tumores B16F10 subcutâneos tratados por eletrotransferência intratumoral de plasmídeo pORT-RDD não-lioofilizados e liofilizados. Os dados representam o volume do tumor (média \pm SD) para cada grupo.

A Figura 19 mostra o controle do volume do tumor dos tumores B16F10 subcutâneos tratados por eletrotransferência intramuscular do

plasmídeo pORT-RDD e do veículo. Os dados representam o volume do tumor (média \pm SD) para cada grupo.

A Figura 20 mostra o controle do volume do tumor dos tumores B16F10 subcutâneos tratados por eletrotransferência intramuscular do plasmídeo pORT-RDD e do veículo do dia 0 (injeção de células) ao dia 8. Os dados representam o volume do tumor (média \pm SD) para cada grupo.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

PRODUÇÃO DO PLASMÍDEO PORT-RDD

10

PLASMÍDEOS:

Cobra biomanufacturing gerou um plasmídeo de expressão, pORT-RDD, que codifica o gene RDD tradicionalmente fundido a jusante do peptídeo sinal da uroquinase humana. A seqüência de codificação está sob o controle do promotor do citomegalovírus eucariótico forte (CMV) e colocado a montante do sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (bGH).

O pORT-RDD foi destinado para a inserção de um cassete de gene contendo o gene RDD conduzido pelo sinal da secreção de uroquinase humana no plasmídeo pORT1aCMV da Cobra biomanufacturing's (mapa na Figura 1).

20

A seqüência do gene cassete foi a seguinte:

AAGCTTATGAGAGCCCTGCTGGCGCGCCTGCTTCTCTGCGT
CCTGGTCGTGAGCGACTCCAAAGGCATGGCTGCTTTCTGCGGAAATATGT
TTGTGGAGCCGGGCGAGCAGTGTGACTGTGGCTTCTGGATGACTGCGT
CGATCCCTGCTGTGATTCTTTGACCTGCCAGCTGAGGCCAGGTGCACAGT
GTGCATCTGACGGACCCTGTTGTCAAATTGCCAGCTGCGCCCGTCTGGC
TGGCAGTGTGTCCTACCAGAGGGGATTGTGACTTGCCTGAATTCTGCCC
AGGAGACAGCTCCCAGTGTCCCCCTGATGTCAGCCTAGGGGATGGCGAG
TAATCTAGA (348 bp) (SEQ ID No: 3).

25

Os sítios de restrição *HindIII* e *XbaI* são apresentados em negrito, o sinal de secreção da uroquinase humana está sublinhado, e o gene RDD está em itálico.

O cassete de genes sintéticos e o pORT1aCMV foram digeridos por *HindIII* e *XbaI* e os fragmentos ligados para criar o plasmídeo pORT-RDD.

O vetor pORT-RDD, portanto, contém os seguintes elementos (mapas do plasmídeo na Figura 2): promotor do citomegalovírus humano imediato-precoce (CMV) + íntron a, promotor mais forte do que o CMV clássico (fonte da Cobra), sinal de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino (bGH), seqüências LacO para a seleção e gene RDD humano sob o controle do sinal de secreção da uroquinase humana.

O pORT-RDD foi então transformado na linhagem hospedeira DH1-ORT e fabricada pela fermentação. A linhagem DH1 Lac dapD com referencia em Cranenburgh *et al.*, 2001, também podem ser utilizada.

PRODUÇÃO DE PORT- RDD:

PRODUÇÃO DE PESQUISA EM TRABALHO DE BANCOS DE CÉLULAS

Uma família do glicerol transformado DH1-ORT (Cobra Biomanufacturing, CTL 2006#0492P) foi utilizada para inocular 8 x 5 mL de meio estéril LB em 25 mL de estéril universal. As culturas de 5 mL foram incubadas em uma incubadora de agitação a 200 rpm e 37° C por cerca de 16 horas. 2 mL OD de amostras foram mini-preparados para confirmar a presença do plasmídeo. 1 mL OD de uma cultura selecionada foi então utilizada para inocular 25 mL de meio LB. Esta foi cultivada a 37° C com agitação a 200 rpm até atingir uma densidade óptica (600 nm) entre 0,8 a 1,5 unidades OD. As culturas foram criopreservadas utilizando 20% em v/v de glicerol. Esta foi separada e m alíquotas de 1 mL ± 0,2 mL em mais de 20 criorecipientes estéreis e armazenadas abaixo de -70° C.

TESTE DA ESTABILIDADE GENÉTICA

A estabilidade estrutural e segregacional do plasmídeo foi validada por mais de 40 gerações de células. Esta foi realizada pela inoculação do mesmo número de células (0,10 mL OD) em meio de LB fresco (5 mL) e sub-cultivado em intervalos de 24 horas. As culturas foram incubadas em um agitador orbital a 37° C e 200 rpm. Em cada intervalo de 24 horas, a densidade óptica (600 nm) foi medida e utilizada para calcular o tempo de duplicação da célula (ou gerações) decorrido:

$$\text{No de gerações de células} = \frac{\text{Ln (Densidade Óptica final/ Densidade Óptica na inoculação)}}{\text{Ln2}}$$

Isso foi repetido até mais de 40 gerações de células terem sido obtidas. Um número conhecido de células (2 mL OD) em cada estágio de sub-cultura foi peletizado por centrifugação e o pDNA extraído utilizando dois métodos de mini-preparação: o método de mini-preparação desenvolvido por Birnboim e Doly (*Nucleic Acids Res.*, 24 de novembro 1979; 7(6): 1513 – 23) e utilizando o método de mini-preparação QIAprep e o kit (Qiagen®). Um volume igual do pDNA isolado de cada sub-cultura foi, então, colocado sobre 0,8% de gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizados qualitativamente quanto aos sinais de instabilidade segregacional ou estrutural.

Não havia nenhum sinal óbvio de instabilidade segregacional ou estrutural bruta da subcultura em série e a amostragem por 44 gerações.

AVALIAÇÃO DO FERMENTADOR DE 5 LITROS

A linhagem DH1-ORT contendo pORT-RDD foi avaliada na escala de 5 L nos recipientes fermentadores FT Applikon 5/7 L. O meio complexo e o protocolo de fermentação utilizados são aqueles de Varley *et al.*, (*Bioseparation*. 1999; 8 (1-5): 209 – 17), com as modificações seguintes.

O meio descrito por Varley *et al.*, consistiu de concentrações finais de KH₂PO₄ a 3 g/L, Na₂HPO₄ a 6 g/L, NaCl a 0,5 g/L, polipropileno glicol

1W 2025 g a 0,2%, solução de elemento traço a 0,05% [que consiste em $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 2 g/L, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 1,9 g/L, H_3BO_3 a 1,6 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 1,6 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 2 g/L, $\text{ZnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 2 g/L, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ a 1 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 1 g/L, e ácido cítrico a 60 g/L], $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 0,03 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,04 g/L, ácido cítrico a 0,02 g/L, MgSO_4 a 0,5 g/L de solução de vitamina A, 5 mL/L [composto de biotina a 0,6 g/L, ácido fólico a 0,04 g/L, piridoxina-HCl a 1,4 g/L, riboflavina a 0,42 g/L, ácido pantotênico a 5,4 g/L, e niacina a 6,1 g/L], tetraciclina a 12 mg/L, bem como a peptona 2 g/L, extrato de levedura a 20 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 10 g/L e glicerol a 2,8%.

10 No entanto, o glicerol, a fitona peptona, o extrato de levedura e o sulfato de amônio para a fermentação em batelada de alimentação linear foram excluídos do volume do meio e alimentados no recipiente em uma taxa de alimentação constante de 60, 40 e 30 mL/hora. A solução de alimentação é preparada pela mistura de 100 g de extrato de levedura Bacto, 10 g de fitona, 176,5 g de glicerol, 25 g de sulfato de amônio e é adicionando água purificada até 740 mL. A solução de alimentação é ainda filtrada em um filtro de 0,2 μm .

As amostras para a análise foram coletadas durante todo o tempo de fermentação. As amostras foram analisadas para a densidade óptica (600 nm), instabilidade segregacional ou estrutural, e rendimentos específicos de pDNA.

O inóculo foi preparado utilizando 200 μL do Research Working Cell Bank em 200 mL de meio de caldo (peptona fitona a 11,8 g/L, extrato de levedura a 23,6 g/L, KH_2PO_4 a 2,2 g/L, K_2HPO_4 a 9,4 g/L, glicerol a 5,04 g/L) em frascos de agitação Erlenmeyer com reentrâncias de 2 L. Os inóculos foram incubados a 37° C sob agitação a 200 rpm por cerca de 12 horas. 1.200 mL OD foram então utilizados para inocular o recipiente de 5L.

PARÂMETROS FÍSICOS

O oxigênio dissolvido, pH, velocidade de agitação e a temperatura

foram constantemente monitorados durante todo o tempo de fermentação.

COLETA

O recipiente foi resfriado a 10° C utilizando uma camisa fornecida com água corrente. A cultura foi coletada em potes de centrifugação de 1 L e
5 as células peletizadas por centrifugação a 4.500 rpm por 20 min a 4° C em uma centrífuga Sorvall RC 3B Plus. O sobrenadante foi decantado e desinfetado com 2% de Tego 2000™. Os *pellets* celulares foram então congelados a menos de – 70° C.

ANÁLISE

10 A densidade óptica (600 nm) foi medida durante todo o tempo de fermentação de modo a obter a cinética de crescimento.

Uma quantidade conhecida de células (isto é, OD₆₀₀ x mL) (100 mL OD) foram peletizadas em vários intervalos de tempo ao longo do tempo de fermentação. Estas amostras foram armazenadas a – 20° C. O plasmídeo
15 destas células foi isolado utilizando os kits Qiagen-500 Maxi-prep® e o protocolo, (Qiagen®). A concentração do pDNA foi calculada através da medição do OD do DNA de 260 nm. A partir daí, o rendimento específico do plasmídeo da cultura foi calculado dividindo a concentração de pDNA (µg/mL) pelo número de OD mL da amostra. Isso foi realizado para cada fermentação e
20 géis de agarose a 0,8% corados com brometo de etídio foram aplicados em cada amostra para visualizar qualitativamente o pDNA.

A taxa de alimentação de 40 mL/hora, foi eventualmente considerado ótimo para os rendimentos de plasmídeos (cerca de 1 µg/mL OD) durante a fermentação.

25

PURIFICAÇÃO DO PORT-RDD

Todos os sais do tampão e reagentes foram adquiridos pela VWR International (Leicestershire, Reino Unido) e eram de grau analítico (AnalaR), salvo indicação em contrário. Todos os tampões e soluções sanitizantes foram

produzidos utilizando a classificação de água de água purificada e água para injeção (WFI) (Hyclone, Reino Unido). As medidas de densidade óptica foram realizadas utilizando um espectrofotômetro DU800 (Beckman Coulter, Reino Unido). A centrifugação foi realizada utilizando um Sorvall Evolution RC (Kendro, Reino Unido). A eletroforese em gel de agarose foi realizada em um EC CSSU1214 Turn & Cast Gel System (VWR International, Reino Unido) e utilizando o Electrophoresis Power Supply 600 (Amersham Biosciences, Reino Unido). Os componentes da Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen-tip 500, tampões QBT, QC e QF) (Qiagen, Reino Unido) foram utilizados para o processo de titulação de lise.

CLARIFICAÇÃO DA LISE CELULAR E DO LISADO

2 L de tampão de suspensão de células foi adicionado à pasta de células congeladas em uma cuba de aço inoxidável de 10 L (concentração final de 120 g/L, no lote 1 e 150 g/L para o lote 2) e misturados manualmente com uma espátula de aço inoxidável até a suspensão parecer estar livre de agregados. As células foram lisadas através da mistura com 4 L de solução de lise (NaOH a 0,155 M, SDS a 1% a 20 a 22° C) durante 3 minutos para o lote 1 e 10 minutos para o lote 2. 2 L de solução de neutralização (acetato de potássio a 3M com 10 mM de EDTA em pH 5,5) foram adicionados ao lisado sob agitação suave. O precipitado de restos celulares foi então removido utilizando um filtro de bolsas de malha de 500 mm (L1NM500BBSS, Plastok, Reino Unido) e filtros de profundidade nominal de 50 µm, 5 µm e 0,3 µm Hm (KR50A05HH1, KR05A05HH1 e KRK3A05TT1, Millipore, Reino Unido).

CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Uma coluna de cromatografia XK 50/30 foi preenchida com 354 mL de água purificada de lavagem Fractogel EMD TMAE (Merck KGaA, Alemanha) a um volume de leito fixo de 264,6 mL, resultando em uma altura do leito de 13,5 cm para o lote 1. O lote 2 foi preenchido com 370 mL de água

purificada de lavagem Fractogel EMD TMAE (Merck KGaA, Alemanha) para um volume de leito fixo de 254,8 ml, resultando em uma altura do leito de 13,0 cm para o lote 2. O teste do preenchimento foi realizado no meio de preenchimento pela aplicação de 2,5 mL de acetona a 1%, resultando em um valor de

5 Assimetria aceitável de 1,65 e 1,35 para o lote 1 e 2, respectivamente. O meio foi, então, sanitizado com dois volumes da coluna de NaOH a 0,5 M com um tempo de contato superior a 1 hora. O tampão de equilíbrio foi então bombeado através da coluna até o pH do efluente atingir $\leq 8,5$. A coluna foi carregada com

10 6.312,5 mL (lote 1) e 6.393,3 mL (lote 2) de matérias-primas clarificadas, operadas em uma taxa de fluxo linear constante de 100 cm/hora. O tampão de equilíbrio foi re-aplicado para lavar o material solto e contaminando antes do pDNA ser recuperado pela aplicação do tampão de eluição em uma taxa de

fluxo de 100 cm/hora.

CONCENTRAÇÃO DE TROCA PÓS-IÔNICA INTERMEDIADA POR FILTRAÇÃO DE FLUXO

15

TANGENCIAL

O sistema Millipore LabScale TFF foi utilizado e equipado com uma nova membrana Pellicon XL de celulose regenerada (Millipore, Reino Unido) de 50 cm², 30 kDa. O sistema e a membrana foram lavados utilizando água purificada por 10 minutos, depois equilibrados com tampão de eluição de

20 troca iônica (2 x 500 mL, 10 minutos). A solução de pDNA de troca pós-iônica foi vertida dentro do reservatório. A bomba foi ligada e o sistema deixado operar por 10 minutos antes que uma diferença de pressão de 103,42kPa (15 psi) seja aplicada através da membrana. O reservatório foi preenchido continuamente até que todo o material eluído tenha sido adicionado e o volume

25 reduzido a uma concentração nominal final de cerca de 2 mg/mL de PDNA. O concentrado foi então drenado para fora do sistema antes do tampão de lavagem final garantir que a quantidade máxima de pDNA seja recuperada a partir da membrana. O volume do tampão de lavagem foi calculado para atingir

uma concentração de pDNA final de 1 mg/mL; entre a utilização, o sistema e a membrana foram lavados com água purificada. O sistema foi então lavado com água e armazenado em NaOH a 0,1 M.

CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA POR PAREAMENTO IÔNICO

5 Uma coluna de cromatografia VS60 (Millipore, Reino Unido), contendo cerca de 850 mL de meio de Perfluorosorb-S foi utilizada durante este procedimento. A sanitização da coluna e do meio foi realizada ao bombear dois volumes de coluna de NaOH a 0,5 M com um tempo de contato superior a 1 hora. O meio foi então equilibrado (até que o pH tenha atingido $7 \pm 0,2$) antes da utilização. A coluna foi carregada com 69,0 mL (batelada 1) e 200,8 mL de 10 concentrado TFF de troca pós-iônica e operada em uma taxa de fluxo linear constante de 70 cm/hora. Dois volumes de coluna de Tampão de Lavagem 1 e quatro volumes da coluna de Tampão de Lavagem 2 foram, então, introduzidos na coluna para remover a endotoxina residual, o RNA e o material solto, antes 15 do Tampão de Eluição ser utilizado para recuperar o pDNA capturado. O pico eluído foi coletado e analisado utilizando espectrofotometria de UV para determinar a concentração do pDNA recuperado.

CONCENTRAÇÃO/DIAFILTRAÇÃO POR FILTRAÇÃO DE FLUXO TANGENCIAL E FORMULAÇÃO DO PRODUTO

20 O sistema foi preparado como antes. O reservatório foi preenchido continuamente até que toda a solução de pDNA tenha sido adicionada. Uma vez que a solução pDNA tenha sido concentrada na concentração necessária, a diafiltração foi realizada contra a formulação tampão (10 mM de base Tris, 1 mM de EDTA, NaCl a 0,9% p/v em pH 7,5) até 25 que o pH e a condutividade do permeado seja igual ao tampão de diafiltração. O concentrado diafiltrado foi então drenado para fora do sistema antes que 2 x lavagens de tampão assegurassem que a quantidade máxima de pDNA tenha sido recuperada a partir da membrana. As alíquotas de pDNA recuperadas

foram filtradas utilizando o filtro de 0,2 μm e preenchidos em criorecipientes estéreis sob condições assépticas.

O processo de purificação está resumido na Tabela 1.

TABELA 1

5

TABELA RESUMO DA PURIFICAÇÃO

pORT-RDD	
<u>Lise celular</u>	
Pasta celular congelada usada	298,4 g
Rendimento de pDNA teórico	158,08 mg
Tampão de suspensão celular	200 mL
Concentração de RNase A usada	0,1 mg/mL
Concentração de NaOH usada	0,155 M
Volume de solução de lise usada	4.000 mL
Volume de neutralização de solução usada	2.000 mL
Lisado clarificado produzido	5.833,3 mL
<u>Cromatografia de troca aniônica</u>	
Solução de NaCl a 3 M adicionada	583,0 mL
Meio TMAE usado	370 mL
Altura do leito preenchido	13,0 cm
Área de seção transversal	19,6 cm ²
Volume do leito preenchido	254,8 mL
Volume de carga	6.398,3 mL
Condutividade da carga	71,8 a 18,0° C
Concentração de UV (260 nm)	287,3 $\mu\text{g/mL}$
Volume de material eluído	738,4 mL
Etapa de recuperação (lise e IEX)	212 mg (134%)

pORT-RDD	
<u>Concentração por TFF</u>	
Volume de carga	848,5 mL
Volume do concentrado final	200,8 mL
Concentração de UV (260 nm)	385,5 µg/mL
Etapa de recuperação	77,4 mg (36,5 %)
<u>Cromatografia de fase reversa por pareamento iônico</u>	
Volume do leito preenchido por Perfluorosorb-S	850 mL
Área de seção transversal da coluna	28,27 cm ²
Volume da carga	200,8 mL
Volume do material eluído	731,0 mL
Concentração do pDNA eluído	79,4 µg/mL
Etapa de recuperação	58,0 mg (74,9%)
<u>Formulação</u> : 10 mM de Tris-hidroclorato, 1 mM de EDTA, NaCl a 0,9% (p/v), pH 7,5	
Quantidade final de pDNA purificado	84,0 mg
pDNA adicional do lote 1	Cerca de 27,3 mg
Concentração final do pDNA purificado	1.908,0 µg/mL
Etapa de recuperação	97,8 %
Recuperação do processo total	35,9 %

EXEMPLO 2

ESTUDO *IN VIVO* DO PLASMÍDEO PORT-RDD

O objetivo deste estudo foi validar o novo plasmídeo pORT-RDD *in vitro* após a transfecção: avaliação da eficácia de secreção do RDD e atividade anti-proliferativa. O plasmídeo pORT-RDD foi comparado a uma construção de pVAX-RDD anterior utilizado como um controle positivo interno.

PLASMÍDEOS

PLASMÍDEOS PORT

Os vetores pORT-DDD e pORT1aCMV (que foram utilizados como plasmídeo controle vazio) são produzidos na linhagem DH1-ORT do hospedeiro em cultura em meio LB, conforme descrito no Exemplo 1. As células são lisadas e o DNA do plasmídeo é purificado através de cromatografia por troca iônica, concentrado por filtração de fluxo tangencial, submetidos a cromatografia de fase reversa por pareamento iônico e concentrado novamente por filtração de fluxo tangencial. Os plasmídeos são formulados em 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, NaCl a 0,9%, pH 7,5 e mantidos congelados a – 20° C.

PLASMÍDEOS PVAX

Os vetores pVAX foram utilizados como controle. O pVAX1 (Invitrogen, V260 ref-20) é um vetor de plasmídeo de 3,0 kb que permite uma expressão transitória de alto nível da proteína de interesse na maioria das células de mamíferos. O vetor contém os seguintes elementos (mapa na Figura 3): promotor CMV humano, sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e o gene de resistência à canamicina para a seleção da *E. coli*.

O cassete RDD, contendo o gene humano RDD sob o controle do sinal de secreção da uroquinase murina, foi clonado em pVAX1 entre a CMV e a poliA BGH, para gerar o pVAX-RDD.

O pVAX1 e o pVAX-RDD são produzidos pela cultura de bactérias durante a noite em meio do caldo LB 1.500 mL + canamicina 50 µg/mL. Os plasmídeos são purificados com o kit Nucleobond PC200EF (Macherey Nagel) e formulados em 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, NaCl a 0,9%, pH 7,5 e mantidos congelados a – 20° C.

LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTURA

As células de melanoma humano C9 estavam em cultura no meio

Eagles Modified Dulbecco (DMEM + GlutaMAX, Invitrogen Gibco, ref 61965-026) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (Gibco invitrogen, ref 10270-106), a 37° C em uma atmosfera umidificada a 5% de CO₂.

As células de melanoma murino B16F10 (ATCC CRL-6475) foram cultivadas no meio Dulbecco's Modified Eagles + GlutaMAX suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio (Invitrogen Gibco, ref 25080-060).

Os frascos de células congeladas foram produzidos a partir de um único frasco, e mantidos em nitrogênio líquido.

As células foram subcultivadas duas vezes por semana (diluição 1:10 para células C9 e 1:15 para as células B16F10). Para a subcultura, o meio é removido, lavada com PBS, e 2 mL (para um frasco de 75 cm²) de solução de tripsina-EDTA (Invitrogen Gibco, ref 25300-096, lote 3107779) foram adicionados. O frasco é deixado repousar à temperatura ambiente até as células se separarem. Um meio fresco é adicionado, centrifugado a 1.200 rpm por 5 min, aspirado, o meio fresco é adicionado, e as células são dispensadas em novos frascos.

TRANSFEÇÃO E TESTE DE PROLIFERAÇÃO

No dia anterior à transfecção, 60.000 C9 ou 15.000 células B16F10/ cavidade (em 500 µl de meio completo) foram colocadas em placas de 24 cavidades. 1 µg de cada plasmídeo (pVAX1, pVAX-RDD, pORT1aCMV, pORT-RDD) foi transfectado com o reagente de Lipofectamine Plus (Gibco Invitrogen). Seis cavidades/plasmídeos foram preparados e o experimento foi executado duas vezes.

O protocolo de transfecção foi adaptado a partir dos procedimentos fabricante: 1 µg de DNA plasmidial é incubado por 15 minutos em temperatura ambiente em 44 µL de Meio a 0% e 6 µL de reagente Plus. Então, 46 µL de Meio a 0% e 4 µL de Lipofectamina são adicionados e a

mistura é incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. 400 μ L de Meio a 0% e 100 μ L da mistura ADN-Lipo-Plus são misturados. As células são lavadas com PBS e 500 μ L de mistura de transfecção são adicionados por cavidade. Após 4 horas de incubação a 37° C, o meio de transfecção é removido e 750 μ L de meio completo são acrescentados. As células transfectadas foram incubadas a 37° C por 96 horas.

As células são incubadas com 250 μ L de PBS e 25 μ L de MTT (Sigma) a 5 mg/ml. Após 2 horas de incubação a 37° C, 250 μ L de tampão de lise (20% de SDS – 33% de dimetilformamida – 2% de ácido acético – 0,025 N de HCl – 0,05N de NaOH) são adicionados durante a noite. 200 μ L de cada amostra estão distribuídos em placas de 96 cavidades para uma leitura de densidade óptica a 570 nm.

Este experimento foi repetido duas vezes nas mesmas condições.

PRECIPITAÇÃO DO DNA PARA A MODIFICAÇÃO DO TAMPÃO DE RESSUSPENSÃO

15

TABELA 2

MISTURA PARA A PRECIPITAÇÃO DE DNA

	pORT1aCMV (2,2 mg/mL)	pORT-RDD (1,96 mg/mL)
Volume do plasmídeo (μ L)	11,4	12,8
Água (μ L)	188,6	187,2
Acetato de sódio a 3M (μ L)	20	20
Etanol a 100%	500	500

Dois tubos da mistura acima são preparados e incubados durante a noite a – 20° C. A mistura é centrifugada por 30 min a 12.000 rpm, 4° C. O sobrenadante é descartado, o etanol a 70% é adicionado. A solução é centrifugada, o sobrenadante descartado. O *pellet* é seco e depois ressuspenso com 25 μ L de NaCl a 0,9% estéril (um tubo) ou 25 μ L de 10 mM de

Tris – 1mM de EDTA, NaCl a 0,9%, pH 7,5, estéril (denominado TE – NaCl) (o outro tubo).

A concentração de DNA é medida por leitura de densidade óptica, a 260/280 nm.

5 pORT1aCMV – NaCl, pORT1aCMV – TENaCl, pORT-RDD – NaCl, e pORT-RDD – TENaCl DNA foram transfectados acordo com o protocolo de transfecção anterior, com 6 cavidades/plasmídeo. Este experimento foi realizado uma vez.

WESTERN BLOT DO RDD

10 As células de melanoma humano C9 foram colocadas em placas de 24 cavidades (60.000 células/cavidade), e transfectadas com 1 µg de plasmídeo com Reagente de Lipofectamine Plus (Gibco Life Technologies), de acordo com um protocolo projetado para o teste de proliferação. Após 4 horas de transfecção em meio sem soro, os sobrenadantes da transfecção foram
15 substituídos por meio suplementado com soro a 10%.

Os sobrenadantes foram coletados 72 horas após a transfecção. Para os extratos de células, as células foram coletadas por raspagem, e incubadas por 30 min com 50 L de tampão de lise (10 mL de tampão RIPA + 1 mini tablete de antiprotease Complete [ref. 11 836 153, Roche]). Após a
20 centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm, os lisados foram distribuídos em alíquotas e armazenados a – 80° C.

A concentração de proteínas para cada sobrenadante foi determinada pelo teste de Bradford.

25 O Western blot foi realizado através da mistura de 18 µL de sobrenadante ou 30 µg de proteína total em 18 µL de PBS para os extratos com 6 µL de amostra tampão NuPage LDS 4X (NP0007, Invitrogen) e 2,5 µL da amostra do agente redutor NuPage (NP0004, Invitrogen). As amostras são aquecidas por 10 min a 70° C.

As amostras são carregadas em gel NuPage Novex Bis-Tris 12% (NP0341BOX, Invitrogen) de acordo com o protocolo NuPage Novex e a migração em tampão MOPS SBS.

Uma transferência semi-seca é realizada em membrana de nitrocelulose Optitran BA-S 85 0,22 μ (Schleicher & Schuell) com tampão de transferência: 48 mM de Tris - 39 mM de glicina - SDS a 0,037% - metanol a 20%, seguido pelo bloqueio em PBS – 5% de leite (bloqueador de grau blotting de leite em pó desnatado, ref 170-6404, BioRad), durante a noite a 4° C. A membrana é lavada com PBS – Tween 20 a 0,1% e incubada com um anticorpo primário, anti-soro Neosystem, diluído a 1:2000 em PBS – Tween 20 a 0,1% - 2% de leite, 1h30 em temperatura ambiente. Após a lavagem, a membrana é incubada com HRP de burro – IgG de anti-coelho (NA934, Amersham) diluído a 1:5000 em PBS – Tween 20 a 0,1% – 2% de leite, 1h em temperatura ambiente. A membrana é lavada e revelada com ECL (RPN2209, Amersham).

15

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SigmaStat 3.1. O teste t de Student foi utilizado para comparar as percentagens de células sobreviventes após transfecção com o plasmídeo controle ou o plasmídeo RDD. Um valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

20

RESULTADOS

SECREÇÃO RDD DIRECIONADA POR PLASMÍDEO PORT-RDD

A banda foi especificamente detectada no tamanho esperado (10 kDa) em ambos os extratos de células e o sobrenadante das células transfectadas pORT-RDD.

25

No entanto, o peptídeo RDD não foi detectado no sobrenadante de células transfectadas pVAX-RDD.

Portanto, o promotor CMV-intronA dos vetores pORT induziram uma produção e secreção mais forte do peptídeo AMEP do que o promotor de

CMV clássico dos vetores pVAX.

INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE C9 APÓS A TRANSFEÇÃO DE pORT-RDD

A fim de demonstrar a atividade antiproliferativa do peptídeo RDD produzido a partir da pORT-RDD, um teste de proliferação foi criado após a transfeção das células. O novo plasmídeo pORT-RDD também foi comparado a pVAX-RDD, um plasmídeo constitutivo utilizado como um controle positivo. Os resultados deste experimento são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3

COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE C9 DO PLASMÍDEO DE CONTÉM

10

RDD COM O PLASMÍDEO CONTROLE

	% Média das células sobreviventes: plasmídeo RDD/plasmídeo controle	SD	% de inibição/ plasmídeo controle
pVAX1	100,0	12,2	-22,2
pVAX-RDD	122,2	21,5	
pORT1aCMV	100,0	11,0	65,5
pORT-RDD	34,5	6,9	

A transfeção de pORT-RDD inibiu significativamente a proliferação de células de melanoma C9 em 65,5% *versus* a transfeção do plasmídeo controle pORT1aCMV (teste t de Student $p < 0,001$). Esta inibição foi muito reprodutível à medida que o mesmo resultado foi obtido para ambos os experimentos. Mas mesmas condições, a transfeção do plasmídeo pVAX-RDD foi incapaz de inibir a proliferação de C9.

EFEITO DO TAMPÃO DE RESSUSPENSÃO DO DNA

O plasmídeo pORT-RDD é suspenso em 10 mM de Tris – 1 mM de EDTA - 150 mM de NaCl, pH 7,5 (TENaCl). A fim de saber se o EDTA pode interferir na atividade de RDD, a atividade antiproliferativa do plasmídeo pORT-RDD preparado em TENaCl ou em soro fisiológico (NaCl a 0,9%) foi analisada.

20

TABELA 4**TESTE DE PROLIFERAÇÃO DE C9 COM DOIS TAMPÕES DE RESSUSPENSÃO DE DNA**

	Média	SD	% de células sobreviventes/pORT
pORT, TENaCl	0,247	0,019	100
pORT-RDD, TENaCl	0,041	0,006	16,5
pORT, NaCl	0,127	0,022	100
pORT-RDD, NaCl	0,036	0,007	28,3

Uma forte inibição na proliferação de células C9 foi obtida em qualquer dos tampões de ressuspensão. A diferença não alcançou significância estatística ($p = 0,291$, teste t de Student).

Isso indica que nem o Tris EDTA, nem o EDTA interferiram na atividade de AMEP.

INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE B16F10 APÓS A TRANSFECCÃO DE PORT-RDD

A fim de completar a atividade antiproliferativa de pORT-RDD em células de melanoma, células de melanoma murino B16F10 foram transfectadas com os plasmídeos com base em pORT1aCMV e o teste de proliferação MTT foi realizado.

TABELA 5**TESTES DE PROLIFERAÇÃO DO B16F10 (MÉDIA DE DOIS EXPERIMENTOS)**

	% Média de células sobreviventes/pORT1aCMV	SD	% de inibição
pORT1aCMV	100,0	15,8	74,5
pORT-RDD	25,5	8,6	

A transfecção de pORT-RDD inibe significativamente a proliferação celular de B16F10 em 74,5% *versus* a transfecção do plasmídeo do controle pORT1aCMV (teste t de Student $p < 0,001$).

Em conjunto, estes resultados demonstram que o plasmídeo

pORT-RDD era mais potente que o plasmídeo pVAX-RDD clássico para induzir a uma forte produção e secreção do peptídeo AMEP, e inibir a proliferação de células de melanoma (C9 humano e B16F10 murino). Além disso, este efeito antiproliferativo é independente do tampão de ressuspensão utilizado para preparar o DNA. O EDTA contido no tampão TENaCl não interferiu na atividade.

EXEMPLO 3

ESTUDO DA EFICÁCIA ANTITUMORAL DE UMA ÚNICA ELETROTRANSFERÊNCIA

INTRATUMORAL PORT-RDD NOS TUMORES DE MELANOMA B16F10 SUBCUTÂNEOS

O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia de uma única eletrotransferência intratumoral curativa do novo plasmídeo pORT-RDD em tumores B16F10 subcutâneos pré-estabelecido, em relação ao controle do vetor pORT1aCMV vazio. O efeito sobre o crescimento do tumor foi avaliado pelo monitoramento do volume do tumor.

15

MATERIAIS E MÉTODOS

LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTURA

As células de melanoma B16F10 estavam em cultura no Meio Modified Dulbecco Eagles + Glutamax suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio e antibióticos (100 UL/mL de penicilina e estreptomicina 100 mg/ml; Invitrogen Gibco, ref 15140 - 122) a 37° C em uma atmosfera de CO₂ umidificada a 5%. Os frascos de células congeladas foram produzidos a partir de um único frasco, e mantidos em nitrogênio líquido. As células foram subcultivadas duas ou três vezes por semana, dependendo da relação de confluência, tal conforme descrito no Exemplo 2.

25

ANIMAIS

Fêmeas de camundongos de 6 a 8 semanas C57BL/6 foram fornecidas pela Janvier (Le Genest-St-Isle, França). Todos os experimentos em

animais foram realizados de acordo com orientações éticas para a experimentação animal (Diretriz n.º 86/609 CEE) e foram aprovados pelo Comitê de ética da BioAlliance Pharma.

Os animais foram aclimatados por pelo menos 4 dias antes da
5 implantação de células tumorais, na área onde o experimento ocorreu. Os
animais foram mantidos em salas sob condições controladas de temperatura
(21° C) e fotoperíodo (12 h de luz/12 h de escuro) e troca de ar (12 renovações
de ar por hora). A umidade é mantida entre 30 a 70%. Os animais foram
mantidos em condições Específicas Livre de Patógenos, a temperatura
10 ambiente e a umidade foram monitoradas constantemente.

TESTES ESTATÍSTICOS

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o
software SigmaStat 3.1. Para comparar dois grupos, o software executou o
teste t de Student quando os testes de normalidade e de variância iguais
15 passaram com êxito. Se um destes testes falhar, o software executa uma soma
de classificação Mann & Whitney. Para cada análise, o usuário é livre para
aceitar a cada um dos testes estatísticos. Um valor $p < 0,05$ foi considerado
significativo.

PROJETO DO ESTUDO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO

20

INJEÇÃO DE CÉLULAS

As células B16F10 foram mantidas em cultura por até 5
passagens antes da injeção em camundongos. As células foram subcultivadas
48 h antes do dia da injeção.

As células subconfluentes B16F10 foram lavadas com PBS e, em
25 seguida, incubadas com solução de tripsina-EDTA (Invitrogen Gibco, ref 25300-
096) até as células soltarem. O meio fresco foi adicionado, as células foram
centrifugadas a 1.200 rpm por 5 min, e ressuspensas em 25 mL de meio
fresco. As células foram contadas em Trypan Blue a 0,04% para a

quantificação da viabilidade. As células foram centrifugadas e ressuspensas em volume adequado de NaCl a 0,9% (Versol, Laboratoire Caissie, Lyon, França), a fim de ter 10⁶ células B16F10 em 100 µL (mortalidade de células foi maior em tampão de PBS).

5 100 µL de células foram injetadas por via S. C., no flanco direito dos camundongos. Os flancos dos camundongos foram previamente raspados com uma lâmina elétrica um dia antes da injeção de células.

ELETROTRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEO (DIA 0)

Os volumes do tumor foram primeiramente verificados sete dias após a inoculação da célula. Neste momento, alguns tumores já estavam bem estabelecidos e foram, em seguida, utilizados nestes primeiros grupos. A fim de limitar ao máximo a variabilidade do volume do tumor no dia 0, a eletrotransferência foi realizada em um primeiro grupo de 14 camundongos (7 de pORT1aCMV e 7 para pORT-RDD), e dois dias depois, em um segundo grupo de 7 camundongos (3 para pORT1aCMV e 4 para pORT-RDD).

DILUIÇÃO DO PLASMÍDEO

50 µg de plasmídeo foram administrados por tumor em 50 µL de tampão estéril.

As diluições dos plasmídeos foram realizadas conforme segue, em condições estéreis com tampão estéril (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, NaCl a 0,9%, pH 7,5):

- Primeiro grupo: pORT1aCMV: 364 µL de pORT1aCMV a 2,2 µg/µL foram diluídos com 436 µL de TE-NaCl, pORT-RDD: 408 µL de pORT-RDD em 1,96 µg/µL foram diluídos com 392 µL de TE-NaCl.

25 - Segundo grupo: pORT1aCMV: por causa de uma pequena quantidade de plasmídeo controle, a diluição utilizada para o primeiro grupo foi mantida congelada a -20° C, e re-utilizada para as injeções do segundo grupo; pORT-RDD: 204 µL de pORT-RDD a 1,96 µg/µL foram diluídas com 196 µL de

TE-NaCl.

PROJETO DE ESTUDO

Os camundongos fêmeas C57BL/6 que contêm os tumores subcutâneos B16F10 foram atribuídos aos seguintes números de grupo:

5

TABELA 6

GRUPOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS

Grupo	Tratamento	Dose (plasmídeo µg por tumor)	Nº do tratamento	Via	Nº de animais por grupo
1	pORT1aCMV	50	1	IT	7
2	pORT-RDD	50	1	IT	7
3	pORT1aCMV	50	1	IT	3
4	pORT-RDD	50	1	IT	4

Os tumores foram medidos antes da anestesia.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 0,2 mL de uma mistura de cetamina/xilazina contendo: 0,5 mL de xilazina a 2% (Rompun[®], Bayer), 2,0 mL de cetamina 50 mg/mL (Ketalar; Panpharma, Fougères, França), 7,5 mL de NaCl a 0,9%.

ELETROTRANSFERÊNCIA

O tratamento consistiu em uma única injeção intratumoral de 50 µg de plasmídeos em 50 µL de tampão TE-NaCl. Esta dose foi selecionada porque ela corresponde à dose geralmente utilizada no laboratório e nas publicações de eletrotransferência.

O gel condutor foi aplicado sobre o tumor. A injeção foi imediatamente seguida pela aplicação de impulsos elétricos através da utilização de dois eletrodos de placa de aço inoxidável colocados a 5 mm do tumor, com o dispositivo Cliniporator de acordo com o protocolo a seguir:

- HV = 1500 V/cm, 100 µs, 1 Hz, 1 pulso;

- Pausa = 1.000 ms;
- LV = 140 V/cm, 400 ms, 1 pulso.

CONTROLE DO VOLUME DO TUMOR E ESTUDO DO CRESCIMENTO TUMORAL

O tamanho do tumor foi monitorado através da medição de dois
5 diâmetros perpendiculares com um calibrador digital, no dia 0, 2, 5, 7, 9, 12 e
14 de pós-eletrtransferências.

O volume tumoral foi calculado segundo a fórmula: (comprimento
+ largura/2)³ x $\pi/6$.

Os camundongos não foram pesados durante o experimento.

10 Os camundongos mortos foram registrados durante o
experimento.

As curvas de crescimento do tumor foram estabelecidas com
base ou no volume do tumor em mm³, ou na relação V/V0 (isto é, volume no
dia D/volume no dia 0).

15 A inibição do crescimento tumoral foi calculada da seguinte
forma:

% de Inibição = 100 x [1 - (volume tumoral no grupo tratado/
volume tumoral no grupo controle)].

RESULTADOS

20 MORTALIDADE

As mortes naturais foram observadas durante o experimento (no
dia 7: pORT1aCMV, Gaiola-1, pORT-RDD, gaiola-2; e pORT-RDD, gaiola-3).
Esta mortalidade não estava especialmente ligada ao tratamento. As mortes
naturais são frequentemente observadas no modelo B16F10.

25 CONTROLE DO VOLUME DO TUMOR

VOLUMES DO TUMOR PARA TODOS OS TUMORES

Os resultados estão resumidos na Tabela 7 e são mostrados na
Figura 4.

TABELA 7**CONTROLE DO VOLUME DO TUMOR PARA TODOS OS TUMORES EM MM³**

Dias		0	2	5	7	9	12	14
pORT1aCMV	Média	59,26	87,93	178,02	279,02	338,89	640,13	864,31
	SD	14,13	31,56	103,36	201,88	216,33	454,42	571,78
pORT-RDD	Média	56,03	80,99	104,11	130,28	221,48	409,07	642,71
	SD	18,65	16,52	40,91	29,97	76,86	132,96	182,96
% de inibição			7,9	41,5	53,3	34,6	36,1	25,6
SigmaStat Student p=		0,662	0,529	0,041	0,026	0,144	0,163	0,285

No dia do tratamento, os tumores tratados com pORT1aCMV variaram de 40,19 mm³ a 84,76 mm³ (volume médio de 59,26 ± 14,13 mm³), e os tumores tratados com pORT-RDD variaram de 33,51 mm³ a 89,51 mm³ (volume médio de 56,03 ± 18,65 mm³).

No dia 7, o volume do tumor atingiu 279,02 ± 201,88 mm³ no grupo controle pORT1aCMV, e 130,28 ± 29,97 mm³ no grupo tratado com pORT-RDD. Uma inibição de 53% foi, portanto, observada (teste t de Student p = 0,026).

No dia 14, os volumes do tumor atingiram 864,31 ± 571,78 mm³ no grupo controle pORT1aCMV, e 642,71 ± 182,96 mm³ no grupo tratado com pORT-RDD, correspondendo a 26% da inibição do crescimento tumoral (não significativos, teste t de Student p = 0,285).

Em estudos anteriores, de acordo com o mesmo protocolo, com os tumores < 100 mm³ no dia 0, o pVAX-RDD e dos plasmídeos pBi-RDD foram capazes de inibir o crescimento do tumor B16F10 em 20% e 29%, respectivamente, 14 dias após a eletrotransferência, mas sem nenhuma significância estatística. Sete dias após a eletrotransferência, a inibição foi inferior a 19%.

VOLUMES DO TUMOR APENAS PARA OS TUMORES PEQUENOS

A análise dos resultados também foi realizada após a seleção de pequenos tumores no dia do tratamento. Os resultados estão resumidos na Tabela 8 e na Figura 6.

5

TABELA 8

CONTROLE DO VOLUME DO TUMOR, EXPRESSA EM MM³, PARA OS TUMORES COM UM

VOLUME DE ≤ 50 MM³

Dia		0	2	5	7	9	12	14
pORT1aCMV	Média	50,19	69,05	144,07	219,74	308,59	698,47	971,85
	SD	7,63	25,22	89,06	174,49	212,44	527,21	648,95
pORT-RDD	Média	48,05	75,61	81,00	121,42	199,61	363,18	590,63
	SD	11,49	11,02	20,76	29,81	51,59	107,45	155,21
% de inibição				43,8	44,7	35,3	48,0	39,2
SigmaStat Student p=		0,705	0,545	0,095	0,168	0,213	0,126	0,158

Os tumores tratados pORT1aCMV variaram de 40,19 mm³ para 59,73 mm³ (volume médio de 50,19 ± 7,63 mm³), os tumores tratados com pORT-RDD variaram de 33,51 mm³ para 65,45 mm³ (volume médio de 48,05 ± 11,49 mm³).

No dia 7, o volume do tumor atingiu 219,74 ± 174,49 mm³ no grupo controle pORT1aCMV, e 121,42 ± 29,81 mm³ no grupo tratado com pORT-RDD.

No dia 14, o volume do tumor atingiu 971,85 ± 648,95 mm³ no grupo controle pORT1aCMV, e 590,63 ± 155,21 mm³ no grupo tratado com pORT-RDD.

A eletrotransferência intratumoral de pORT-RDD inibiu o crescimento de tumores melanoma B16F10 em 45% no dia 7 e 39% em 14 dias após eletrotransferência. Mas essa diferença não alcançou significância

20

estatística.

RAZÃO DE V/V0 APENAS PARA TUMORES PEQUENOS

A fim de reduzir o impacto da variabilidade do volume do tumor no dia 0, os resultados foram expressos em razão V/V0 (volume no dia D/volume no dia 0).

Os resultados são apresentados na Tabela 9 e Figura 7.

TABELA 9

RELAÇÃO V/V0 PARA TUMORES COM UM VOLUME DE 50 mm³

Dias		0	2	5	7	9	12	14
pORT1aCMV	Média	1,00	1,40	3,06	4,69	7,03	15,32	20,95
	SD	0,00	0,57	1,73	3,08	3,35	8,86	11,87
pORT-RDD	Média	1,00	1,62	1,78	2,55	4,19	7,66	12,54
	SD	0,00	0,26	0,70	0,39	0,69	1,79	3,01
% de inibição				42,0	45,6	40,3	50,0	40,1
SigmaStat Student p=				0,098	0,094	0,05	0,046	0,096

No dia 7, a razão do volume do tumor atingiu $4,69 \pm 3,08 \text{ mm}^3$ no grupo controle pORT1aCMV, e $2,55 \pm 0,39 \text{ mm}^3$ no grupo tratado com pORT-RDD.

No dia 14, os volumes do tumor atingiram $20,95 \pm 11,87 \text{ mm}^3$ no grupo controle pORT1aCMV; e $12,54 \pm 3,01 \text{ mm}^3$ no grupo tratado com pORT-RDD.

Conforme detalhado nos dados brutos (Tabela 9), pelo menos 40% da inibição do crescimento do tumor foi mantida do dia 5 ao dia 14, com um máximo de 50% no dia 12. A significância estatística foi obtida nos dias 9 e 12.

Em conjunto, estes resultados indicam que o plasmídeo pORT-RDD parece ser mais potente que os plasmídeos anteriores, especialmente sete dias após a transferência. Este efeito inibitório foi mais importante se os tumores são pequenos ($33,51 \text{ mm}^3$ a $65,45 \text{ mm}^3$) no dia do tratamento.

A eletrotransferência intratumoral de pORT-RDD inibiu o crescimento dos tumores B16F10 em 45% no dia 7, e 39% no dia 14, após a eletrotransferência. Mas essa diferença não alcançou significância estatística. Este último ponto pode ser explicado pelo número reduzido de camundongos por grupo (pORT1aCMV n = 6, e pORT-RDD n = 7). Além disso, o desvio padrão reduzido observado para o grupo tratado com pORT-RDD era susceptível de ser correlacionado com o efeito antitumoral do fator RDD.

De fato, é amplamente conhecido que os fatores antiangiogênicos antitumorais são mais potentes em tumores pequenos. Deste modo, para novas experiências, o volume de tumor deve ser verificado antes de 7 sete dias após a inoculação, a fim de tratar os tumores pequenos e calibrados.

Além disso, a alta mortalidade da célula foi observada após a preparação das células B16F10 em soro fisiológico. A fim de limitar a mortalidade desta célula, outros tampões de ressuspensão podem ser avaliados, tal como o meio livre de soro.

No entanto, a partir desta primeira experiência, pode concluir-se que a eletrotransferência intratumoral do plasmídeo pORT-RDD inibe o crescimento do tumor dos tumores de melanoma B16F10 pré-estabelecidos para camundongos C57BL/6, com uma melhor eficácia do que com os vetores com base em pBi e pVAX.

EXEMPLO 4

DOSE VARIANDO A AVALIAÇÃO SEGUINTE A UMA ÚNICA ELETROTRANSFERÊNCIA

INTRATUMORAL DE PORT-RDD EM TUMORES B16F10 SUBCUTÂNEOS

O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia antitumoral de doses crescentes de plasmídeo pORT-RDD na sequência de uma única eletrotransferência intratumoral, comparado ao veículo de eletroporação, em tumores de melanoma B16F10 subcutâneos pré-estabelecidos. Para este propósito, o volume do tumor estava compreendido entre 30 e 50 mm³, e seis

grupos foram tratados: (1) veículo (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, NaCl a 0,9%, pH 7,5 de tampão estéril, (2) 25 µg, (3) 50 µg, (4) 100 µg, (5) 200 µg, e (6) 400 µg de plasmídeo pORT-RDD terapêutico. Os volumes do tumor foram monitorados, pelo menos, 14 dias após o tratamento de eletroporação.

5

ESTUDO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO

INJEÇÃO CELULAR

As células B16F10 foram mantidas em cultura até 6 passagens antes da injeção em camundongos. As células foram subcultivadas 48 h antes do dia da injeção.

10

As células subconfluentes B16F10 foram lavadas com PBS e, em seguida, incubadas com solução de tripsina-EDTA (Invitrogen Gibco, ref 25300-096) até as células soltarem. O meio fresco foi adicionado, as células foram centrifugadas a 1.200 rpm por 5 min, e ressuspensas em 25 mL de meio fresco. As células foram contadas em Trypan Blue a 0,04% para a

15

quantificação da viabilidade. As células foram centrifugadas e ressuspensas em volume adequado de NaCl a 0,9% (Versol, Laboratoire Caissie, Lyon, França), a fim de possuir 10^6 células B16F10 em 100 µL.

20

100 µL de células foram injetadas por via SC, no flanco direito de camundongos. Os flancos dos camundongos foram previamente raspados com uma lâmina elétrica um dia antes da injeção de células.

ELETROTRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEO

Seis dias após a inoculação de células, os camundongos foram divididos aleatoriamente em grupos pORT1aCMV, pVAX ou pORT-RDD. As doses crescentes de plasmídeo foram injetadas em 50 µL: 25 – 50 – 100 – 200 – 400 µg, levando à preparação do plasmídeo em concentrações crescentes:

25

0,5 – 1 – 2 – 4 – 8 mg/mL.

PROJETO DE ESTUDO

Os camundongos C57BL/6 foram selecionados para o tratamento,

quando os tumores atingiram 30 – 50 mm³. O tratamento foi então realizado em 3 dias diferentes, os camundongos prontos foram incluídos de forma aleatória em cada grupo de tratamento:

TABELA 10

GRUPOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS

Grupo	Tratamento (concentração de DNA)	Dose (µg de plasmídeo por tumor em 50 µL)	Nº do tratamento	Nº de animais por grupo
1	Veículo	Nenhuma	1	9
2	pORT-RDD (0,5 µg/µL)	25	1	9
3	pORT-RDD (1,0 µg/µL)	50	1	9
4	pORT-RDD (2,0 µg/µL)	100	1	10
5	pORT-RDD (4,0 µg/µL)	200	1	9
6	pORT-RDD (8,0 µg/µL)	400	1	9

Os tumores foram medidos antes da anestesia.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 0,2 mL de uma mistura de cetamina/xilazina contendo: 0,5 mL de xilazina a 2% (Rompun[®], Bayer), 2,0 mL de cetamina 50 mg/mL (Ketalar; Panpharma, Fougères, França), 7,5 mL de NaCl a 0,9%.

ELETROTRANSFERÊNCIA

O tratamento consistiu em uma injeção intratumoral de doses crescentes de plasmídeo em 50 µL de tampão TE- NaCl. Um gel condutor foi aplicado sobre o tumor. A injeção foi imediatamente seguida pela aplicação de impulsos elétricos através da utilização de duas placas de eletrodos de aço inoxidável colocadas a 5 mm no tumor, com o dispositivo Cliniporator de acordo com o protocolo (utilizado anteriormente com o experimento intratumoral pVAX-RDD):

- HV = 1500 V/cm, 100 µs, 1 Hz, 1 pulso,

- Pausa = 1.000 ms,
- LV = 140 V/cm, 400 ms, 1 pulso.

CONTROLE DE ANIMAIS E SACRIFÍCIO

CONTROLE DO VOLUME DO TUMOR

5 Após o tratamento de eletroporação, os volumes dos tumores foram monitorados através da medição de dois diâmetros perpendiculares (diâmetros mais compridos e mais volumosos) com um calibrador digital, nos dias 0, 2, 5, 7, 9, 12, 14 após o tratamento.

O volume tumoral foi calculado segundo a fórmula: (comprimento
10 + largura/2)³ x $\pi/6$.

As curvas de crescimento do tumor foram estabelecidas com base no volume do tumor em mm³.

A inibição do crescimento do tumor foi calculada da seguinte forma:

15 % de Inibição = 100 x [1 - (volume tumoral no grupo tratado/ volume tumoral no grupo controle)].

CONTROLE DO PESO CORPORAL

O peso corporal dos animais foi registrado no dia anterior ao da injeção de células e depois nos mesmos dias do controle do volume do tumor.

CONTROLE DA MORTE NATURAL

20 As mortes naturais durante o experimento foram registradas. Durante o curso do experimento, os animais que apresentam sinais de sofrimento (caquexia, enfraquecimento, e dificuldade para se mover) e possuir uma perda superior a 20% do seu peso corporal inicial, foram sacrificados por inalação de CO₂. Os camundongos foram sacrificados no final do experimento
25 (no dia 14) por inalação de CO₂.

TESTES ESTATÍSTICOS

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o

software SigmaStat 3.1. O software realizou o teste t de Student para comparar dois grupos, e o teste ANOVA para comparar todos os grupos. Um valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

5

MORTALIDADE

As mortes naturais foram observadas durante o experimento, e os animais que apresentaram sinais de sofrimento foram sacrificados. No dia 14, a sobrevivência foi de 22,2% no grupo tampão (7 mortes/sacrifícios de 9), 55,6% no grupo de 25 µg (4 mortes/sacrifícios de 9), 66,7% no grupo de 50 µg (3 10 mortes/sacrifícios de 9), 90% no grupo 100 µg (1 morte/sacrifício de 10), 77,8% no grupo de 200 µg (2 mortes/sacrifícios de 9), 77,8% no grupo de 400 µg (2 mortes por sacrifícios de 9).

Esta mortalidade foi ligada ao desenvolvimento do tumor. Nenhum dos tumores tratados e tratados com baixas doses apresentou a maior 15 mortalidade.

MUDANÇA NO PESO CORPORAL

Não houve diferença significativa no peso corporal entre os grupos. A pequena diminuição no grupo tampão no dia 12 poderia ser explicada por uma perda de peso de um camundongo que foi depois 20 sacrificado.

COMPARAÇÃO DO CONTROLE DE VOLUME DO TUMOR

Dois operadores mediram os dois diâmetros perpendiculares de cada tumor, em cada dia da monitoração. Foram observadas diferenças muito pequenas entre os volumes tumorais medidos por cada operador.

25

EFEITO DO TRATAMENTO SOBRE OS VOLUMES DE TUMOR

As medições dos volumes do tumor de um operador foram utilizadas para análise. Os resultados são mostrados na Figura 8.

Uma inibição dose-dependente do crescimento dos tumores

o pORT-RDD tratados foi observada em comparação aos tumores controle. A inibição máxima foi no dia 7, em especial, para a dose de 200 µg com 80,3%:

TABELA 11

INIBIÇÃO DOSE-DEPENDENTE DO CRESCIMENTO DOS TUMORES TRATADOS pORT-

5

RDD

	Doses	Dia 2	Dia 5	Dia 7	Dia 9	Dia 12	Dia 14
% de inibição	25 µg	11,8	41,7	47,4	36,3	21,7	
	50 µg	27,1	57,3	60,3	48,7	17,8	
	100 µg	24,6	68,1	71,7	67,8	48,8	24,4
	200 µg	22,5	69,3	80,3	76,0	53,8	41,9
	400 µg	24,8	69,1	73,0	66,3	42,0	3,6

Após 7 dias, todos os tumores cresceram novamente, em especial, o controle, tumores tratados com 25 e 50 µg. A curva de crescimento do tumor controle diminuiu no dia 14 por causa de um número muito pequeno de camundongos: uma elevada taxa de mortalidade foi observada em 12 dias.

10

A análise estatística (análise de variância univariada) mostrou que a inibição para os grupos tratados pORT-RDD foi altamente significativa nos dias 5, 7 e 9 ($p < 0,001$).

15

A comparação dois-e-dois pelo teste t de Student mostrou que não houve significância estatística entre os grupos 100, 200 e 400 µg. No dia 12, a significância estatística foi obtida após uma análise de variância univariada, por causa do re-crescimento dos tumores. Mas, a análise do teste t de Student revelou que foi obtida significância estatística para a comparação de doses de 50 e 200 µg.

20

No protocolo inicial, realizado por estudos anteriores, uma única dose de 50 µg de plasmídeo pORT-RDD foi administrada. Isto levou a no máximo 50% de inibição do crescimento do tumor. Foi decidido avaliar o efeito

antitumoral de doses crescentes do plasmídeo. Tomados em conjunto, a eletrotransferência intratumoral do plasmídeo pORT-RDD inibe significativamente o crescimento de tumores de melanoma B16F10 pré-estabelecidos em camundongos C57BL/6, em uma maneira dose-dependente.

5 A dose de 200 µg parecia ser a dose mais eficaz para tratar um tumor de 50 mm³, enquanto foi obtido a maior inibição e a melhor de significância *versus* tampão, nos grupos 25 e 50 µg. Esta dose corresponde a 4 µg por mm³ de tumor.

 Além disso, o tratamento não induziu quaisquer efeitos tóxicos, mesmo na maior dose (400 µg), a medida que a mortalidade e o peso corporal não foram afetados.

EXEMPLO 5

AVALIAÇÃO DAS ELETROTRANSFERÊNCIAS INTRATUMORAIS REPETIDAS DE PLASMÍDEO PORT-RDD EM TUMORES B16F10 SUBCUTÂNEOS

15 O experimento de variação da dose descrito no Exemplo 4 mostrou que uma única eletrotransferência intratumoral de 200 µg de plasmídeo pORT-RDD foi a dose mais eficiente em comparação com as doses de 25, 50, 100 e 400 µg, com cerca de 80% de inibição do crescimento dos tumores de melanoma B16F10 subcutâneos no dia 7 pós-eletrotransferência ($p < 0,001$). Após este tempo, os tumores cresceram novamente.

 Esses resultados levaram a avaliar o benefício da repetição do tratamento sobre o crescimento tumoral. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a eficácia antitumoral de um tratamento repetido nos dias 0 e 7. O tratamento consiste na eletrotransferência intratumoral de 200 µg de plasmídeo pORT-RDD, nos dias 0 e 7, em tumores de melanoma B16F10 subcutâneos pré-estabelecidos de volumes compreendidos entre 30 e 50 mm³ no primeiro tratamento. Três grupos de camundongos foram definidos: (1) veículos (10 mM

de Tris, 1 mM de EDTA, NaCl a 0,9%, pH 7,5 de tampão estéril), (2) injeção única de pORT-RDD, (3) injeções repetidas de pORT-RDD.

PROJETO DO ESTUDO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO

INJEÇÃO DE CÉLULAS

5 As células B16F10 foram mantidas em cultura por até 5 passagens antes da injeção em camundongos. As células foram subcultivadas 48 h antes do dia da injeção.

O dia da inoculação das células, as células B16F10 subconfluentes foram lavadas com PBS e, em seguida, incubadas com
10 solução de tripsina-EDTA (Invitrogen Gibco, ref 25300-096) até as células soltarem. O meio fresco foi adicionado, as células foram centrifugadas a 1.200 rpm por 5 min, e ressuspensas em 25 mL de meio fresco. As células foram colocadas em contato com Trypan Blue a 0,04% para a quantificação da viabilidade. As células foram centrifugadas e ressuspensas em
15 volume adequado de NaCl a 0,9% (Versol, Laboratoire Caissie, Lyon, França), a fim de obter 10^6 células B16F10 em 100 μ L.

100 μ L de células foram injetadas por via SC, no flanco direito de camundongos. Os flancos de camundongos foram previamente raspados com uma lâmina elétrica um dia antes da injeção de células.

20

PREPARAÇÃO DO PLASMÍDEO

200 μ g de plasmídeos foram injetados em 50 μ L, levando à preparação do plasmídeo em 0,4 μ g/ μ L pela precipitação do etanol do plasmídeo pORT-RDD e a ressuspensão em 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, NaCl a 0,9%, pH 7,5 de tampão estéril.

25

PROJETO DO ESTUDO

O estudo envolveu 50 camundongos C57BL/6 fêmeas contendo um tumor de 30 a 50 mm³ no seu flanco direito. A atribuição do tratamento foi decidida de forma aleatória e é a seguinte:

TABELA 12**GRUPOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS**

Grupo	Tratamentos		Dose por injeção (μg em 50 μL)	N° do tratamento	N° de animais por grupo
	Dia 0	Dia 7			
1	Veículo	Nenhum*	Nenhum	1	20
3	pORT-RDD	Veículo	200	2	10
4	pORT-RDD	pORT-RDD	200	2	20

* O segundo tratamento não é realizado por grupos controle por causa do tamanho muito grande dos tumores. No dia 7, já não é possível inserir o tumor entre os eletrodos de placa.

PROTOCOLO DE ELETROTRANSFERÊNCIA

Os animais são anestesiados por injeção intraperitoneal de 0,2 mL de cetamina/xilazina mistura contendo: 0,5 mL de xilazina a 2% (Rompun[®], Bayer), 2,0 mL de cetamina a 50 mg/mL (Ketalar; Panpharma, Fougères, França), e 7,5 mL de NaCl a 0,9%.

Os tratamentos nos dias 0 e 7 consistiram de injeções intratumorais de 200 μg de plasmídeos em 50 μL de tampão TE- NaCl. Um gel condutor foi aplicado sobre o tumor. A injeção foi imediatamente seguida pela aplicação de impulsos elétricos através da utilização de dois eletrodos de placa de aço inoxidável colocados a 5 mm do tumor, com o dispositivo Cliniporator de acordo com o protocolo:

- HV = 1.500 V/cm, 100 μs , 1 Hz, 1 pulso,
- Pausa = 1.000 ms,
- LV = 140 V/cm, 400 ms, 1 pulso.

O dia 0 corresponde ao primeiro dia de tratamento por eletrotransferência.

CONTROLE DE ANIMAIS E SACRIFÍCIO

O tamanho do tumor foi monitorado através da medida de dois diâmetros perpendiculares com um calibrador digital.

O volume tumoral foi calculado segundo a fórmula: (comprimento + largura/2)³ x $\pi/6$.

A inibição do crescimento do tumor foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 \times [1 - (\text{volume tumoral no grupo tratado} / \text{volume tumoral no grupo controle})].$$

10

RESULTADOS

Primeiro, foi demonstrado que duas eletrotransferências intratumorais com o plasmídeo pORT-RDD estavam seguras e bem toleradas pelos animais, a medida que não houve efeito sobre o peso do camundongo e a mortalidade.

15

Mais importante ainda, as eletrotransferências intratumorais repetidas induziram, no dia 12, 97% de inibição do crescimento do tumor em relação ao grupo veículo (denominado TE), e 76,7% de inibição em relação a um único grupo pORT-RDD (denominado pORT-RDD 1X), conforme mostrado na Figura 9 e na Tabela 13.

20

TABELA 13

PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO TUMOR

Dias	2	5	7	9	12	14	17	21
pORT-RDD 1X <i>versus</i> o veículo	48,3%	81,7%	87,5%	89,9%	87,9%			
pORT-RDD 2X <i>versus</i> o veículo	51,2%	81,7%	89,9%	94,6%	97,2%			
pORT-RDD 2X <i>versus</i> pORT-RDD 1X				46,4%	76,7%	83,7%	85,3%	82,0%

Além disso, a regressão completa do tumor começou a aparecer no dia 9 para atingir 40% das regressões completas no dia 21(Tabela 14). Estas regressões foram mantidas até 80 dias após o primeiro tratamento.

TABELA 14

5

PORCENTAGEM DE REGRESSÕES DO TUMOR COMPLETAS

Dias	9	12	14	17	21
Regressões do tumor completas	5%	10%	10%	20%	40%

Tomados em conjunto, o melhor protocolo de tratamento poderia ser definido como duas eletrotransferências intratumorais sucessivas nos dias 0 e 7, com uma dose ótima de pORT-RDD de 200 µg (para tumores de 50 mm³).

EXEMPLO 6

10

ESTUDO DA EFICÁCIA ANTITUMORAL E ANTIANGIOGÊNICA DE UMA ÚNICA ELETROTRANSFERÊNCIA INTRATUMORAL PORT-RDD EM TUMORES DE MELANOMA B16F10 SUBCUTÂNEOS

15

O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia de uma única eletrotransferência intratumoral curativa do plasmídeo pORT-RDD em tumores B16F10 subcutâneos pré-estabelecido, em relação ao veículo. O efeito sobre o crescimento do tumor foi avaliado pelo volume do tumor e monitoramento do vaso sanguíneo do tumor por sonografia de ultra-som Doppler.

MATERIAIS E MÉTODOS

LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DA CULTURA

20

As células de melanoma B16F10 foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle + GlutaMAX suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio e antibióticos (100 UI/mL de penicilina e estreptomicina a 100 µg/mL; Invitrogen Gibco, ref 15140 - - 122) a 37° C em uma atmosfera de CO₂ umidificada a 5%.

25

ANIMAIS

Fêmeas de camundongos de 6 a 8 semanas, C57BL/6 foram

fornecidas pela Janvier (Le Genest-St-Isle, França). Todos os experimentos em animais foram realizados de acordo com orientações éticas para a experimentação animal (Diretriz nº 86/609 CEE) e foram aprovados pelo Comitê de ética da BioAlliance Pharma.

5 Os animais foram aclimatados por pelo menos 4 dias antes do implante das células tumorais, na área onde o experimento ocorreu. Os animais foram mantidos em salas sob condições controladas de temperatura (21° C), fotoperíodo (12 h luz/12 h escuro) e troca de ar (12 renovações de ar por hora). A umidade é mantida entre 30 a 70%.

10

TESTES ESTATÍSTICOS

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SigmaStat 3.1. Para comparar dois grupos, o software executou o teste t de Student, quando os testes na normalidade e de variância iguais passaram com êxito. Se um destes testes falhar, o software executa um teste de soma de classificação Mann & Whitney. Para cada análise, o usuário está livre para aceitar a cada um dos testes estatísticos. Um valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

PROJETO DO ESTUDO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO

INJEÇÃO DE CÉLULAS

20

As células B16F10 foram subcultivadas 48 h antes do dia da injeção.

25

As células subconfluentes B16F10 foram lavadas com PBS e, em seguida, incubadas com solução de tripsina-EDTA (Invitrogen Gibco, ref 25300-096) até as células soltarem. O meio fresco foi adicionado, as células foram centrifugadas a 1.200 rpm por 5 min, e ressuspensas em 25 mL de meio fresco. As células foram contadas em Trypan Blue a 0,04% para a quantificação da viabilidade. As células foram centrifugadas e ressuspensas no volume adequado de NaCl a 0,9% (Versol, Laboratoire Caissie, Lyon, França),

a fim de obter 10^6 células B16F10 em 100 μ L.

100 μ L de células foram injetadas por via SC, no flanco direito de camundongos. Os flancos dos camundongos foram previamente raspados com uma lâmina elétrica um dia antes da injeção de células.

5

PREPARAÇÃO DO PLASMÍDEO

200 μ g de plasmídeo foram injetados em 50 μ L, levando à preparação do plasmídeo em 4,0 μ g/ μ L pela precipitação do etanol do plasmídeo pORT-RDD e a ressuspensão em 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, NaCl a 0,9%, pH 7,5 de tampão estéril.

10

PROJETO DE ESTUDO

Os camundongos fêmeas C57BL/6 que contêm tumores subcutâneos B16F10 foram atribuídos aos seguintes números de grupo:

TABELA 15

GRUPOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS

Grupo	Tratamento	Dose (μ g de plasmídeo por tumor)	Nº do tratamento	Via	Nº de animais por grupo
1	Veículo		1	IT	5
2	pORT-RDD	50	1	IT	5

15

ELETROTRANSFERÊNCIA DO PLASMÍDEO (DIA 0)

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 0,2 mL de uma mistura de cetamina/xilazina contendo: 0,5 mL de xilazina a 2% (Rompun[®], Bayer), 2,0 mL de cetamina 50 mg/mL (Ketalar; Panpharma, Fougères, França), 7,5 mL de NaCl a 0,9%.

20

O tratamento consistiu de uma única injeção intratumoral de 200 μ g de plasmídeos em 50 μ L de tampão TE-NaCl.

O gel condutor foi aplicado sobre o tumor. A injeção foi imediatamente seguida pela aplicação de impulsos elétricos através da utilização de duas placas de eletrodos de aço inoxidável colocados a 5 mm do

tumor, com o dispositivo Cliniporator[®] de acordo com o protocolo a seguir:

- HV = 1500 V/cm, 100 μ s, 1 Hz, 1 pulso,
- Pausa = 1.000 ms,
- LV = 140 V/cm, 400 ms, 1 pulso.

5 CONTROLE DO VOLUME DO TUMOR E ESTUDO DO CRESCIMENTO TUMORAL

Todo o monitoramento foi realizado utilizando um aparelho de ultra-som Aplio (Toshiba), equipado com duas sondas linear: sonda de 14 MHz para o modo B e exame Power Doppler (melhor sensibilidade e resolução), e sonda de 9 MHz para o exame de perfusão com o agente de contraste no modo VRI (Imagem do Reconhecimento Vascular).

Os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de uma mistura de cetamina/xilazina no dia 0, e por inalação de isoflurano nos dias 1, 2, 3, 4 e 7.

CONTROLE DO VOLUME DO TUMOR

Os volumes do tumor foram determinados através da medida da largura, comprimento e profundidade do tumor no modo B. O modo sonográfico B permite representar a morfologia dos órgãos e a textura de acordo com uma escala de cinza. Em tais imagens do modo B, as dimensões do tumor podem ser medidas e a necrose pode ser qualitativamente considerada pela extensão das áreas hipoecogênicas.

As medidas sonográficas consistiam em encontrar as seções do tumor transversais e longitudinais máximas sobre a digitalização utilizando a sonda linear de 14 MHz. As seções transversais e longitudinais foram definidas com relação ao corpo do camundongo. O comprimento foi medido na seção longitudinal, e a largura e profundidade na seção transversal. Essas medições foram realizadas diretamente sobre a sonografia utilizando calibradores. As varreduras transversais e longitudinais máximas foram registradas e impressas.

Os volumes dos tumores foram calculados segundo a fórmula:

Volume em mm³ = (comprimento x largura x profundidade)/2.

NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS DO TUMOR

Cada tumor foi escaneado na seção transversal e longitudinal no modo Doppler Power, com a sonda de 14 MHz, a fim de contar o número de vasos no volume do tumor. O modo Power Doppler representa, em uma escala de cores e em superposição com a imagem modo B, o poder do ultra-som retroespalhados pelos eritrócitos circulantes na luz dos vasos. A seqüência de vídeo, correspondente à varredura do tumor pelos deslocamentos da sonda sucessivos, foi gravada permitindo uma quantificação em 3D do volume do tumor total. Essas seqüências foram pós-revistas pelo operador, a fim de determinar o número de vasos intratumorais. Os coágulos de cor do pixel foram considerados como marcadores de um vaso intratumoral quando esses pixels foram encontrados repetidamente nas seções sucessivas do tumor mostrando um acompanhamento contínuo do fluxo sanguíneo. O número médio de vasos foi então calculado como a média de vasos contados em seção transversal e na seção longitudinal.

RESULTADOS

CONTROLE DO VOLUME DO TUMOR

O volume tumoral foi significativamente inibido por 77,5% no dia 4 e 89,2% no dia 7 pelo tratamento com pORT-RDD em relação ao grupo veículo (teste t de Student $p < 0,001$ e $p = 0,006$, respectivamente) (Figura 10).

CONTROLE DO VASO SANGUÍNEO

O número de vasos sanguíneos do tumor foi significativamente inibido por 70,1% no dia 4 e 78,1% no dia 7 pelo tratamento com pORT-RDD em relação ao grupo veículo (teste t de Student $p < 0,001$ e $p = 0,001$, respectivamente) (figura 11).

Em conjunto, estes resultados indicam que a eletrotransferência intratumoral pORT-RDD inibiu significativamente o número de vasos

sanguíneos do tumor em até 78%, em relação à inibição do crescimento do tumor. Estes resultados confirmam a dupla atividade do fragmento de desintegrina em ambas as células endoteliais e de melanoma.

EXEMPLO 7

5 DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DE POTÊNCIA *IN VITRO* PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS LOTES DE PLASMÍDEO PORT-RDD: TESTE DE PROLIFERAÇÃO APÓS A TRANSFEÇÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA

O objetivo deste estudo foi desenvolver um ensaio de potência *in vitro* com base na transfecção de células de melanoma utilizando doses crescentes do plasmídeo pORT-RDD (também denominado BA015-VCC-004) e um protocolo Lipofectamine Plus[®]. Os testes são revelados 96 horas após a transfecção com o reagente MTT para determinar a porcentagem de células sobreviventes.

MATERIAIS E MÉTODOS

15 PLASMÍDEO PORT-RDD

O plasmídeo pORT-RDD é produzido na linhagem do hospedeiro DH1-ORT em cultura em meio LB, e purificado conforme descrito anteriormente. O plasmídeo é formulado em 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, NaCl a 0,9%, pH 7,5 e mantido congelado a -20° C.

20 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTURA

As células de melanoma humano C9 foram cultivadas em meio Eagles Modified Dulbecco (DMEM + Glutamax, Invitrogen Gibco, ref 61965-026) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (Gibco Invitrogen, ref 10270-106).

25 As células de melanoma murino B16F10 (ATCC CRL-6475) foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagles + Glutamax suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio (Invitrogen Gibco, ref 25080-060).

As células de melanoma humanas 451Lu (ATCC CRL-2813) foram cultivadas no meio do tumor a 2% contendo uma mistura 4:1 do meio α CD153 (Sigma, M7403), com 1,5 g/L de bicarbonato de sódio (Invitrogen Gibco, Cat no.25080-060), e meio Leibovitz's L-15 (Invitrogen, Cat no.11415-049) com 2 mM de L-Glutamina (Invitrogen, Cat no.25030-024), suplementado com 0,005 mg/mL de insulina bovina (Sigma, ref. I0516-5ML) , 1,68 mM de CaCl_2 (Cambrex, Cat não. CC-4202), e 2% de soro fetal bovino inativado por calor (Invitrogen, Cat no.10270-106).

Os frascos de células congeladas foram produzidos a partir de um único frasco, e mantidos em nitrogênio líquido.

As células foram subcultivadas duas vezes por semana (diluição 1:10 para células C9, 1:15 para as células B16F10, e 1:4 para células 451Lu), a 37° C em uma atmosfera de CO_2 umidificado a 5%. Para subcultura, o meio é removido, lavado com PBS, e 2 mL (para um balão de 75 cm^2) de tripsina-EDTA (Invitrogen Gibco, ref 25300-096) foram adicionados. O balão é deixado para repousar à temperatura ambiente até as células soltarem. O meio fresco é adicionado, centrifugado a 1.200 rpm por 5 min, aspirado, o meio fresco é adicionado, e as células colocadas em frascos novos.

TESTE DE TRANSFEÇÃO E PROLIFERAÇÃO

Um dia antes de transfecção, várias cavidades, 24 placas foram preparadas com 15.000 células B16F10, 30.000 células C9 ou 30.000 células 451Lu em 500 μL por cavidade.

No dia da transfecção (dia a pós o plaqueamento), as células foram contadas para confirmar o número de células por cavidade (pelo menos o número colocado no dia anterior). As células devem estar em ~ 50% de confluência.

As amostras de transfecção foram preparadas em meio sem soro: DMEM[®] (Invitrogen, Cat no. 61965-026) para células B16F10 e C9, e Opti-

MEM® (Invitrogen, Cat não. 51985-026) para células 451Lu.

As doses crescentes do plasmídeo pORT-RDD foram transfectadas (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5 e 2,0 µg por cavidade), quatro cavidades por condição.

5 Para todas as doses de DNA, as amostras foram preparadas a partir de uma solução única de DNA (diluição 1:10 do lote).

A proporção de 2 µL de Lipofectamine/5 µL do reagente Plus® foi selecionada para limitar a citotoxicidade e não foi modificada com quantidades crescentes de DNA, tal conforme recomendado no protocolo do fabricante.

10 As misturas de transfecção foram preparadas em tubos de fundo redondo de poliestireno de 5 mL de acordo com o protocolo a seguir. A agitação foi realizada batendo duas vezes no fundo do tubo com o dedo indicador.

- Preparação das misturas: as misturas foram preparadas em paralelo

15 Mistura 1: DNA/reagente Plus®

Um tubo contendo apenas o reagente Plus®/meio Lipofectamine foi preparado para cada experiência como um controle Lipofectamine sem DNA.

TABELA 16

PREPARAÇÃO DA MISTURA 1 (DNA/REAGENTE PLUS) – PROTOCOLO GERAL

Número da transfecção	Para 1 cavidade	Para 4 cavidades	Mistura 1	Controle de Lipofectamine
DMEM 0% (µL)	45	180		180
PLUS Reagent (µL)	5	20		20
DNA (µL)	X	4x		
Volume final da mistura 1 (µL)	50	200		200

20 A Tabela 17 descreve detalhada a preparação das amostras dependendo dos volumes de DNA (por exemplo, para um lote de plasmídeo diluído a 0,196 mg/mL). O meio foi introduzido pela primeira vez, seguido do reagente Plus e, finalmente, do DNA.

TABELA 17**PREPARAÇÃO DA MISTURA 1 (DNA/REAGENTE PLUS) - PROTOCOLO DETALHADO**

Dose de DNA (μg)	Meio a 0% de FBS (μL)	Reagente Plus (μL)	Volume de DNA (μL)
0,1	178	20	2,04
0,2	176	20	4,08
0,3	174	20	6,12
0,4	172	20	8,16
0,5	170	20	10,20
0,6	168	20	12,24
0,7	166	20	14,29
0,8	164	20	16,33
0,9	162	20	18,37
1	160	20	20,41
1,5	149	20	30,61
2	139	20	40,82

Mistura 2: Lipofectamine[®]

Um único tubo foi preparado para todas as condições de transfecção:

TABELA 18**PREPARAÇÃO DA MISTURA 2**

Número da transfecção	Para 1 cavidade	Para 55 cavidades	
DMEM 0% (μL)	48	2640	Mistura 2
Lipofectamine (μL)	2	110	
Volume final da mistura 2 (μL)	50	2750	

Cada mistura foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente.

Em seguida, o DNA pré-complexado (mistura 1) e a lipofectamina

diluída (mistura 2) foram combinados: 200 µL da mistura 2 foram adicionados gota a gota à mistura 1 (Mistura 1 + 2 volume final = 400 µL para preparar o DNA complexado. Cada mistura com quantidades variáveis de DNA foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente.

5 As células foram lavadas com meio sem soro: 500 µL por cavidade.

1.600 L de meio sem soro foram adicionados na mistura 1 + 2, conseguindo assim um volume final de 2 mL por 4 cavidades).

O meio sem soro foi removido das células, e 500 µL de mistura de
10 1 + 2 diluído em meio sem soro foram adicionados por cavidade. Esta etapa é realizada uma condição por uma (4 cavidades por 4 cavidades).

As células são incubadas precisamente 4 horas a 37° C, 5% de CO₂. Em seguida, a mistura de transfecção é substituída por 750 µL de meio completo por cavidade, e as células são incubadas 96 horas a 37° C, 5% de
15 CO₂.

REVELAÇÃO DO TESTE DE PROLIFERAÇÃO

Após 96 horas de incubação, as células sobreviventes foram reveladas com o reagente MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio).

20 As células são incubadas com 250 µL de PBS e 25 µL de MTT (Sigma) a 5 mg/mL. Após 2 horas de incubação a 37° C, 250 µL de tampão de lise (20% de SDS – 33% de dimetilformamida – 2% de ácido acético – 0,025N de HCl – 0,05N de NaOH) são adicionados durante a noite. 200 µL de cada amostra são distribuídos em placas de 96 cavidades para uma leitura de
25 densidade óptica a 570 nm.

RESULTADOS

Para as três linhagens celulares, uma inibição da proliferação celular dose-dependente foi observada (Figuras 12, 13 e 14).

EXEMPLO 8**LIOFILIZAÇÃO DO PLASMÍDEO pORT-RDD E AVALIAÇÃO *IN VITRO***

A fim de ser capaz de injetar altas doses do plasmídeo pORT-RDD, um processo de liofilização foi desenvolvido, que permite fornecer
5 soluções altamente concentradas de plasmídeo pORT-RDD.

PROTOCOLO DE LIOFILIZAÇÃO

40 mg de pORT-RDD formulada em 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, pH 7,5 foi liofilizada, 2 mg por frasco de vidro de 5 mL, com 2% de manitol e 1% de glicose, de acordo com o seguinte protocolo de liofilização:

10

TABELA 19**PROTOCOLO DE LIOFILIZAÇÃO DO PLASMÍDEO pORT-RDD**

	Temperatura	Tempo de duração	Pressão
Congelamento*	+20°C	0	
	-50°C	1 ou 2 hora(s)	
	-50°C (placa T° = -52°C)	2 horas	
	+ 10°C	3 horas	25 Pa*** (250 µbars)
Sublimação*	+10°C (placa T°)	12 horas	25 Pa (250 µbars)
	+20°C	Até o equilíbrio	25 Pa (250 µbars)
Secagem secundária*	+20°C (placa T°)	máx de 20 horas	5 Pa (50 µbars)
Armazenamento	+5°C		

ANÁLISE DO PLASMÍDEO POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Um frasco (2 mg) foi reconstituído em condições estéreis a 2 mg/mL pela adição de NaCl a 0,9% estéril;

15

1 µg de DNA foi analisado em um gel de agarose a 1%;

Amostra (plasmídeos não liofilizados e liofilizados);

Adicionar água até 10 µL;

Adicionar 1 µL de tampão de carga;

Colocar no gel e migrar (1 Kb da fita, Invitrogen em paralelo);

As formas de DNA plasmidial do plasmídeo pORT-RDD liofilizado reconstituído foram comparadas ao plasmídeo não-liofilizado pORT-RDD.

Conforme mostrado na Figura 15, não foram detectadas
5 diferenças visíveis no gel de agarose após a migração da mesma quantidade de plasmídeos liofilizados e não-liofilizados. Não havia nenhum sinal de degradação e quantidades equivalentes de cada forma de plasmídeo.

ANÁLISE DE PLASMÍDEO ATRAVÉS DO TESTE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

A fim de demonstrar que o processo de liofilização não afetou a
10 atividade biológica do pORT-RDD, células de melanoma humana C9 e 451Lu foram transfectadas com doses crescentes de plasmídeos pORT-RDDs liofilizados e não-liofilizados, de acordo com o protocolo de Lipofectamine Plus otimizado, detalhado no Exemplo 7.

96 horas após a transfecção, as células vivas foram reveladas
15 pelo reagente MTT.

Os resultados são mostrados nas Figuras 16 e 17. O Lote 3, correspondente ao plasmídeo pORT-RDD não-liofilizado e o Lote 4 corresponde ao plasmídeo liofilizado.

Perfis de inibição semelhantes foram obtidos entre o plasmídeo
20 liofilizado e o plasmídeo não-liofilizado para ambas as linhagens celulares.

Portanto, foi demonstrado que o processo de liofilização desenvolvido é seguro tanto para a integridade do plasmídeo, a medida que não foram observados sinais de degradação, como para a atividade biológica. Os lotes liofilizados e não-liofilizados foram mostrados para exibir um efeito
25 inibitório comparável sobre a proliferação de células de melanoma após a transfecção.

Em conjunto, estes resultados permitem a utilização do processo de liofilização para mais lotes de plasmídeo pORT-RDD.

EXEMPLO 9

AValiação de uma Única Eletrotransferência Intratumoral do Plasmídeo PORT-RDD Liofilizado em Tumores B16F10 Subcutâneos

O objetivo deste estudo é demonstrar que o plasmídeo pORT-RDD, na sua formulação final (liofilizado em manitol a 2% - glicose a 1%) e administrado na dose de 200 µg ideal, inibe o crescimento do tumor B16F10 da mesma forma que o plasmídeo não-liofilizado. O tratamento consistiu em uma única eletrotransferência intratumoral do veículo (tampão TE-NaCl), placebo liofilizado (solução liofilizada de manitol a 2% - glicose a 1%) ou 200 µg de plasmídeo pORT-RDD (liofilizado ou não) nos tumores de melanoma B16F10 subcutâneos pré-estabelecidos. Para este propósito, o volume de tumor estava compreendido entre 30 e 50 mm³ e três grupos foram tratados: (1) veículo, (2) 200 µg de pORT-RDD preparado com 4 mg/mL por precipitação e (3) 200 µg do lote pORT-RDD liofilizado preparado com 4 mg/mL. Os volumes do tumor foram monitorados durante 14 dias após o tratamento.

PROJETO DO ESTUDO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO

INJEÇÃO DE CÉLULAS

As células B16F10 foram subcultivadas 48 horas antes do dia da injeção.

No dia da inoculação das células, as células B16F10 subconfluentes foram lavadas com PBS e, em seguida, incubadas com solução de tripsina-EDTA (Invitrogen Gibco, ref 25300-096) até as células soltarem. O meio fresco foi adicionado, as células foram centrifugadas a 1.200 rpm por 5 min, e ressuspensas em 25 mL de meio fresco. As células foram colocadas em contato com Trypan Blue a 0,04% para a quantificação da viabilidade. As células foram centrifugadas e ressuspensas em volume adequado de NaCl a 0,9% (Versol, Laboratoire Caissie, Lyon, França), a fim de obter 10⁶ células B16F10 em 100 µL.

100 µL de células foram injetadas por via SC, no flanco direito dos camundongos. Os flancos de camundongos foram previamente raspados com uma lâmina elétrica um dia antes da injeção de células.

PREPARAÇÃO DO PLASMÍDEO

5 - Para o grupo que recebeu o plasmídeo não-liofilizado, 200 µg de do plasmídeo pORT-RDD foram injetados em 50 µL, levando à preparação do plasmídeo em 4,0 µg/µL por precipitação com etanol e ressuspensão em 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, NaCl a 0,9%, pH 7,5 de tampão estéril.

10 - Para o grupo que recebeu o plasmídeo liofilizado reconstituído, os frascos necessários foram reconstituídos a 4 µg/µL com NaCl a 0,9% estéril.

PROJETO DE ESTUDO

O estudo envolveu 50 camundongos fêmeas C57BL/6 possuindo um tumor de 30 a 50 mm³ no seu flanco direito. A atribuição do tratamento foi decidida de forma aleatória e é a seguinte:

15

TABELA 20

GRUPO DE CAMUNDONGOS TRATADOS

Grupo	Tratamentos	Dose por injeção (µg in 50 µL)	Nº do tratamento	Nº de animais por grupo
1	Veículo	Nenhum	1	10
2	Plasmídeo não-liofilizado	200	1	10
3	Plasmídeo liofilizado	200	1	10

PROTOCOLO DE ELETROTRANSFERÊNCIA

Os animais foram anestesiados conforme descrito anteriormente.

20 O tratamento consistiu em uma única injeção intratumoral de 200 µg de plasmídeos em 50 µL de tampão TE-NaCl. Um gel condutor foi aplicado sobre o tumor. A injeção foi imediatamente seguida pela aplicação de impulsos elétricos através da utilização de dois eletrodos de placa de aço inoxidável

colocados a 5 mm do tumor, com o dispositivo Cliniporator[®], de acordo com o protocolo:

- HV = 1500 V/cm, 100 μ s, 1 Hz, 1 pulso;

- Pausa = 1.000 ms;

5 - LV = 140 V/cm, 400 ms, 1 pulso;

O dia 0 corresponde ao dia de tratamento por eletrotransferência.

CONTROLE DE ANIMAIS E SACRIFÍCIO

O tamanho do tumor foi monitorado através da medida de dois diâmetros perpendiculares com um calibrador digital.

10 O volume tumoral foi calculado segundo a fórmula: (comprimento + largura/2)³ x $\pi/6$.

A inibição do crescimento do tumor foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 \times [1 - (\text{volume tumoral no grupo tratado/volume tumoral no grupo controle})].$$

15

RESULTADO

Conforme mostrado na Figura 18 e na Tabela 21, ambos os plasmídeos liofilizado e não-liofilizado inibiram significativamente o crescimento do tumor B16F10. Curvas de crescimento do tumor similares foram obtidas para plasmídeos liofilizados e não-liofilizados.

20

Mais importante ainda, não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados não-liofilizados pORT-DDD e liofilizados pORT-RDD durante todo o experimento.

TABELA 21

25

PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO TUMOR

Dias	2	5	7	9	12
pORT-RDD vs veículo	48,7	81,9	83,1	79,9	74,4
Valor p (teste t de Student)	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Dias	2	5	7	9	12
pORT-RDD liof. vs veículo	48,1	74,5	74,9	71,5	71,5
Valor p (teste t de Student)	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Em conjunto, estes resultados demonstraram que o processo de liofilização é eficiente para a atividade biológica do plasmídeo pORT-RDD. Os lotes liofilizados e não-liofilizados demonstraram exibir um efeito inibitório comparável sobre o crescimento tumoral B16F10 subcutâneo.

5

EXEMPLO 10

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA ELETROTRANSFERÊNCIA INTRAMUSCULAR PREVENTIVA DO PLASMÍDEO pORT-RDD NO CRESCIMENTO DE TUMOR SUBCUTÂNEO B16F10

O objetivo do presente estudo foi determinar o potencial efeito preventivo do plasmídeo pORT-RDD sobre o crescimento do tumor subcutâneo B16F10 quando eletrotransferido para o músculo de camundongos antes da inoculação das células tumorais.

O tratamento consistiu na eletrotransferência de 400 µg de plasmídeo pORT-RDD nos músculos *Tibialis cranialis* no dia -1 (200 µg em 50 µL em cada músculo *Tibialis cranialis*). Os animais controle receberam o veículo nas mesmas condições experimentais. Em seguida, as células tumorais foram injetadas no flanco direito dos camundongos C57Bl/6J, um dia após o tratamento por eletrotransferência (dia 0). O desenvolvimento do tumor e do volume do tumor foram regularmente monitorados.

PROJETO DE ESTUDO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO

20

PREPARAÇÃO DO PLASMÍDEO

Uma quantidade total de 400 µg de plasmídeo pORT-RDD liofilizado por camundongo, em um volume de 100 L foi injetada (50 µL em cada músculo *Tibialis cranialis*). Os frascos liofilizados estéreis de plasmídeo foram reconstituídos a 4 mg/mL pela adição de água para injeção. A suspensão do plasmídeo foi mantida a 4° C durante o tempo de injeção.

25

PROJETO DE ESTUDO

O estudo envolveu 30 camundongos fêmeas C57BL/6J.

A atribuição do tratamento foi decidida de forma aleatória e foi a seguinte:

5

TABELA 22**GRUPOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS**

Grupo	Tratamentos	Dose por injeção (μg em 50 μL)	N° do tratamento	N° de animais por grupo
1	Veículo	Nenhum	2	15
2	pORT-RDD	200	2	15

Antes da eletroporação, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 0,2 mL de uma mistura de cetamina/xilazina.

O tratamento consistiu em uma injeção intramuscular de 200 μg de plasmídeos em 50 μL de água para injeção em cada músculo *Tibialis cranialis* de camundongos, imediatamente seguido por eletroporação. Um gel condutor foi aplicado na perna. A injeção foi imediatamente seguida pela aplicação de impulsos elétricos através da utilização de dois eletrodos de placas de aço inoxidável colocados a 5 mm da perna, com o dispositivo Cliniporator, de acordo com o protocolo:

- HV = 700 V/cm (isto é, 350 V), 100 μs , 1 Hz, 1 pulso,
- Pausa = 1.000 ms,
- LV = 100 V/cm (ou seja, 50 V), 400 ms, 1 pulso.

O dia 1 corresponde ao dia de tratamento por eletrotransferência.

20

Um dia antes da eletrotransferência intramuscular, o dorso foi raspado com uma lâmina elétrica. No dia do tratamento, os camundongos foram identificados por tatuagem de dedo e as pernas estavam raspadas.

INJEÇÃO DE CÉLULAS

As células B16F10 foram injetadas no dia após o tratamento por eletrotransferência (dia 0).

As células B16F10 foram mantidas em cultura até 8 passagens antes da injeção em camundongos. As células foram subcultivadas a 48 – 72 h antes do dia da injeção.

O dia da inoculação de células, as células B16F10 subconfluentes foram lavadas com PBS e, em seguida, incubadas a 37° C, com tripsina-EDTA (Invitrogen Gibco, ref 25300-096) até as células soltarem. O meio fresco foi adicionado, as células foram centrifugadas a 1.200 rpm por 5 min, e ressuspensas em 50 mL de meio fresco. As células foram contadas em Trypan Blue a 0,04% para a quantificação da viabilidade. As células foram centrifugadas e ressuspensas em volume adequado de NaCl a 0,9%, a fim de obter 10⁶ células B16F10 em 100 µL.

100 µL de células foram injetadas por via subcutânea, no dorso dos camundongos.

CONTROLE DE ANIMAIS E SACRIFÍCIO

Após a injeção de células tumorais B16F10 (dia 0), os camundongos foram monitorados regularmente até os tumores estarem palpáveis (cerca do dia 5 – dia 7). Então, os volumes do tumor foram monitorados regularmente através da medição de dois diâmetros perpendiculares (diâmetros mais compridos e mais volumosos) com um calibrador digital.

O volume tumoral foi calculado segundo a fórmula: (comprimento + largura/2)³ x π/6. A inibição do crescimento do tumor foi calculada conforme segue:

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times [1 - (\text{volume tumoral no grupo tratado} / \text{volume tumoral no grupo controle})].$$

RESULTADOS**TABELA 23****PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO TUMOR**

Dias	6	7	8	9	12	14	16	19
pORT-RDD vs veículo	75,9%	35,1%	35,9%	34,5%	25,1%	28,7%	33,6%	28,7%
Teste p de student	0,0733	0,3443	0,1414	0,1135	0,1032	0,0756	0,0024	0,0315

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software
5 GraphPad Prism 4.0. Um valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Como mostrado nas Figuras 19 e 20 e na Tabela 23, uma
eletrotransferência de 400 μg do plasmídeo pORT-RDD intramuscular induziu
uma inibição de 75,9% do crescimento do tumor no dia 6 em relação ao grupo
controle do veículo e cerca de 25 a 35% a partir de dia 7 até o final do estudo.
10 Esta diferença no dia 6 entre o grupo pORT RDD tratado e grupo controle pode
ser explicado pelo atraso na implantação do tumor subcutâneo no grupo
tratado. Com efeito, neste momento do experimento, os tumores menores (com
menor volume) foram detectados em camundongos.

A diferença entre o grupo tratado e o grupo controle foi
15 significativa no dia 16 (33,6%) e no dia 19 (28,7%) (valor de $p < 0,05$).

Além disso, conforme mostrado na Tabela 24, o tratamento com
plasmídeo pORT-RDD diminuiu significativamente o crescimento do tumor
B16F10 subcutâneo. Na verdade, o tempo médio para atingir um volume do
tumor de 1.000 mm^3 e 2.000 mm^3 foi diminuído no grupo tratado em
20 comparação ao grupo controle.

TABELA 24

**TEMPO MÉDIO PARA O CRESCIMENTO DE 1.000 mm^3 E 2.000 mm^3 DO TUMOR B16F10
SUBCUTÂNEO NO GRUPO VEÍCULO E GRUPO TRATADO DO PLASMÍDEO PORT-RDD**

	Tempo para atingir o volume do tumor de 1.000 mm³	Tempo para atingir o volume do tumor de 2.000 mm³
Grupo veículo	16,4 dias	19,7 dias
Grupo p-AMEP	18,2 dias	21,1 dias
teste p de Student	0,0052	0,0158

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 4.0. Um valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Estes resultados indicam que a AMEP sistêmica, produzida graças a uma eletrotransferência muscular do pORT-RDD, é capaz de inibir a
5 implantação do crescimento do tumor B16F10.

Um tratamento de eletrotransferência muscular repetida no intervalo de 7 dias pode ser capaz de aumentar este efeito de proteção sistêmica.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Bioalliance Pharma

<120> Plasmídeo contendo uma sequência de codificação de um domínio desintearina de metaroidina (rdd)

<130> BET 08P0136

<160> 3

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 276

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(276)

<223> RDD

<400> 1

atggetgctt tctgcggaaa tatgtttgtg gagccgggcy agcagtgatga ctgtggcttc	60
ctggatgact gcgtcgatcc ctgctgtgat tctttgacct gccagctgag gccaggtgca	120
cagtgtgcat ctgacggacc ctgttgtcaa aattgccagc tgcgcccgtc tggctggcag	180
tgctgtcta ccagagggga ttgtgacttg cctgaattct gccaggaga cagctcccag	240
tgteccccctg atgtcagcct aggggatggc gagtaa	276

<210> 2

<211> 2531

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Plasmídeo

<220>

<221> misc_feature

<222> (211)..(231)

<223> lacO3

<220>

<221> misc_feature

<222> (303)..(323)

<223> lacO1

<220>

<221> misc_feature

<222> (423)..(1010)

<223> promotor de CMV-intronA

<220>

```

<221> misc_feature
<222> (1108)..(1167)
<223> sinal de secreção de uroquinase humana

<220>
<221> misc_feature
<222> (1168)..(1443)
<223> gene RDD humano

<220>
<221> misc_feature
<222> (1481)..(1705)
<223> sinal de poliadenilação de BGH (hormônio de crescimento bovino)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1858)..(2454)
<223> pMB1 Ori

<400> 2
tgattctgtg gataaccgta ttaccgectt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg      60
aacgaccgag cgcagcgagt cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc      120
gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagggcc ggcccggcct aggtaccccc      180
tggcaccgaca ggtttcccgga ctggaaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt      240
tagctcactc attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt      300
ggaattgtga gcggataaca atttcacaca gaaacagct atgaccatga ttacgccaaag      360
cgcgcaatta accctcacta aagggaaaca aagctggagc gatgtacggg ccagatatac      420
gcgttgacat tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca      480
tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggccccg ctggctgacc      540
gccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat      600
agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgcc acttggcagt      660
acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc      720
cgctggcat tatgccagc acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta      780
cgtattagtc atcgctatta ccatgggatg gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg      840
atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt      900
gttttggcac caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac      960
gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc tctggctaac     1020
tagagaaccc actgettact ggcttatcga aattaatacg actcaactata gggagaccca     1080
agctggctag cgtttaaact taagcttatg agagccctgc tggcgcgcct gcttctctgc     1140
gtcctggctg tgagcgactc caaaggcatg gctgctttct gcggaaatat gtttgtggag     1200
ccgggcgagc agtgtgactg tggcttctg gatgaactgc tcgatccctg ctgtgattct     1260

```

ttgacctgcc agctgaggcc aggtgcacag tgtgcatctg acggaccctg ttgtcaaaat 1320
 tgccagctgc gcccgctctgg ctggcagtgt cgtcctacca gaggggattg tgacttgect 1380
 gaattctgcc caggagacag ctcccagtgt cccctgatg tcagcctagg ggatggcgag 1440
 taatctagag ggccccgttta aaccgctga tcagcctga ctgtgccttc tagttgccag 1500
 ccatctgttg tttgccccctc ccccgctgct tccttgacce tggaagggtgc cactcccact 1560
 gtcccttctc aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc tgagttaggtg tcattctatt 1620
 ctgggggggtg ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt gggaagacaa tagcaggcat 1680
 gctgggggatg cgggtgggctc tatggcttct gagggcgaaa gaaccaggac ctcgaggggg 1740
 ggcccggtac ccaattcgcc ctatagttag tcgtattacg cgcgctcact ggccgtcgtt 1800
 ttacaacgtg agttttcgtt ccaactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct 1860
 tcttgagatc cttttttctc gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta 1920
 ccagcggtagg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc 1980
 ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtt cttctagtgt agccgtagt aggccaccac 2040
 ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct 2100
 gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat 2160
 aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggtc tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg 2220
 acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcggcac gcttcccga 2280
 gggagaaagg cggacaggta tccgtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg 2340
 gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga 2400
 cttgagcgtc gatttttctg atgctcgtca ggggggogga gcctatggaa aaacgccagc 2460
 aacgggcct ttttacggtt cctggcctt tgctggcctt ttgctcacat gttcttctc 2520
 gcgttatccc c 2531

<210> 3
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> expressão cassete

<400> 3
 aagcttatga gagccctgct ggcgcgctg cttctctgcg tcctggctgt gagcgactcc 60
 aaaggcatgg ctgctttctg cggaaatatg tttgtggagc cgggcgagca gtgtgactgt 120
 ggcttctcgg atgactgcgt cgatccctgc tgtgattctt tgacctgcca gctgaggcca 180

ggcgcacagt	gtgcatctga	cggaccctgt	tgtcaaaatt	gccagctgcg	cccgtctggc	240
tggcagtgtc	gtcctaccag	aggggattgt	gacttgctg	aattctgcc	aggagacagc	300
tcccagtgtc	ccctgatgt	cagcctaggg	gatggcgagt	aatctaga		348

REIVINDICAÇÕES

1. PLASMÍDEO pORT, caracterizado pelo fato de que contém uma seqüência que codifica todo ou parte de um domínio desintegrina de uma metargidina ou um derivado do mesmo sob o controle do promotor citomegalovírus forte (CMV), onde a dita seqüência é inserida.
5
2. PLASMÍDEO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que contém uma seqüência de codificação de um domínio desintegrina de metargidina de seqüência SEQ ID No: 1 ou sua variante, em que um ou mais nucleotídeos são substituídos, adicionados,
10 deletados da SEQ ID No: 1 e que possui pelo menos 80% de identidade de seqüência com a SEQ ID No: 1 e que mantém a capacidade de inibir a proliferação celular endotelial e/ou inibir a angiogênese *in vitro* e/ou *in vivo*.
3. PLASMÍDEO, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que contém uma seqüência de codificação do
15 domínio desintegrina de metargidina (RDD), em que dito plasmídeo possui a seqüência apresentada na SEQ ID NO: 2.
4. CÉLULA HOSPEDEIRA, caracterizada pelo fato de que é transformada com o plasmídeo conforme descrito em uma das reivindicações de 1 a 3.
- 20 5. CÉLULA HOSPEDEIRA, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que é uma bactéria *Escherichia coli*.
6. CÉLULA HOSPEDEIRA, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que é uma célula de mamífero.
- 25 7. MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM PLASMÍDEO pORT-RDD, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas que consistem no cultivo de uma célula hospedeira conforme descrita em uma das reivindicações de 4 a 6, e na recuperação do plasmídeo pORT-RDD a partir das células hospedeiras cultivadas.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreende o cultivo de uma célula hospedeira conforme descrita em uma das reivindicações 4 ou 5, e que inclui ainda a purificação do plasmídeo pORT-RDD pelas etapas de: (a) lise alcalina das células hospedeiras cultivadas, (b) filtração em bolsas de malha; (c) cromatografia de troca aniônica, (d) concentração, (e) cromatografias de exclusão por tamanho e fase reversa por pareamento iônico e (f) filtração.

9. MÉTODO PARA A PURIFICAÇÃO DO PLASMÍDEO pORT-RDD, a partir de uma célula hospedeira conforme descrita em uma das reivindicações 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de: (a) lise alcalina das células hospedeiras, (b) filtração em bolsas de malha; (c) cromatografia de troca aniônica, (d) concentração, (e) cromatografias de exclusão por tamanho e fase reversa por pareamento iônico e (f) filtração.

10. MÉTODO PARA A EXPRESSÃO DE PEPTÍDEOS RDD, *in vitro* ou *in vivo* em células de mamíferos, caracterizado pelo fato de que compreende transformar ditas células de mamíferos com o plasmídeo pORT-RDD, pelo qual o peptídeo RDD é expresso nas células de mamíferos.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a célula de mamífero é uma célula tumoral.

12. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada pelo fato de que compreende o plasmídeo conforme descrito em uma das reivindicações 1 a 3, juntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável.

13. USO DE UM PLASMÍDEO, conforme descrito em uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é para o tratamento de tumor.

14. USO, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que dito plasmídeo é destinado para a prevenção e/ou tratamento de tumor metastático.

15. USO, de acordo com uma das reivindicações 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que dito plasmídeo é colocado em contato com o tumor ou as células musculares e o tumor ou o músculo é estimulado eletricamente conforme segue:

- 5 - primeiro com pelo menos um pulso de intensidade do campo de Alta Tensão (HV) entre 200 e 2.000 volts/cm,
 - segundo, com um único pulso de intensidade do campo de Baixa Tensão (LV) entre 50 e 200 volts/cm e com uma duração entre 300 e 2.000 ms.

10 16. USO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que dito plasmídeo é colocado em contato com as células tumorais através de uma injeção intratumoral.

15 17. USO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que dito plasmídeo é colocado em contato com as células tumorais ou musculares através da injeção intramuscular.

18. USO, de acordo com uma das reivindicações 15 a 17, caracterizado pelo fato de que os pulsos HV e LV são separados por um lapso compreendido entre 300 ms e 3000 s.

20 19. USO, de acordo com uma das reivindicações 15 a 18, caracterizado pelo fato de que o tumor ou o músculo é estimulado eletricamente conforme segue:

- HV = 1000 – 1600 V/cm, 50 – 200 μ s, 1 pulso, 1 Hz;
- Pausa: entre 500 ms e 10 s;
- LV = 100 – 200 V/cm, 300 – 800 ms, 1 pulso.

25 20. MÉTODO PARA AVALIAR A POTÊNCIA INIBITÓRIA *IN VITRO* DE UM PLASMÍDEO pORT-RDD, conforme descrito em uma das reivindicações 1 a 3, na proliferação de células tumorais, em que o método é caracterizado pelo fato de que compreende as etapas que consistem em:

(a) fornecer culturas sub-confluentes de uma linhagem de célula tumoral;

(b) transfectar as culturas de células da etapa (a), separadamente, com quantidades crescentes de um plasmídeo pORT-RDD de acordo com a presente invenção, ou com um controle;

(c) realizar a cultura das células transfectadas da etapa (b) em condições que são adequadas para a obtenção de proliferação das células transfectadas com o controle;

(d) para cada determinada quantidade de plasmídeo pORT-RDD transfectado, determinar a porcentagem de células sobreviventes quando comparado com o número de células em cultura celular fornecido na etapa (a), que foi submetido à transfecção com dita quantidade específica de plasmídeo pORT-RDD;

(e) para as células transfectadas com o controle, determinar a porcentagem de células sobreviventes quando comparado com o número de células na cultura celular fornecido na etapa (a), que foi submetido à transfecção com dito controle;

- em que o plasmídeo pORT-RDD é determinado como possuindo um potencial inibitório caso uma porcentagem de células sobreviventes calculadas na etapa (d) seja menor do que a porcentagem de células sobreviventes calculadas na etapa (e).

21. MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO pORT-RDD LIOFILIZADO, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas que consistem em:

(a) congelamento de uma solução de plasmídeo pORT-RDD de -40° C a -60° C;

(b) sublimação que é realizada através do aumento da temperatura a uma temperatura de +5° C a +15° C durante um período de 10 a

20 horas sob uma pressão de 20 a 30 Pa; e

(c) secagem secundária que é realizada à temperatura ambiente, em 20 – 30 Pa até o plasmídeo pORT-RDD atingir a temperatura ambiente, depois em 3 – 7 Pa por até 20 horas.

5 22. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) congelamento de uma solução de plasmídeo pORT-RDD de +20° C a -50° C em 1 a 2 horas, e manutenção da temperatura a -50° C por 2 horas;

10 (b) sublimação que é realizada em uma pressão de 25 Pa a +10° C durante 3 horas, depois a 10° C por 12 horas;

(c) secagem secundária que é realizada a +20° C por até 20 horas.

15 23. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 21 ou 22, caracterizado pelo fato de que dita solução de plasmídeo pORT-RDD contém manitol 1,9 a 2,0 mg/ml e glicose 4,8 a 4,9 mg/ml.

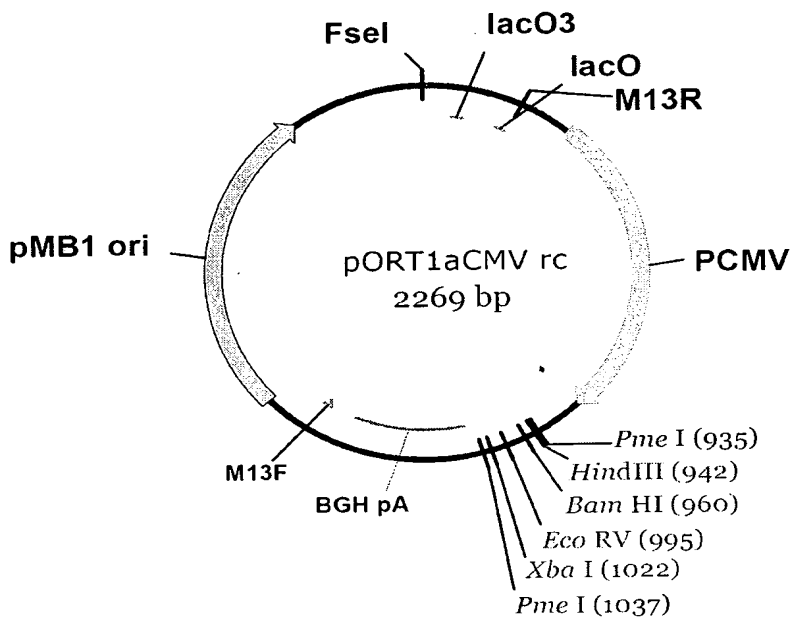


Fig. 1

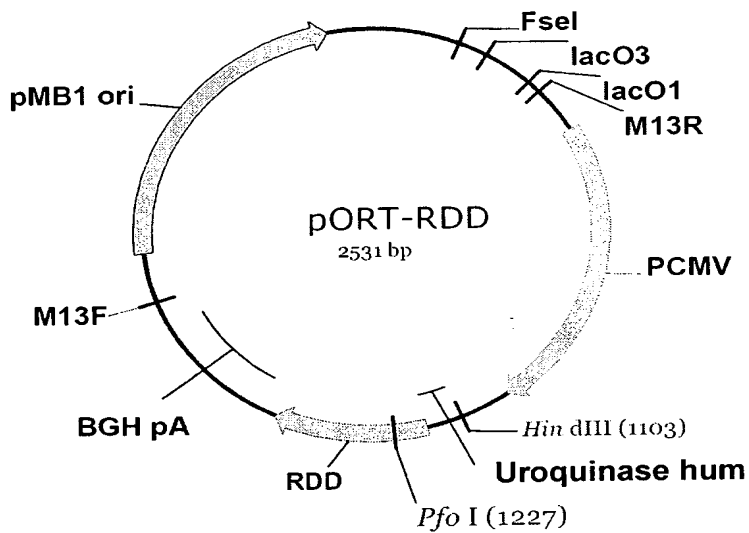
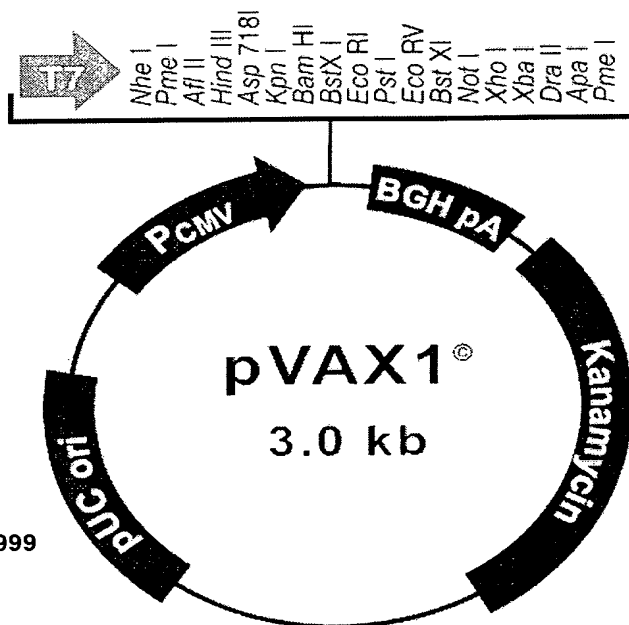


Fig. 2



Comentários para Pvac1[®]: 2999
bp

Promotor CMV: bases 137-724
 Promotor T7/ Sítio de iniciação: bases 664-683
 Sítio de clonagem múltipla: bases 696-811
 Sítio iniciação reversa BGH: bases 823-840
 Sinal de poliadenilação BGH: bases 829-1053
 Gene de resistência à canamicina: bases 1226-2020
 Origem PUC: bases 2320-2993

Fig. 3

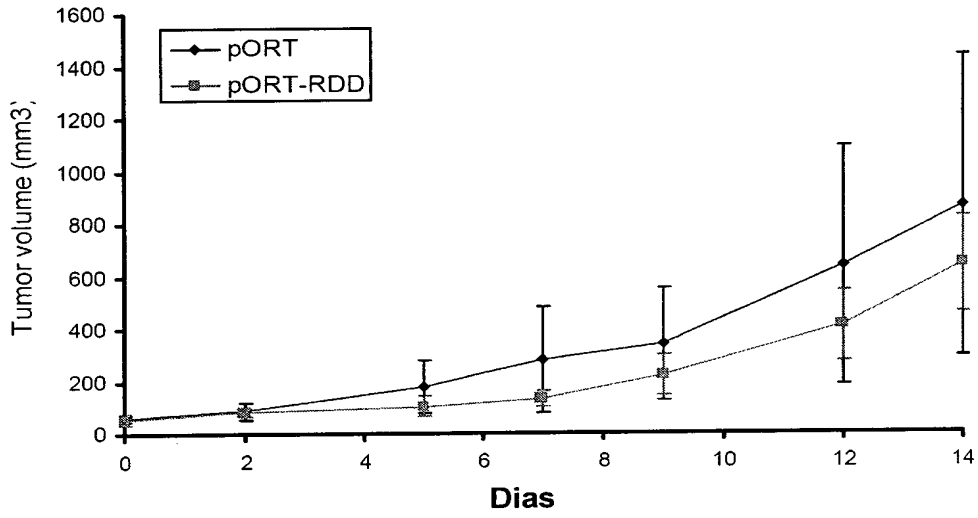


Fig. 4

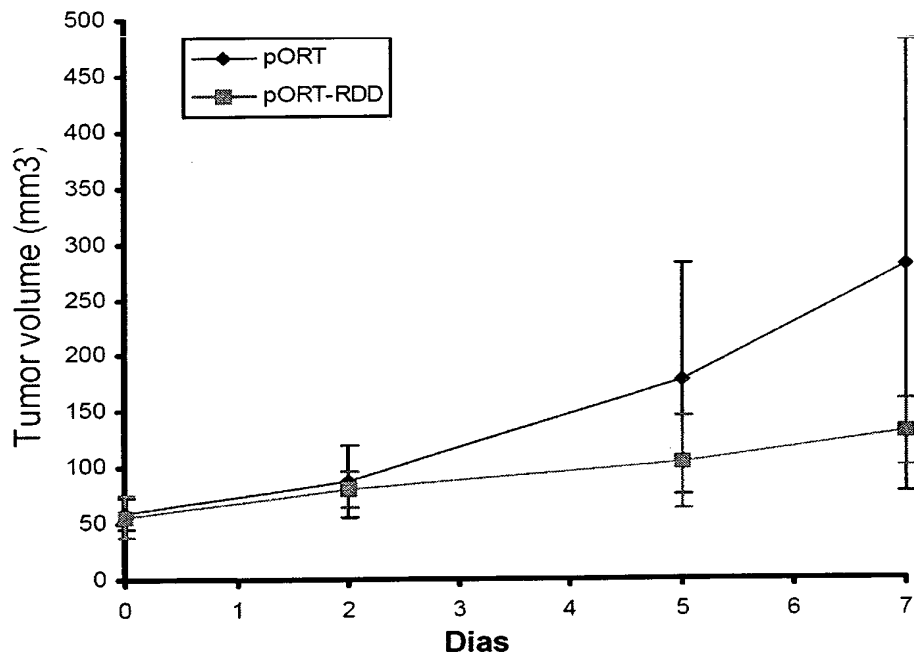


Fig. 5

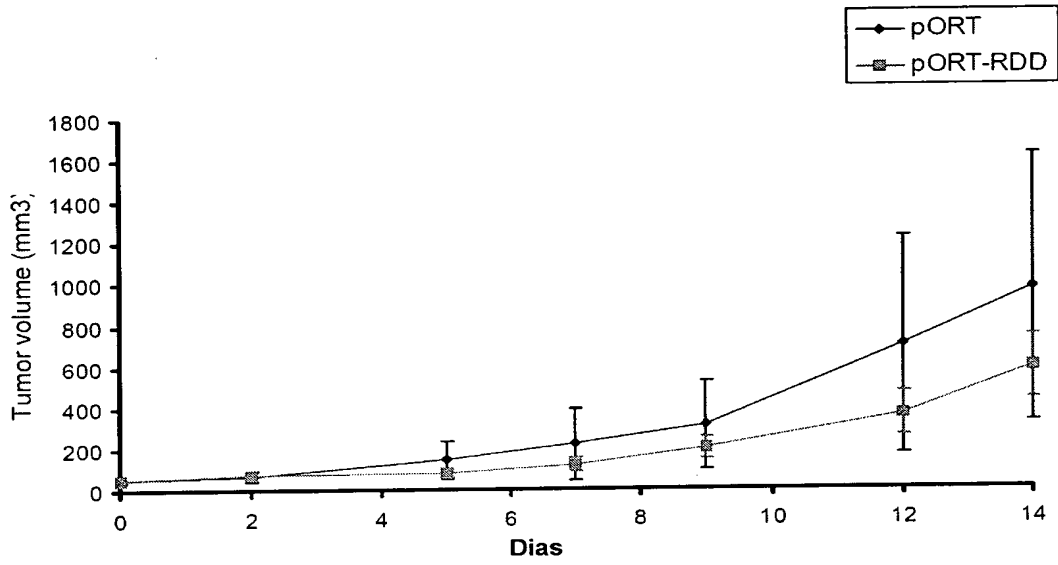


Fig. 6

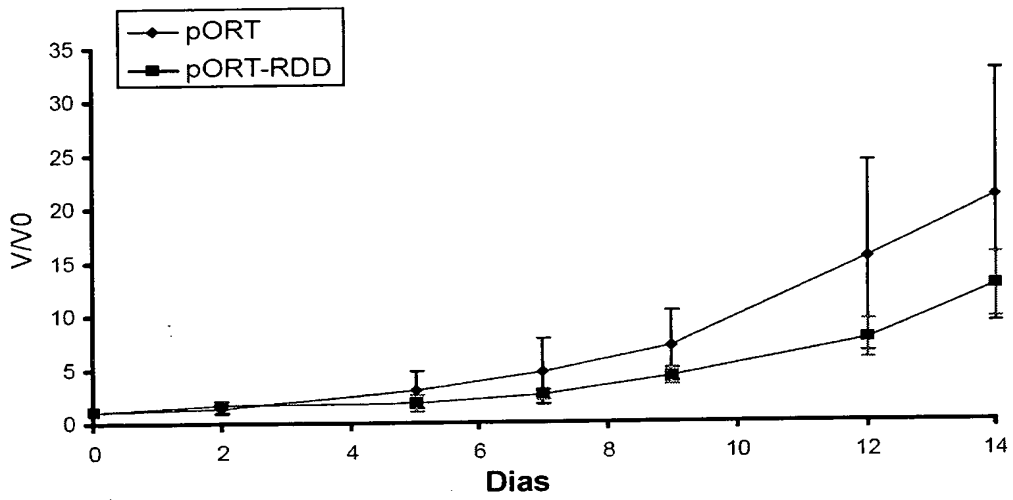


Fig. 7

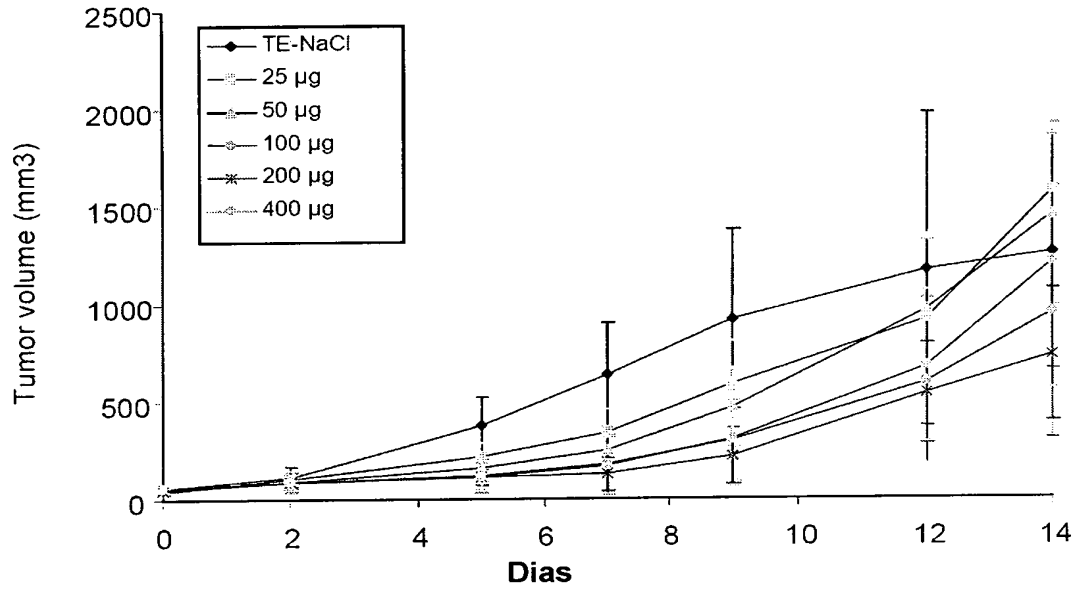


Fig. 8

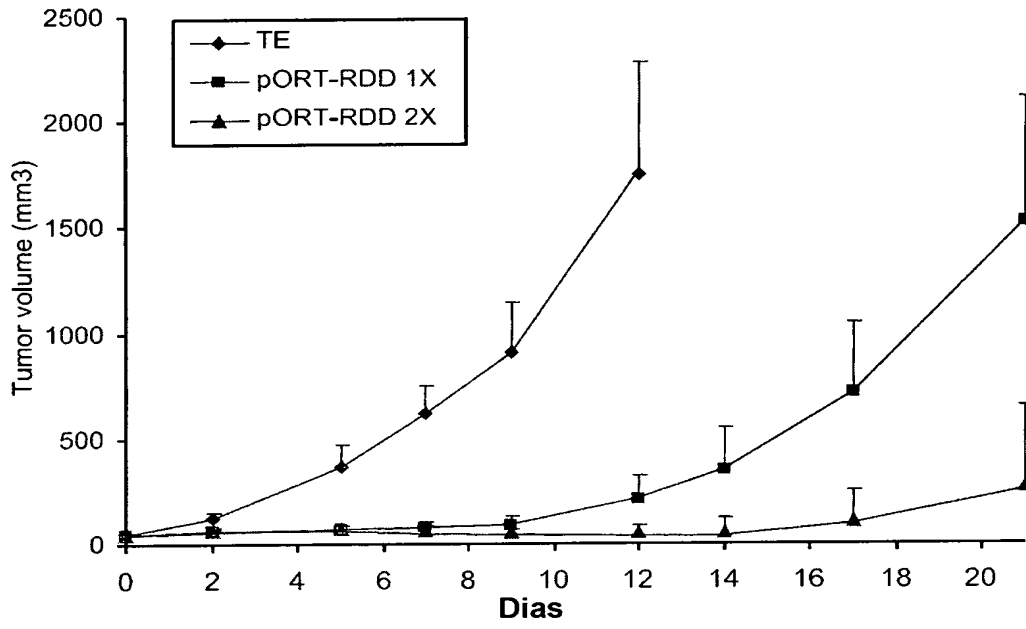


Fig. 9

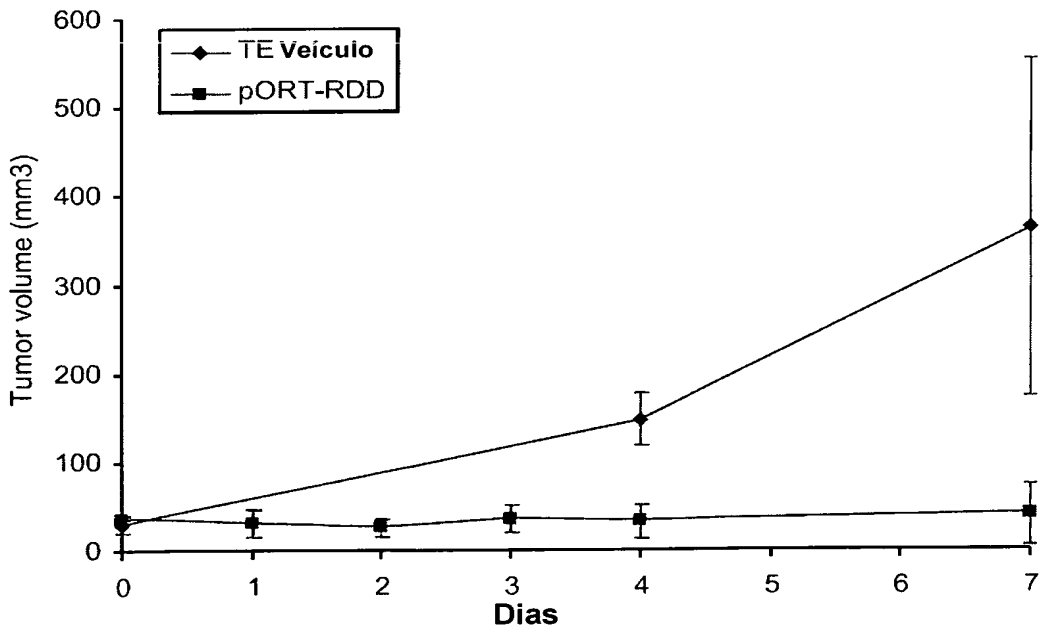


Fig. 10

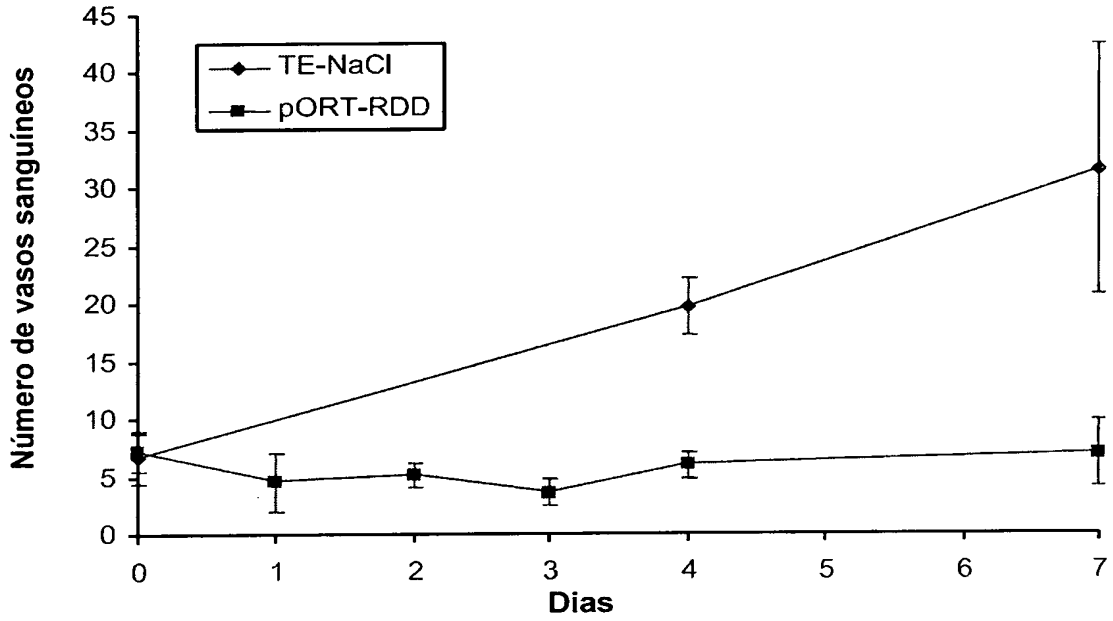


Fig. 11

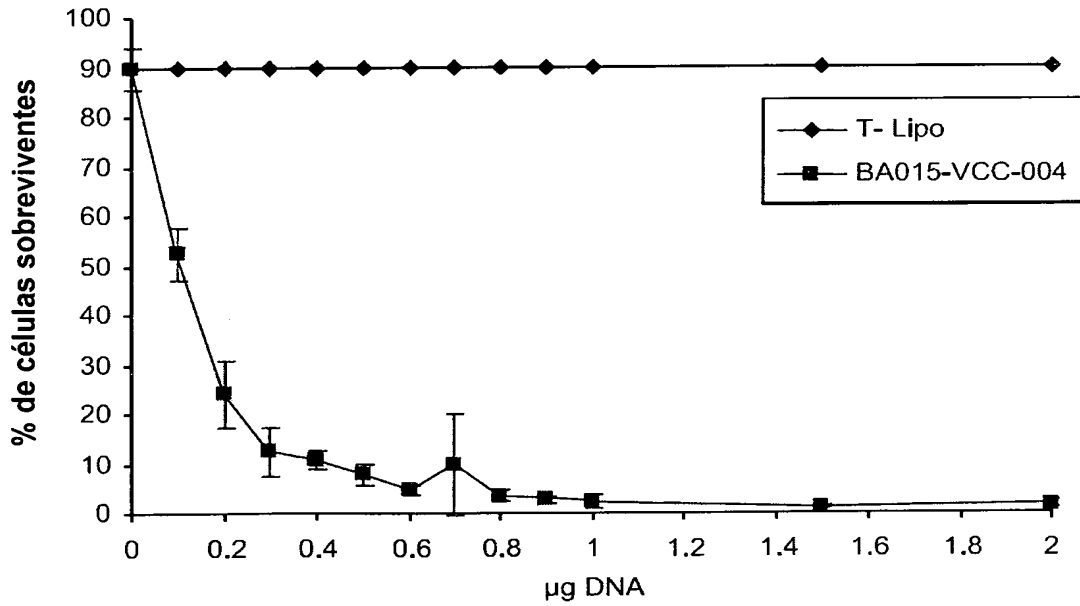
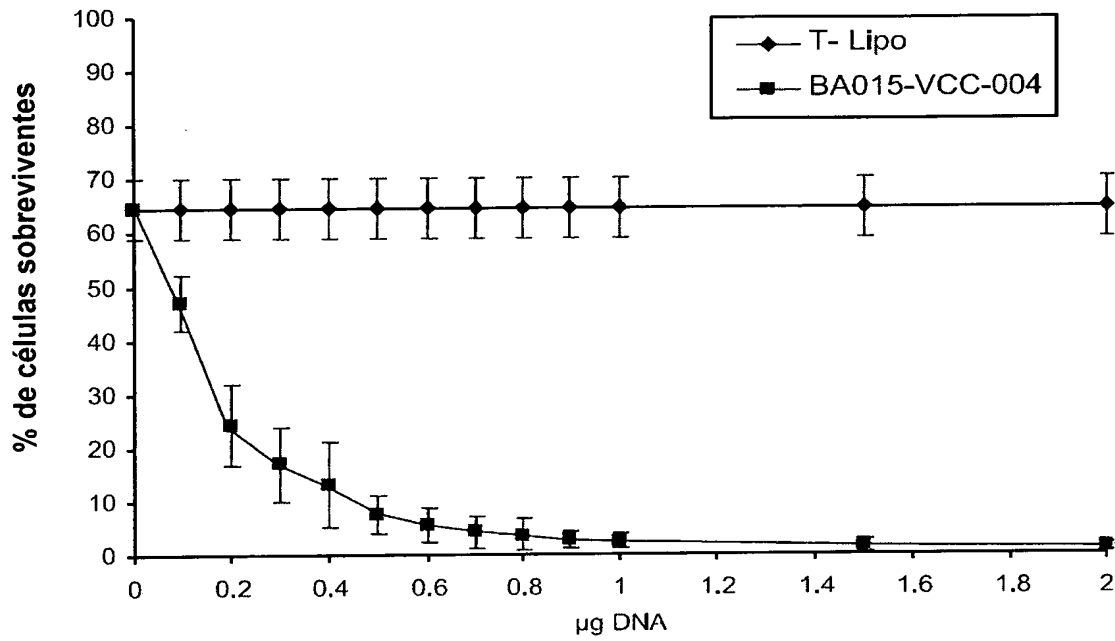
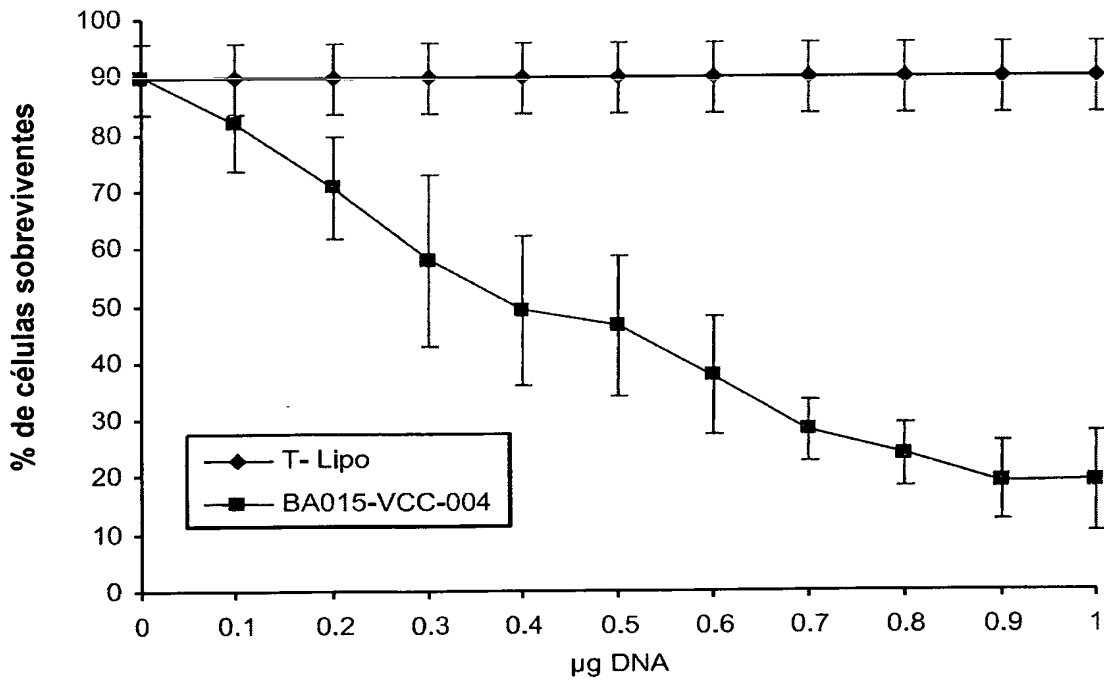


Fig. 12

**Fig. 13****Fig. 14**

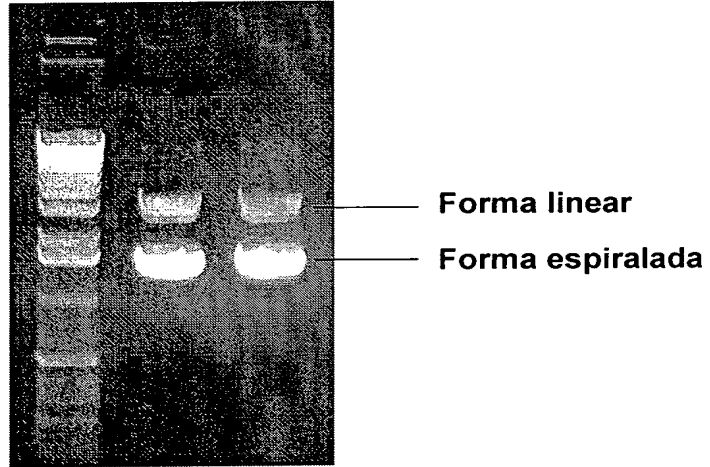


Fig. 15

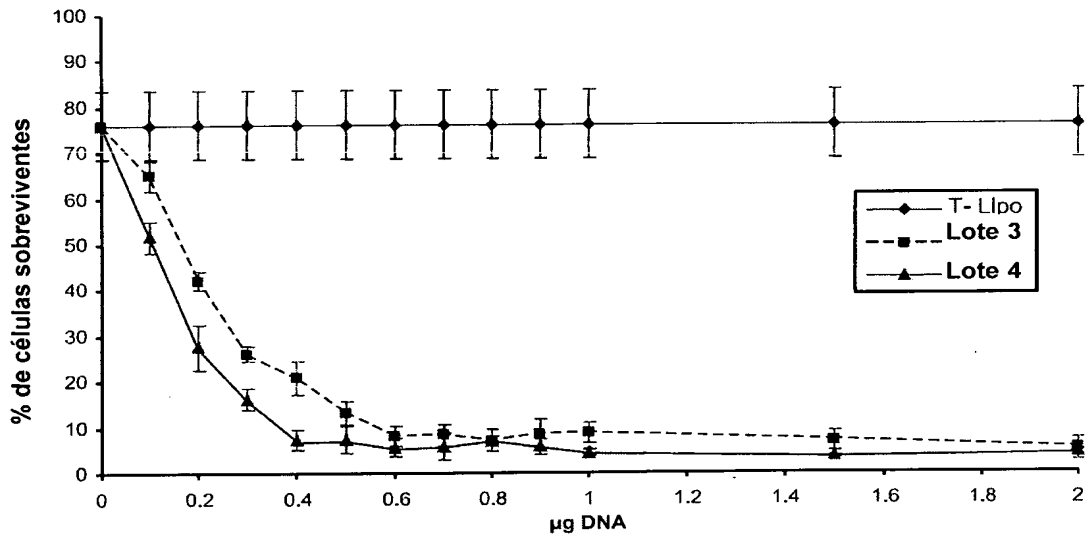


Fig. 16

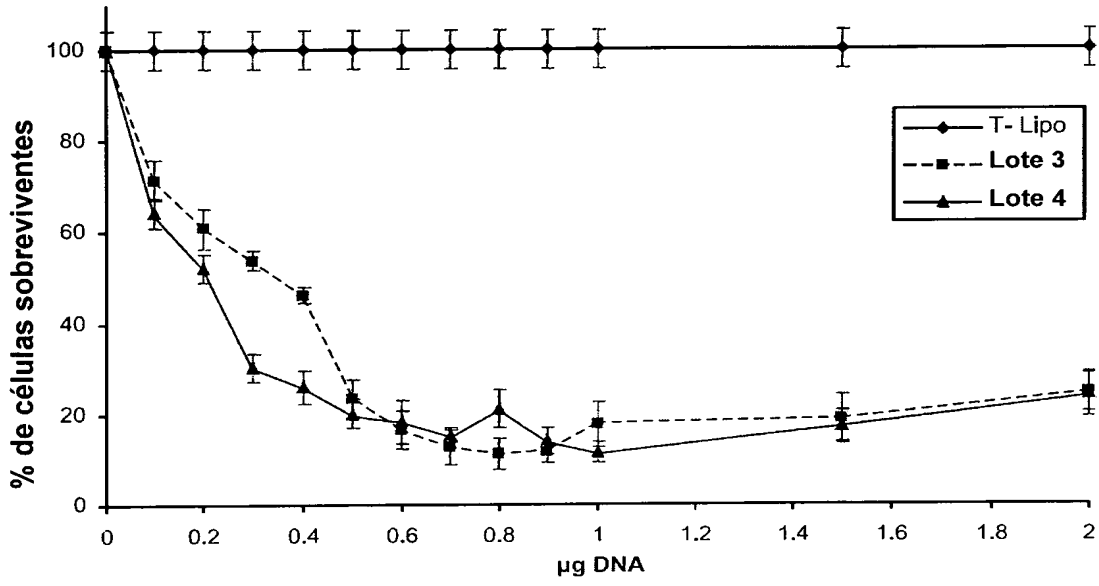


Fig. 17

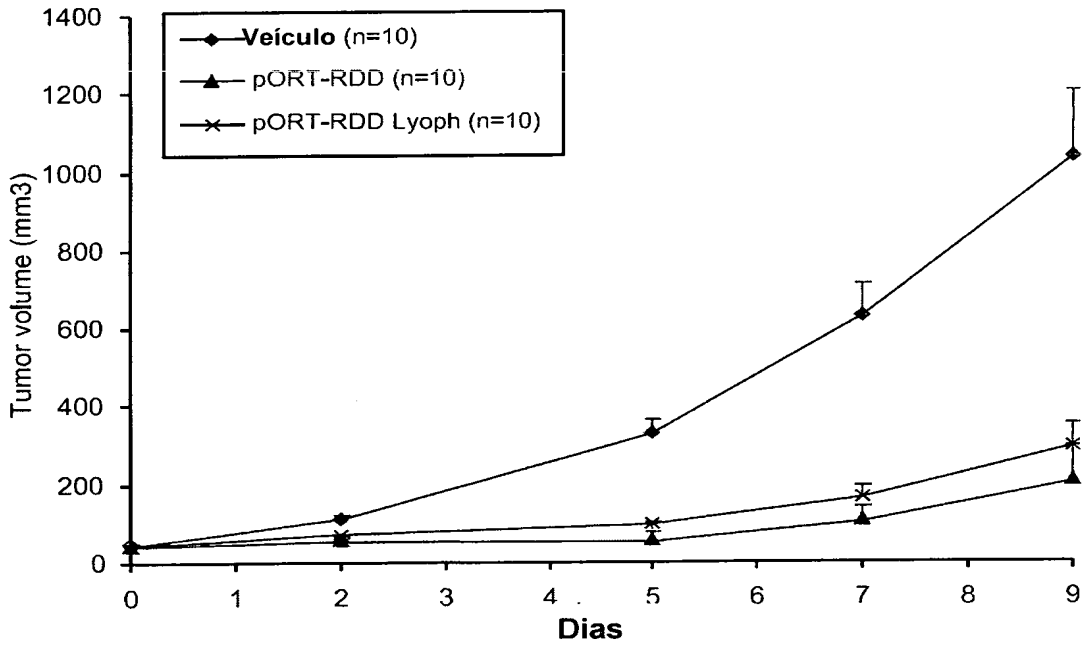


Fig. 18

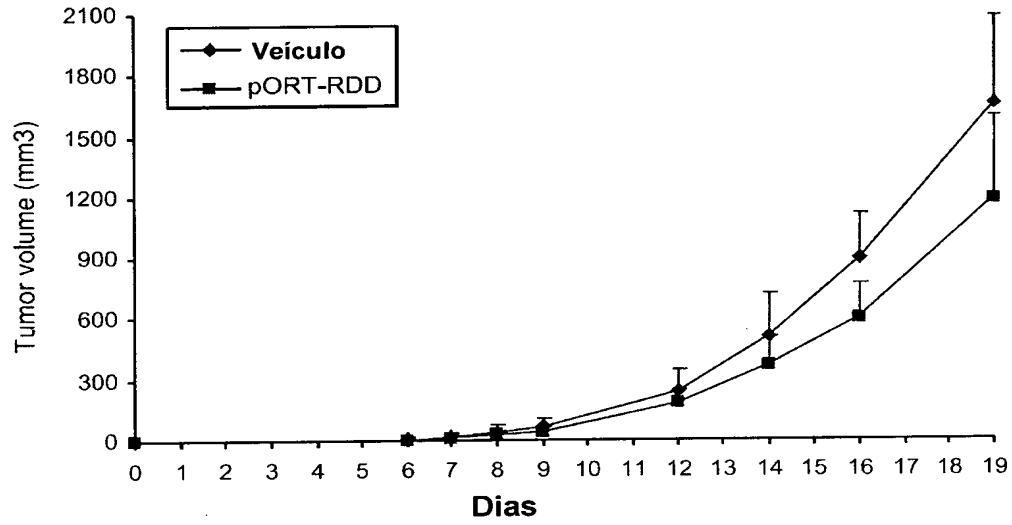


Fig. 19

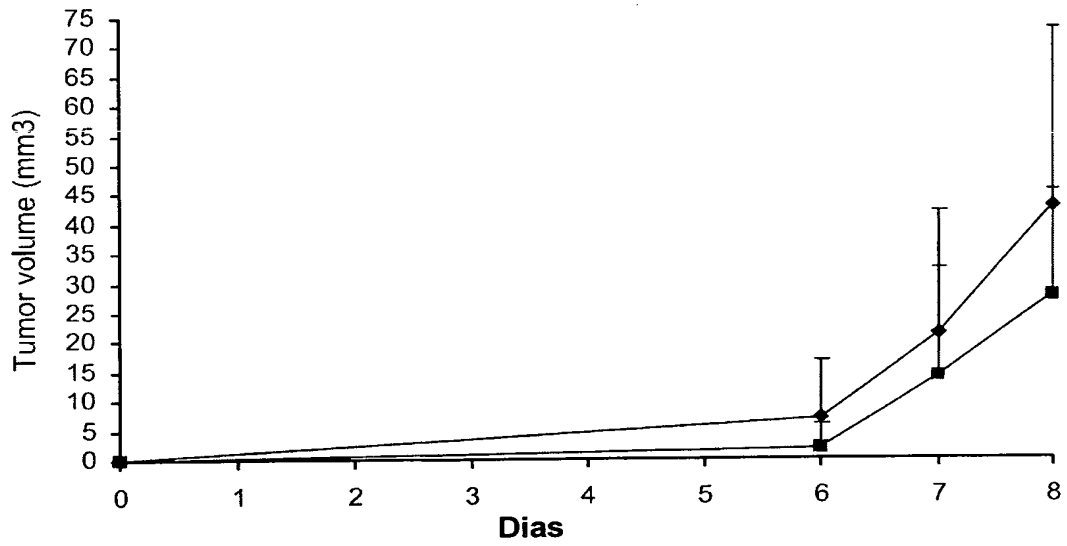


Fig. 20

RESUMO

“PLASMÍDEO pORT, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM PLASMÍDEO pORT-RDD, MÉTODO PARA A PURIFICAÇÃO DO PLASMÍDEO pORT-RDD, MÉTODO PARA A EXPRESSÃO DE PEPTÍDEOS RDD, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM PLASMÍDEO, MÉTODO PARA AVALIAR A POTÊNCIA INIBITÓRIA *IN VITRO* DE UM PLASMÍDEO pORT-RDD E MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DO PLASMÍDEO pORT-RDD LIOFILIZADO”

A presente invenção se refere a um plasmídeo pORT contendo uma seqüência que codifica todo ou parte de um domínio desintegrina de metargidina (RDD) ou um derivado do mesmo sob o controle do promotor de citomegalovírus forte, em especial, um plasmídeo possuindo a seqüência apresentada na SEQ ID No: 2.