



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

(11) PI 0921927-7 B1



(22) Data do Depósito: 20/11/2009

(45) Data de Concessão: 15/06/2021

(54) Título: SENSIBILIZAÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNE

(51) Int.Cl.: A61K 39/00; A61K 39/39; A61K 48/00; C12N 15/62; C07K 19/00.

(30) Prioridade Unionista: 21/11/2008 DK PA 2008 01638.

(73) Titular(es): KØBENHAVNS UNIVERSITET (UNIVERSITY OF COPENHAGEN).

(72) Inventor(es): PETER JOHANNES HOLST; ALLAN RANDRUP THOMSEN; MIRJANA GRUJIC; JAN PRAVSGAARD CHRISTENSEN.

(86) Pedido PCT: PCT DK2009050310 de 20/11/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/057501 de 27/05/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 20/05/2011

(57) Resumo: SENSIBILIZAÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNE. A presente invenção se refere a uma tecnologia e método de sensibilização de uma resposta imune utilizando antígeno ligado a cadeia invariante, quando esses são utilizados para sensibilizar uma imunização de reforço subsequente utilizando qualquer vacina apropriada.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para:
"SENSIBILIZAÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNE".

Todas as referências de patente e não patente citadas no presente pedido são pelo presente incorporadas a título
5 de referência em sua totalidade.

Campo da Invenção

A presente invenção se refere a uma tecnologia e método de sensibilização de uma resposta imune utilizando antígeno ligado por cadeia invariante, quando esses são
10 utilizados para sensibilizar uma imunização de reforço subsequente utilizando qualquer vacina apropriada.

Antecedentes da Invenção

Vacinação é a administração de um material antigênico (uma vacina) a um sujeito para produzir imunidade a uma
15 doença ou condição. Quando utilizada para estimular uma resposta imune, o antígeno é conhecido como imunógeno, e o processo é conhecido como imunização. As vacinações envolvem a administração de um ou mais imunógenos, que podem ser administrados em várias formas.

20 A vacinação requer o estabelecimento de uma resposta imune sólida. A resposta imune que é ativada por infecção ou vacinação depende da interação de vários tipos de célula, como células que apresentam antígeno, T, B, bem como várias moléculas diferentes, antígenos primários,

moléculas de MHC, receptores de células T e B e muito mais.

Vacinas tradicionais ou vacinas de primeira geração se baseiam em cepas patogênicas atenuadas ou mortas. Essas freqüentemente sofrem de infectividade reduzida e são
5 freqüentemente insuficientemente imunogênicas, resultando em proteção inadequada da vacinação.

O desenvolvimento de vacinas de segunda geração, ou vacinas de subunidade, com base em proteínas antigênicas individuais a partir dos organismos patogênicos revelou que
10 peptídeos puros ou carboidratos tendem a serem imunógenos fracos.

Vacinas de DNA, ou vacinas de terceira geração, têm a capacidade de induzir uma faixa mais ampla de tipos de respostas imunes, porém mantém a desvantagem potencial de
15 ter baixa imunogenicidade em seres humanos.

Para todos os tipos de vacinas, programas de vacinação são confrontados com uma necessidade não atendida de potência aumentada de vacina, para superar as limitações mencionadas acima e fornecer um meio mais eficaz em termos
20 de custo de estimular o sistema imune durante vacinação.

A presente invenção é direcionada a resolver o problema associado à baixa imunogenicidade de vacinas por fornecer uma solução para aumentar a potência de vacinas.

A presente invenção é direcionar a resolver o problema

associado à baixa imunogenicidade de vacinas por fornecer uma solução para sensibilização de uma resposta imune.

A presente invenção é desse modo dirigida à sensibilização do sistema imune com um constructo de ácido
5 nucléico que compreende cadeia invariante associada à classe II MHC/CD74 (aqui mencionado como cadeia invariante ou li) ou uma variante do mesmo e codificar pelo menos uma proteína antigênica ou um fragmento da proteína antigênica, seguido por uma vacinação de reforço subsequente para
10 aumentar a potência da vacina.

Vacinas de acordo com a presente invenção podem ser dirigidas a um antígeno patogênico ou um antígeno cancerígeno.

Os dados apresentados aqui mostram que não é direto o
15 desenvolvimento de regimes de reforço de sensibilização utilizando constructos de ácido nucléico que compreendem cadeia invariante ou variante da mesma.

De forma surpreendente, a presente invenção revela que o li-KEY (compreendendo resíduos de aminoácidos LRMK) e/ou
20 parte do domínio li-CLIP a partir da cadeia invariante pode ser alterada sem reduzir os efeitos de sensibilização imune.

Referências do estado da técnica que trataram inadequadamente dessa questão são discutidas abaixo:

WO 2007/062656 (Holst e outros) é dirigida ao desenvolvimento de vacinas de DNA aperfeiçoada para estimular a resposta imune em um modo que aumenta a cinética da resposta, simultaneamente tanto como aumento
5 como aperfeiçoamento da resposta. Holst e outros verificaram que a fusão de um antígeno com a cadeia invariante aumentou dramaticamente as respostas de célula T CD4+ e CD8+ antivirais seguintes através de um mecanismo independente de célula T CD4+.

10 Holmes e outros (J Clin Oncol. 10 de julho de 2008, 26(20): 3426-33) descrevem o primeiro experimento de fase humana I de uma vacina de peptídeo híbrido li-key, em que o li-key compreende a seqüência de quatro aminoácidos LRMK, uma porção central da proteína de cadeia invariante.

15 A descoberta de Kallinteris e outros (Expert Opin. Biol. Ther. 2006, 6(12): 1311, 1321) também é dirigida a utilização da fração li-key compreendendo os aminoácidos LRMK para aumentar a potência da vacina.

US 2008/0095798 (Humphreys e outros) revela um método
20 para aumentar a potência de uma vacina contra um patógeno por primeiramente sensibilizar o sistema imune de um sujeito com um constructo de peptídeo híbrido li-Key compreendendo os resíduos LRMK do peptídeo li-key, e subsequenteiramente administrar uma vacina contra um patógeno

para reforçar a resposta imune criada na etapa de sensibilização.

Sumário da invenção

A presente invenção mostra que a sensibilização do
5 sistema imune com um constructo de ácido nucléico
compreendendo pelo menos uma cadeia invariante associada à
classe I MHC/CD74 (aqui mencionado como cadeia invariante
ou li) ou uma variante do mesmo e codificar pelo menos uma
proteína antigênica ou um fragmento da proteína antigênica,
10 seguido por uma vacinação de reforço subsequente aumenta a
potência da vacina.

Vacinas de acordo com a presente invenção podem ser
dirigidas a um antígeno patogênico ou um antígeno
cancerígeno.

15 De forma surpreendente, a presente invenção revela que
o domínio li-KEY (compreendendo resíduos de aminoácido
LRMK) e/ou parte do domínio li-CLIP pode ser parcialmente
substituído ou omitido da cadeia invariante sem reduzir os
efeitos da sensibilização.

20 Desse modo, a presente invenção resolveu o problema de
estimular adequadamente a resposta imune criada por
vacinação por empregar um regime de reforço de
sensibilização de etapa dual, pelo que o sistema imune é
primeiramente sensibilizado com um constructo de ácido

nucléico que compreende cadeia invariante ou uma vacina do mesmo seguido por vacinação de reforço subsequente utilizando qualquer tipo de vacina apropriada, em um modo que aumenta a cinética da resposta, simultaneamente tanto
5 com aumento como aperfeiçoamento da resposta. Em particular, um sistema novo para uma estimulação dirigida, específica e rápida do sistema imune é pelo presente tornado disponível para aperfeiçoar os regimes de vacinação de todos os animais, como seres humanos.

10 Esse problema é resolvido pelas modalidades da presente invenção caracterizadas nas reivindicações. Pela presente invenção verificou-se que a sensibilização com um constructo de ácido nucléico baseado em cadeia li aumenta significativamente a geração de células T CD8+ específicas
15 de antígeno, células T CD4+ e/ou células B após reforço subsequente com uma vacina.

Desse modo é um aspecto da presente invenção fornecer um constructo de ácido nucléico que compreende seqüências codificando pelo menos uma cadeia invariante ou uma
20 variante do mesmo operativamente ligada a pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo ou um fragmento antigênico da proteína ou peptídeo, em que o constructo de ácido nucléico é capaz de sensibilizar o sistema imune para aumentar a imunização após administração de uma vacina

subseqüente em um sujeito.

A presente invenção em uma modalidade provê um constructo de ácido nucléico que compreende seqüências codificando pelo menos uma cadeia invariante ou variante da
5 mesma operativamente ligada a pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo ou um fragmento antigênico da proteína ou peptídeo, em que o constructo de ácido nucléico é capaz de sensibilizar imunização por administração de uma vacina subseqüente em um sujeito.

10 Em uma modalidade, a cadeia invariante compreendida no constructo de ácido nucléico da presente invenção pode ser alterada de sua seqüência do tipo selvagem sem reduzir o efeito de li.

Desse modo, em uma modalidade, o domínio li-KEY
15 compreendendo os resíduos de aminoácido LRMK foi alterado por deleção ou substituição como mutação.

Em outra modalidade, parte do domínio li-CLIP foi alterada por deleção ou substituição como mutação. O domínio li-CLIP pode ser especificamente alterado por
20 substituir Metionina na posição 91 e 99 para Alanina; isso aumenta surpreendentemente a apresentação de MHCII.

Em outra modalidade li pode ser especificamente alterado por deletar os 17 primeiros aminoácidos de li; isso aumenta surpreendentemente a resposta de memória.

Conclui-se que cada dessas alterações pode ocorrer separadamente ou em combinação.

Em uma modalidade, a cadeia invariante compreendida no constructo de ácido nucléico da presente invenção é alterada de sua seqüência do tipo selvagem quando utilizada para sensibilizar a resposta imune de uma vacina dirigida a um vírus, um microorganismo como uma bactéria ou um parasita.

Em outra modalidade, a cadeia invariante compreendida no constructo de ácido nucléico da presente invenção pode ou não ser alterada de sua seqüência do tipo selvagem quando utilizada para sensibilizar a resposta imune de uma vacina de câncer ou uma vacina dirigida em uma resposta fisiológica anormal.

Em outra modalidade, pelo menos uma parte do constructo de ácido nucléico utilizada para sensibilizar a resposta imune e a vacina subsequente utilizada para reforçar a resposta imune são idênticas. Pelo menos uma parte idêntica do iniciador e reforço pode ser li ou uma variante do mesmo, o peptídeo antigênico ou parte do peptídeo antigênico, ou um epítopo de célula-T auxiliar ubíquo.

É de modo semelhante um objetivo da presente invenção fornecer um veículo de distribuição que compreende o

constructo de ácido nucléico como detalhado aqui, em que o veículo de distribuição é um veículo à base de RNA, um vetor/veículo baseado em DNA, um veículo baseado em lipídeo, um veículo baseado em polímero ou um veículo de
5 RNA ou DNA derivado de modo viral.

Em uma modalidade preferida, o veículo de distribuição compreende a formação de lipossomas, formação de microesferas de polímero biodegradáveis, revestimento do constructo de ácido nucléico sobre partículas de ouro
10 coloidal ou incorporação em um vetor de RNA ou DNA derivado de forma viral.

Ainda em uma modalidade preferida, o constructo de ácido nucléico ou veículo de distribuição é administrado por intermédio de injeção de agulha, pistola de gene,
15 injeção de jato, eletroporação, ultra-som ou distribuição hidrodinâmica.

Desse modo, é um aspecto da presente invenção fornecer um meio de estimular uma resposta imune por um constructo de ácido nucléico que compreende seqüências codificando
20 pelo menos uma cadeia invariante ou variante da mesma operativamente ligada a pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo ou um fragmento antigênico da proteína ou peptídeo.

Um objetivo adicional provê meio de estimular

dispersão intercelular do constructo de ácido nucléico das proteínas codificadas em quaisquer dessas ou quaisquer partes de quaisquer dessas.

É ainda um objetivo da presente invenção fornecer uma
5 proteína quimérica como codificado pelo constructo de ácido nucléico descrita aqui.

É ainda um aspecto da presente invenção fornecer um anticorpo que reconhece a proteína quimérica codificada pelo constructo de ácido nucléico descrito aqui.

10 É um aspecto da presente invenção fornecer um método para aperfeiçoar a potência de uma vacina compreendendo administrar o constructo de ácido nucléico como detalhado aqui.

Especialmente relevante para a presente invenção é um
15 constructo de ácido nucléico que compreende seqüências codificando pelo menos uma cadeia invariante ou variante da mesma operativamente ligada a pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo ou um fragmento antigênico da proteína ou peptídeo que é apropriado para sensibilização
20 de uma resposta imune.

É ainda um aspecto da presente invenção fornecer um kit em partes, o kit compreendendo um constructo de ácido nucléico como descrito aqui juntamente com um instrumento médico ou outro meio de administrar o constructo de ácido

nucléico, e/ou uma vacina apropriada, e instruções adicionais sobre como utilizar o kit em partes.

Conclui-se que a presente invenção provê meio para
potenciar uma resposta imune em um animal, por administrar
5 ao animal um constructo de ácido nucléico como detalhado
abaixo.

Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1: Sensibilização de DNA com uma cadeia li baseada em vacina de DNA nu.

10 Figura 2: localização dos domínios e mutações testadas na seqüência li.

Figura 3: li aumenta dramaticamente a apresentação de superfície de célula do epítopo derivado de OVA H-2kb/SINFEKL.

15 Figura 4: li funciona somente em cis.

Figura 5: deleções e substituições de terminal-N não efetuam capacidade estimuladora li.

Figura 6: deleções e substituições de terminal-C não efetuam capacidade estimuladora li.

20 Figura 7: somente uma deleção de terminal N- e C reduz capacidade estimuladora li.

Figura 8: resposta de dose de vacinas Ad-GP e Ad-liGP.

Figura 9: comparação de Ad-GP, Ad-liGP e Ad-liCLIPGP para apresentação de classe II MHC.

Figura 10: comparação de Ad-GP, Ad-liGP, Ad-GPLamp-1 e Ad-li Δ 17GP em um estudo de curso de tempo in vivo.

Figura 11: comparação de Ad-GP, Ad-liGP, Ad-li Δ 17GP, Ad-liKEYGP, Ad-liCLIPGP, Ad-li1-117GP e Ad-li1-199GP em
5 respostas in vivo.

Figura 12: Ad-GP é capaz de sensibilizar um reforço de Ad-liGP subsequente.

Figura 13: Ad-liGP não é capaz de sensibilizar um reforço Ad-liGP ou Ad-GP subsequente.

10 Figura 14: resposta de dose de vacinas Adli-Gp e Ad-GP.

Figura 15: o receptor de Manose acoplado a uma variante de cadeia invariante compreendendo resíduos 50 a 215 (li50-215), acoplado adicionalmente a uma proteína de
15 fibra adenoviral.

Definições:

Adenovírus: um grupo de vírus contendo DNA de fita dupla. Adenovírus podem ser geneticamente modificados fazendo os mesmos incompetentes de replicação ou
20 incompetentes de replicação condicionalmente. Nessa forma, como constructos adenovirais ou adenovetores, podem ser utilizados como veículos de distribuição de gene para vacinação ou terapia de gene.

Proteína de fibra adenoviral: uma proteína de fibra de qualquer sorotipo de adenovírus. Também é conhecido como knob de fibra adenoviral ou knob de fibra adenoviral com inserções de knob heterólogas.

5 Adjuvante: qualquer substância cuja mistura com um constructo de ácido nucléico / antígeno / determinante imunogênico administrado aumente ou de outro modo modifique a resposta imune ao determinante.

10 Aminoácido: qualquer ácido carboxílico amino de ocorrência natural ou sintética, incluindo qualquer aminoácido que ocorre em peptídeos e polipeptídios incluindo proteínas e enzimas sintetizadas *in vivo* desse modo incluindo modificações dos aminoácidos. O termo aminoácido é aqui utilizado sinonimamente com o termo
15 "resíduo de aminoácido" que pretende abranger aminoácidos como mencionados que foram reagidos com pelo menos outra espécie, como 2, por exemplo, 3, como mais de 3 outras espécies. O termo genérico aminoácido compreende aminoácidos tanto naturais como não naturais quaisquer dos
20 mesmos podem estar na forma isomérica "D" ou "L". aminoácido pode ser abreviado 'aa'.

Anticorpo: moléculas de imunoglobulina e porções ativas de moléculas de imunoglobulina. Anticorpos são, por exemplo, moléculas de imunoglobulina intactas ou fragmentos

das mesmas que retêm a atividade imunológica.

Antígeno: qualquer substância que pode se ligar a um receptor imune distribuído de modo clonal (receptor de célula T ou célula B). normalmente, um peptídeo, 5 polipeptídeo ou um polipeptídeo multimérico. Antígenos são preferivelmente capazes de eliciar uma resposta imune.

Reforço: reforçar por uma dose ou injeção de reforço é dar uma ou mais doses adicionais de um agente de imunização, como uma vacina, dada em um tempo após uma dose 10 inicial de uma substância utilizada para sensibilizar o sistema imune, manter ou aumentar a resposta imune eliciada pela dose anterior do mesmo agente (homólogo) ou outro agente imunizante (heterólogo).

transportador: entidade ou composto ao qual antígenos 15 são acoplados para auxiliar na indução de uma resposta imune.

Proteína quimérica: uma proteína geneticamente construída que é codificada por uma sequência de nucleotídeo feita por uma junção de dois ou mais genes 20 completos ou parciais ou uma série de ácidos nucléicos (não) aleatórios.

Complemento: uma série complexa de proteínas de sangue cuja ação "complementa" o trabalho de anticorpos. Complemento destrói bactérias, produz inflamação e regula

reações imunes.

Citosina: modulador de diferenciação ou crescimento, utilizado não determinativo aqui, e não deve limitar a interpretação da presente invenção e reivindicações. Além
5 das citosinas, moléculas de acessório ou adesão, ou qualquer combinação das mesmas, podem ser empregadas individualmente ou em combinação com as citosinas.

CTL: linfócitos T citotóxicos. Um subgrupo de células T que expressam CD8 juntamente com o receptor de célula T
10 e, portanto capaz de responder a antígenos apresentados por moléculas de classe I.

Veículo de distribuição: uma entidade pelo que uma seqüência de nucleotídeo ou polipeptídio ou ambos pode ser transportado de pelo menos um meio para outro.

15 Fragmento: utilizado para indicar uma parte de comprimento não total de um ácido nucléico ou polipeptídio. Desse modo, um fragmento é ele próprio também um ácido nucléico ou polipeptídio, respectivamente.

Reforço heterólogo ou reforço de sensibilização; em
20 que a substância utilizada para reforçar o sistema imune é diferente da substância anteriormente utilizada para sensibilizar a resposta imune.

Reforço homólogo ou reforço de sensibilização: em que a substância utilizada para reforçar o sistema imune é

igual àquela utilizada anteriormente para sensibilizar a resposta imune.

Indivíduo: qualquer espécie ou subespécie de pássaro, mamífero, peixe, anfíbio, ou réptil, incluindo seres
5 humanos.

Cadeia invariante: uma glicoproteína de proteína de membrana integral que associa com e estabiliza moléculas de MHC II no retículo endoplasmático e compartimentos celulares subsequentes. Aqui o termo cadeia invariante
10 cobre todos os genes homólogos fragmentados ou de comprimento total de ocorrência natural ou artificialmente gerados e proteínas de certa similaridade à cadeia invariante humana. Cadeia invariante é pelo presente abreviada li.

15 Isolado: utilizado com relação a ácidos nucleicos, polipeptídios e anticorpos revelados aqui 'isolado' se refere a esses tendo sido identificados e separados e/ou recuperados de um componente de seu ambiente natural, tipicamente celular. Ácidos nucleicos, polipeptídios e
20 anticorpos da invenção são preferivelmente isolados, e vacinas e outras composições da invenção compreendem preferivelmente ácidos nucleicos isolados, polipeptídios ou anticorpos isolados.

MHC: complexo de histocompatibilidade principal, duas

subclasses principais de MHC, classe I e Classe II existem.

DNA nu: DNA não associado a histonas; freqüentemente DNA rico em CpG e hipometilado. DNA nu pode ser circular ou linear, por exemplo, um plasmídeo circular.

5 Ácido nucléico: uma cadeia ou seqüência de nucleotídeos que transferem informações genéticas. Com relação a presente invenção o ácido nucléico pode ser um ácido desoxirribonucléico (DNA) ou qualquer do grupo que consiste em ácido ribonucléico (RNA), ácido nucléico
10 travado (LNA), ácido nucléico de peptídeo (PNA), ácido nucléico de intercalação (INA), ácido nucléico de intercalação torcido (TINA), ácidos nucléicos de hexitol (NA), ácido arabinonucléico (ANA), ácidos nucléicos de cicloexano (CNA), ácido cicloexenil nucléico (CeNA), ácido
15 nucléico de glicerol (GNA), ácido nucléico de treosila (TNA), Gap-mers, Mix-mers e Morfolinos.

Constructo de ácido nucléico: um ácido nucléico geneticamente construído. Tipicamente compreendendo vários elementos como genes ou fragmentos dos mesmos, promotores,
20 intensificadores, terminadores, caudas poliA, ligadores, poliligadores, ligadores operativos, múltiplos sítios de clonagem (MCS), marcadores, códons de PARADA, outros elementos reguladores, sítios de entrada ribossômica internos (IRES) ou outros.

Ligador operativo: uma seqüência de nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos que ligam juntos duas partes de um polipeptídio (quimérico) ou constructo de ácido nucléico em um modo garantindo o processamento biológico do ácido nucléico ou polipeptídio.

Patógeno: um agente causativo específico de doença, especialmente um agente biológico como um vírus, bactéria, prion ou parasita que pode causar doença a seu hospedeiro, também mencionado como um agente infectivo.

Peptídeo: pluralidade de resíduos de aminoácidos covalentemente ligados definindo uma seqüência e ligado por ligações de amida. O termo é utilizado analogamente com oligopeptídeo e polipeptídio. Os aminoácidos naturais e/ou não naturais podem ser ligados por ligações de peptídeo ou por ligações não peptídeo. O termo peptídeo também abrange modificações pós-tradução introduzidas por reações catalisadas por enzima ou químicas, como são conhecidas na técnica. O termo pode se referir a uma variante ou fragmento de um polipeptídio.

Veículos farmacêuticos: também denominados excipientes, ou estabilizadores são não tóxicos para a célula ou indivíduo sendo exposto aos mesmos nas dosagens e concentrações empregadas. Frequentemente o veículo fisiologicamente aceitável é uma solução tamponada de pH

aquosa. Os exemplos de veículos fisiologicamente aceitáveis incluem tampões como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico; polipeptídio de peso molecular baixo (menor do que 5 aproximadamente 10 resíduos); proteínas, como albumina de soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinil pirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos incluindo glicose, 10 manose, ou dextrinas; agentes de quelação como EDTA; alcoóis de açúcar como manitol ou sorbitol; contra-íons de formação de sal como sódio; e/ou tensoativos não iônicos como TWEEN™, polietileno glicol (PEG) e PLURONICS™.

Pluralidade: pelo menos dois.

15 Sensibilização: sensibilização inicial do sistema imune com, por exemplo, DNA para focalizar a resposta imune no imunógeno exigido.

Reforço de sensibilização: sensibilização inicial do sistema imune com, por exemplo, DNA para focalizar a 20 resposta imune no imunógeno exigido, e reforço subsequente da resposta imune com uma vacina, levando a um aumento na resposta imune induzida pela vacina.

Promotor: um sítio de ligação em uma cadeia de DNA na qual polimerase de RNA se liga para iniciar transcrição de

RNA mensageiro por um ou mais genes estruturais próximos.

Peptídeo de sinal: uma sequência curta de aminoácidos que determina a localização eventual de uma proteína na célula, também mencionado como peptídeo de separação.

5 Vacina apropriada: qualquer vacina para uso de acordo com a presente invenção, capaz de reforçar a resposta imune estimulada pela sensibilização inicial, caracterizada pelo fato de que pelo menos uma parte do constructo de ácido nucléico utilizada para sensibilizar a resposta imune e a
10 vacina subsequente utilizada para reforçar a resposta imune são idênticas. Pelo menos uma parte idêntica do iniciador e do reforço pode ser li ou uma variante da mesma, o peptídeo antigênico ou parte do peptídeo antigênico ou um epítopo de célula-T auxiliar ubíquo.

15 Tensoativo: um agente ativo superficial capaz de reduzir a tensão superficial de um líquido no qual é dissolvido. Também mencionada como uma composição imunogênica no presente texto. Uma resposta imune sendo uma resposta imune (humoral/anticorpo e/ou celular) induzindo
20 memória em um organismo, resultando no agente infeccioso sendo encontrado por uma resposta secundária em vez de primária, desse modo reduzindo seu impacto sobre o organismo hospedeiro. Uma vacina da presente invenção pode ser dada como medicamento profilático e/ou terapêutico. A

composição pode compreender um ou mais dos seguintes: antígeno(s), constructos de ácido nucléico compreendendo um ou mais antígenos operativamente ligados a li, veículos, adjuvantes e veículos farmacêuticos.

5 Variante: uma 'variante' de um ácido nucléico de referência dado ou polipeptídio se refere a um ácido nucléico ou polipeptídio que exhibe certo grau de homologia/identidade de seqüência para o ácido nucléico de referência ou polipeptídio, porém não é idêntico ao ácido
10 nucléico de referência ou polipeptídio.

Domínio, região e motivo podem ser utilizados de forma intercambiável aqui.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção refere-se a um constructo de ácido
15 nucléico que compreende seqüências codificando cadeia invariante ou uma variante da mesma operativamente ligada a pelo menos uma proteína antigênica ou seqüências que codificam peptídeo. O constructo de ácido nucléico é utilizado para sensibilização de uma resposta imune, para
20 potenciar o efeito de uma vacinação de reforço subsequente.

A resposta imune

Vacinas podem ser utilizadas profilaticamente: são dadas antes da ocorrência da infecção efetiva; ou terapeuticamente: onde eliciam ou aceleram uma resposta

imune a um patógeno já no corpo. Os dois métodos de vacinação exigem o estabelecimento de uma resposta imune sólida. A resposta imune que é ativada por infecção ou vacinação depende da interação de vários tipos de células, como células T, B e que apresentam antígeno bem como várias moléculas diferentes, principalmente antígenos, moléculas de MHC, receptores de células T e B e muito mais.

Antígenos são fragmentos de peptídeo apresentados na superfície de células que apresentam antígeno por moléculas de MHC. Antígenos podem ser de origem estrangeira, isto é, patogênica, ou se originam do próprio organismo, denominados auto-antígenos. As moléculas de MHC são representativas de uma família de gene polimorfo codificada por uma região cromossômica específica conhecida como o "complexo de histocompatibilidade principal", conseqüentemente MHC. Duas classes de moléculas MHC existem, MHC classe I (MHC-I) e MHC classe II (MHC-II).

Células auxiliares-T são estimuladas por antígenos apresentados pelas moléculas MHC classe II (MHC-II) residindo na superfície de células que apresentam antígeno. As moléculas de MHC-II são sintetizadas no retículo endoplasmático. Durante síntese, combinam com cadeia invariante (Ii) em um modo que evita que as moléculas MHC-II sejam carregadas com auto-antígenos. A molécula MHC-II é

por seqüências de sinais na cadeia invariante, transportada para a superfície de célula em um compartimento celular específico. À medida que o compartimento amadurece pelo processamento de seu conteúdo, progride de ser um
5 lisossoma, para um endossoma tardio (após fusão com vesículas endocitóticas) para um compartimento MHC classe II (MIIC). A vesícula endocitótica contém antígeno estrangeiro, isto é, fragmentos de peptídeo bacterianos proteoliticamente clivados. Esses fragmentos são por sua
10 degradação preparados para serem carregados sobre a molécula MHC-II. A molécula MHC-II é liberada pela cadeia invariante em um processo de duas partes quando a cadeia invariante primeiramente é degradada proteoliticamente deixando somente um peptídeo denominado CLIP no domínio de
15 ligação MHC-II, em segundo lugar pela remoção de CLIP por uma molécula HLA-DM. A molécula MHC-II é então livre para ligar os antígenos estrangeiros e apresentar esses na superfície da célula após fusão da vesícula MIIC com a membrana de plasma. Isso inicia a resposta imune humoral
20 visto que o antígeno apresentado estimula ativação de uma célula auxiliar-T que por sua vez por vários meios ativar uma célula B, que finalmente diferencia em uma célula de secreção a antígeno.

A resposta imune celular é iniciada quando o receptor

de célula T de células citotóxicas T reconhece antígeno ligado à molécula MHC classe I em uma célula que apresenta antígeno. Moléculas de MHC-I não são associadas a uma molécula de uma funcionalidade como a cadeia invariante que
5 associa a MHC-II. O processamento de MHC-I em uma molécula que apresenta antígeno difere adicionalmente daquele de moléculas MHC-II em que a molécula MHC-I é carregada com antígeno já no retículo endoplasmático. Os antígenos apresentados pela molécula MHC-I são tipicamente fragmentos
10 de peptídeo clivados pela proteassoma de proteínas que foram sintetizadas pela própria célula que apresenta antígeno. Essas proteínas podem ser proteínas anormais codificadas no próprio DNA das células ou proteínas derivadas de vírus ou outros patógenos que infectaram a
15 célula e atuam como parasita em sua maquinaria de síntese de proteína. O sistema proteolítico relacionado à MHC classe I está presente virtualmente em todas as células.

As funções dos dois tipos de células T são significativamente diferentes, como indicado por seus
20 nomes. Células T citotóxicas erradicam patógenos intracelulares e tumores por lise direta de células e por secretar citosinas como γ -interferon. A célula T citotóxica predominante é a célula T CD8+, que também é específica de antígeno. Células T auxiliares podem lisar também células,

porém sua função primária é secretar citosinas que promovem as atividades de células B (células que produzem anticorpo) e outras células T e desse modo aumentam amplamente a resposta imune a antígenos estrangeiros, incluindo
5 mecanismos de resposta mediada por célula T citotóxica e mediada por anticorpo. Células T CD4+ são o principal fenótipo de célula T auxiliar na resposta imune.

Construto de ácido nucléico

Um aspecto da presente invenção refere-se a
10 constructos de ácido nucléico como constructos de DNA nu compreendendo seqüências que codificam pelo menos uma cadeia invariante ou variante da mesma operativamente ligada a pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo ou um fragmento antigênico da proteína ou peptídeo, em resumo
15 um antígeno.

Em uma modalidade, a invenção refere-se a um constructo de ácido nucléico compreendendo seqüências que codificam pelo menos uma cadeia invariante ou variante da mesma operativamente ligada a pelo menos uma proteína
20 antigênica ou peptídeo ou um fragmento antigênico da proteína ou peptídeo, em que a cadeia invariante ou variante da mesma não compreende os resíduos de aminoácido LRMK da região KEY.

Em outra modalidade, a invenção refere-se a um

constructo de ácido nucléico compreendendo seqüências que codificam pelo menos uma cadeia invariante ou variante da mesma operativamente ligada a pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo ou um fragmento antigênico da
5 proteína ou peptídeo, em que a cadeia invariante ou variante da mesma compreende uma variante da região CLIP.

Em outra modalidade, a invenção refere-se a um constructo de ácido nucléico que compreende seqüências codificando pelo menos uma cadeia invariante ou variante da
10 mesma operativamente ligada a pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo ou um fragmento antigênico da proteína ou peptídeo, em que a cadeia invariante ou variante da mesma não compreende os 17 primeiros aminoácidos.

15 Ainda em outra modalidade, a invenção refere-se a um constructo de ácido nucléico que compreende seqüências que codificam pelo menos uma cadeia invariante ou variante da mesma operativamente ligada a pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo ou um fragmento antigênico da
20 proteína ou peptídeo, em que o constructo de ácido nucléico é utilizado para sensibilização de uma vacina de câncer.

Por constructo de ácido nucléico entende-se um ácido nucléico geneticamente construído. O constructo de ácido nucléico pode ser um ácido nucléico linear e de não

replicação, um vetor de expressão circular ou um plasmídeo de replicação autônoma. Um constructo de ácido nucléico pode compreender vários elementos como, porém não limitados a genes ou fragmentos dos mesmos, promotores, 5 intensificadores, terminadores, caudas poli-A, ligadores, poliligadores, ligadores operativos, múltiplos sítios de clonagem (MCS), marcadores, códoms de PARADA, sítios de entrada ribossômica internos (IRES) e seqüências homólogas hospedeiras para integração ou outros elementos definidos. 10 Deve ser entendido que o constructo de ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode compreender todos ou um subconjunto de qualquer combinação dos elementos acima mencionados.

Os métodos para elaborar constructos de ácido nucléico 15 são bem conhecidos no estado da técnica (vide, por exemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook e outros, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 2ª edição, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Além disso, constructos de ácido nucléico de acordo com a presente invenção podem ser 20 sintetizados sem padrão, e podem ser obtidos de vários fornecedores comerciais (Por exemplo, Genscript Corporation).

Os resíduos de ácido nucléico compreendendo o constructo de ácido nucléico podem, em uma modalidade, ser

modificados. A modificação pode ser selecionada do grupo que consiste em: acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, ribosilação, sulfurização e outros.

O constructo de ácido nucléico de acordo com a
5 presente invenção pode, em uma modalidade, ser composto de DNA. Em outra modalidade, o constructo de ácido nucléico pode ser composto de um ácido nucléico selecionado do grupo que consiste em ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA), ácido nucléico fechado (LNA), ácido
10 nucléico de peptídeo (PNA), ácido nucléico de intercalação (INA), ácido nucléico de intercalação torcido (TINA), ácidos nucléicos de hexitol (NA), ácido arabinonucléico (ANA), ácidos nucléicos de cicloexano (CNA), ácido cicloexenil nucléico (CeNA), ácido nucléico de glicerol
15 (GNA), ácido nucléico de treosila (TNA), Gap-mers, Mix-mers e Morfolinos.

Como discutido acima, moléculas MHCII são associadas à cadeia invariante durante processamento, até que a cadeia invariante associada seja degradada para permitir
20 carregamento de peptídeos antigênicos estrangeiros sobre as moléculas de MHCII. Ao aplicar um constructo de proteína "externa" compreendendo cadeia invariante - ligador - epítipo, em que a cadeia invariante compreende a região KEY (compreendendo resíduos de aminoácido LRMK), o constructo

de proteína interagirá com a molécula MHCII - contendo um antígeno - em um ponto quando a molécula MHCII é localizada na superfície extracelular da célula. Portanto, o efeito é externo e depende da capacidade do resíduo-KEY de cadeia

5 invariante do constructo de proteína (compreendendo resíduos de aminoácido LRMK) para competir pelo carregamento sobre as moléculas MHCII. Em outras palavras, o antígeno já carregado sobre a molécula MHCII durante processamento intracelular deve ser 'despejado' ou removido

10 da molécula MHCII na superfície celular e substituído pelo constructo de proteína compreendendo cadeia invariante - ligador - epítipo. Isso fornece um efeito '1:1' que não pode ser amplificado, e é invariavelmente dependente da presença dos resíduos de aminoácido LRMK a partir da cadeia

15 invariante.

O constructo de ácido nucléico de acordo com a presente invenção refere-se à aplicação de um constructo de ácido nucléico 'interno' codificando cadeia invariante ou uma variante do mesmo e também codificando um peptídeo

20 antigênico ou epítipo, isto é, o constructo de ácido nucléico é transfectado no espaço intracelular de células em um sujeito. O constructo de ácido nucléico utilizará a máquina de tradução celular para produzir um produto de cadeia invariante - ligador - epítipo ou cadeia invariante

- epítopo que interagirá com a molécula MHCII ou a molécula MHCI - não contendo um antígeno - em um ponto em que a molécula MHC é localizada dentro da célula, como em um endossoma ou MIIC. Portanto, o efeito é interno e não
5 depende da capacidade do domínio KEY de cadeia invariante do constructo de proteína (compreendendo resíduos de aminoácidos LRMK) competir para carregamento sobre as moléculas MHC. Realmente, o efeito não depende da presença da região li-KEY e seus resíduos LRMK. Além disso, isso
10 fornece um efeito que pode ser amplificado, em que um constructo de ácido nucléico pode originar mais de um produto.

O uso 'interno' de um constructo de ácido nucléico tem várias vantagens em relação ao uso 'externo' de um
15 constructo de proteína, como detalhado acima: 1) amplificação; introdução de uma pequena quantidade do constructo de ácido nucléico origina muitos produtos que podem todos se ligar às moléculas MHC, que também pode ser amplificada secundariamente em que os produtos ligados a
20 MHC podem ser adicionalmente reciclados por internalização para aumentar finalmente sua exibição, 2) o uso do próprio sistema de processamento de antígeno das células assegura ligação correta e justa do epítopo à molécula MHC, 3) não há exigência para os resíduos LRMK da região li-KEY e o

domínio li-CLIP nativo.

Otimização de códon e seqüências de ácido nucléico degenerado

A expressão de proteínas funcionais em hospedeiros
5 heterólogos é à base de biotecnologia moderna. Infelizmente, muitas proteínas são difíceis de expressa fora de seus contextos originais. Podem conter elementos reguladores que limitam expressão, vir de organismos que utilizam códigos de nucleotídeo não canônicos ou cheio de
10 gene com códons raramente utilizados no hospedeiro desejado. Os aperfeiçoamentos na velocidade e eficiência de síntese de gene tornaram exequível o redesenho de gene completo para expressão máxima de proteína. Por exemplo, a expressão de proteína pode melhorar dramaticamente quando a
15 freqüência de códon do gene em estudo é casada com aquela do sistema de expressão de hospedeiro. Por exemplo, uma estratégia de redesenho pode incluir não somente o uso de polarizações de códon ótimas, porém também a alteração de elementos estruturais de mRNA e a modificação de regiões de
20 tradução e iniciação. As técnicas para otimização de códon são conhecidas por pessoa versada na arte, e podem ser executadas por fornecedores comerciais como GenScript Corporation.

Entende-se que o constructo de ácido nucléico

compreendendo cadeia invariante ou uma variante da mesma de acordo com a presente invenção pode ser otimizado em códon de algum modo de modo a produzir - por tradução na proteína, isto é, aminoácidos - uma seqüência de aminoácido

5 compreendendo uma cadeia invariante que corresponde à seqüência de aminoácidos revelada na SEQ ID NO: 2 (li humano), ou variantes da mesma de acordo com a presente invenção.

De modo semelhante, o constructo de ácido nucléico

10 compreendendo cadeia invariante de acordo com a presente invenção pode ser otimizado em códon de algum modo de maneira a produzir - por tradução para proteína, isto é, aminoácidos - uma seqüência de aminoácidos compreendendo uma cadeia invariante que corresponde à seqüência de

15 aminoácidos de qualquer animal no qual o constructo de ácido nucléico pode ser utilizada para sensibilizar uma resposta imune; incluindo qualquer vertebrado, mamífero, peixe ou pássaro; ou variantes dos mesmos de acordo com a presente invenção.

20 *Polarização de códon:* polarização de códon foi identificada como o fator mais importante único em expressão de gene procariótico. O grau no qual um dado códon aparece no código genético varia significativamente entre organismos, entre proteínas expressas em níveis

elevado e baixo e mesmo entre porções diferentes do mesmo operon. O motivo para isso é quase certamente porque códons preferidos correlacionam com a abundancia de tRNAs cognatos disponíveis na célula. Essa relação serve para otimizar o sistema de tradução e equilibrar a concentração de códon com concentração de tRNA isoacceptor.

Substituir códons utilizados não freqüentemente: em geral, os códons mais raros que um gene contém, menos provável é que a proteína heteróloga será expressa em um nível razoável naquele sistema hospedeiro específico. Esses níveis se tornam ainda mais baixos se os códons raros aparecerem em clusters ou na porção terminal-N da proteína. A substituição de códons raros com outros que refletem mais estreitamente a polarização de códon do sistema hospedeiro sem modificar a seqüência de aminoácidos pode aumentar os níveis de expressão de proteína funcional.

Eliminar códons problemáticos: qualquer códon que um organismo utiliza menor do que 5% a 10% do tempo pode causar problemas, independente de onde o mesmo é. Novamente, códons próximos ou adjacentes podem ter mais efeito sobre a expressão de proteína do que poderiam separadamente. A eliminação de códons raros e códons que podem ser lidos como sinais de terminação pode evitar casos de expressão baixa ou não existente.

Expressar proteínas virais em hospedeiros mamíferos:

mesmo genes virais podem ser expressos com sucesso em linhagens de células de mamíferos se o gene for adequadamente preparado. As cargas de informações densas de genes virais resultam freqüentemente em quadros de leitura de sobreposição. Muitos genes virais também codificam seqüências reguladoras negativas de atuação cis na seqüência de codificação genes virais podem ser sintetizados novamente não somente para expressar a proteína desejada como também para romper elementos reguladores, desse modo aumentando a produção de proteína. A otimização de códon viral é especialmente útil em pesquisa de vacina de DNA porque aumenta a imunogenicidade do alvo.

Outras limitações: embora polarização de códon desempenhe um grande papel em expressão de gene, a escolha de vetores de expressão e promotores de transcrição também é importante. As seqüências de nucleotídeos que circundam a região de terminal-N da proteína são particularmente sensíveis, tanto em relação à presença de códons raros como às identidades dos códons imediatamente adjacentes a AUG de iniciação. Há também certa interação entre tradução e estabilidade de mRNA.

Degeneração do código genético

Conclui-se a partir do acima que o código genético tem redundância porém sem ambigüidade. Por exemplo, embora códons GAA e GAG ambos especifiquem ácido glutâmico (redundância), nenhum deles especifica qualquer outro aminoácido (sem ambigüidade) (vide a tabela de códons abaixo para a correlação completa). Os códons que codificam um aminoácido podem diferir em qualquer de suas três posições. A degeneração do código genético é o que é responsável pela exigência de mutações silenciosas. A degeneração resulta porque um código triplo de quatro bases designa 20 aminoácidos e um códon de parada.

Ala/A	GCU, GCC, GCA, GCG	Leu/L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Arg/R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	Lys/K	AAA, AAG
Asn/N	AAU, AAC	Met/M	AUG
Asp/D	GAU, GAC	Phe/F	UUU, UUC
Cys/C	UGU, UGC	Pro/P	CCU, CCC, CCA, CCG
Gln/Q	CAA, CAG	Ser/S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Glu/E	GAA, GAG	Thr/T	ACU, ACC, ACA, ACG
Gly/G	GGU, GGC, GGA, GGG	Trp/W	UGG

His/H	CAU, CAC	Tyr/Y	UAU, UAC
Ile/I	AUU, AUC, AUA	Val/V	GUU, GUC, GUA, GUG
PARTIDA	AUG	PARADA	UAG, UGA, UAA

A tabela mostra os 20 aminoácidos, códons de partida e parada e os 64 códons possíveis. A direção do mRNA é 5' a 3'.

Substituição sinônima

5 Mutações ou substituições silenciosas são mutações de DNA que não resultam em uma alteração na sequência de aminoácidos de uma proteína. Podem ocorrer em uma região não codificação (fora de um gene ou em um intron), ou podem ocorrer em um exon em um modo que não altera a sequência de aminoácidos final. A frase substituição ou mutação silenciosa é freqüentemente utilizada de forma intercambiável com a substituição ou mutação sinônima de frase; entretanto, mutações ou substituições sinônimas são uma subcategoria do anterior, ocorrendo somente em exons.

15 Entende-se que o constructo de ácido nucléico compreendendo cadeia invariante ou um variante da mesma de acordo com a presente invenção pode compreender uma substituição sinônima de modo a produzir - por tradução em proteína, isto é, aminoácidos - uma sequência de aminoácido que compreende uma cadeia invariante que corresponde à

seqüência de aminoácidos revelada na SEQ ID NO: 2 (li humano) ou variantes da mesma de acordo com a presente invenção.

De modo semelhante, o constructo de ácido nucléico
5 compreendendo cadeia invariante de acordo com a presente invenção pode compreender uma substituição sinônima de modo a produzir - por tradução em proteína, isto é, aminoácido s- uma seqüência de aminoácido que compreende uma cadeia invariante que corresponde à seqüência de aminoácidos de
10 qualquer animal no qual o constructo de ácido nucléico pode ser utilizado para sensibilizar uma resposta imune; incluindo qualquer vertebrado, mamífero, peixe ou pássaro; ou variantes dos mesmos de acordo com a presente invenção.

Substituição não sinônima em aminoácidos sinônimos

15 Uma substituição não sinônima causa alteração no aminoácido. Entretanto, aminoácidos são agrupados de acordo com as propriedades do aminoácido, e a substituição de um aminoácido com outro aminoácido pode não ter impacto da função ou propriedades da proteína compreendendo o
20 aminoácido se a substituição resultar em um aminoácido sinônimo. Tais substituições podem ser indicadas mutação ou substituição conservativa: uma alteração em uma seqüência de RNA ou DNA que leva à substituição de um aminoácido com um bioquimicamente similar.

Desse modo é entendido que o constructo de ácido nucleico compreendendo cadeia invariante ou uma variante da mesma de acordo com a presente invenção pode compreender uma substituição não sinônima de modo a produzir - por
5 tradução em proteína, isto é, aminoácidos - uma sequência de aminoácido compreendendo uma variante de cadeia invariante, em que a substituição não sinônima resulta na substituição de um ou mais aminoácidos que são sinônimos.

Substituições sinônimas podem compreender substituição
10 de um aminoácido hidrofóbico com outro aminoácido hidrofóbico; substituição de um aminoácido hidrofílico com outro aminoácido hidrofílico; substituição de um aminoácido polar com outro aminoácido polar; substituição de um aminoácido não polar com outro aminoácido não polar;
15 substituição de um aminoácido positivamente carregado com outro aminoácido positivamente carregado; substituição de um aminoácido negativamente carregado com outro aminoácido negativamente carregado; substituição de um aminoácido neutro com outro aminoácido neutro; substituição de um
20 aminoácido ambíguo com seu aminoácido carregado ambíguo de cópia como isoleucina e leucina, asparagina e ácido aspártico e glutamina e ácido glutâmico; substituição de um aminoácido aromático com outro aminoácido aromático; substituição de um aminoácido alifático com outro

aminoácido alifático; ou a substituição de qualquer aminoácido com alanina. Essas substituições podem ser indicadas substituição de valor igual.

Variantes de junção

5 A junção alternativa é o mecanismo de variação de junção de RNA no qual os exons do transcrito de gene primário, o pré-mRNA, são separados e reconectados de modo a produzir arranjos de ribonucleotídeo alternativos. Essas combinações lineares são então submetidas ao processo de
10 tradução onde seqüências específicas e exclusivas de aminoácidos são especificadas, resultando em proteínas de isoforma ou variantes de junção. Desse modo, a junção alternativa utiliza expressão genética para facilitar a síntese de maior variedade de proteínas. Em eucariotas, a
15 junção alternativa é uma etapa importante em direção à eficiência mais elevada, porque as informações podem ser armazenadas muito mais economicamente. Várias proteínas podem ser codificadas em uma seqüência de DNA cujo comprimento seria somente o suficiente para duas proteínas
20 no modo de codificação de procariota.

O constructo de ácido nucléico da presente invenção pode, em uma modalidade, ser projetado de modo a originar múltiplos peptídeos antigênicos de fragmentos de peptídeos antigênicos e/ou múltiplas cadeias invariantes ou variantes

dos mesmos.

Em uma modalidade, o constructo de ácido nucléico de acordo com a presente invenção compreende pelo menos 1, como 2, por exemplo 3, como 4, por exemplo 5, como 6, por exemplo 7, como 8, por exemplo 9, como 10, por exemplo 11, como 12, por exemplo 13, como 14, por exemplo 15, como 16, por exemplo 17 como 18, por exemplo 19, como 20 variantes de junção de um peptídeo antigênico ou um fragmento do peptídeo antigênico.

10 Mais de uma variante de junção de peptídeo antigênico pode abranger peptídeos antigênicos idênticos ou não idênticos.

Em outra modalidade, o constructo de ácido nucléico de acordo com a presente invenção compreende pelo menos 1, como 2, por exemplo 3, como 4, por exemplo 5, como 6, por exemplo 7, como 8, por exemplo 9, como 10, por exemplo 11, como 12, por exemplo 13, como 14, por exemplo 15, como 16, por exemplo 17 como 18, por exemplo 19, como 20 variantes de junção de cadeia invariante ou variantes da mesma.

20 Mais de uma variante de junção de cadeia invariante pode abranger cadeia invariante idêntica ou não idêntica ou variantes da mesma.

Em uma modalidade, pelo menos uma variante de junção de cadeia invariante compreende cadeia invariante de

comprimento total nativo. Em outra modalidade, pelo menos uma variante de junção de cadeia invariante compreende uma variante de cadeia invariante. Ainda em outra modalidade, pelo menos uma variante de junção de cadeia invariante
 5 compreende uma variante de cadeia invariante em que li não compreende os resíduos de aminoácidos LRMK da região li-KEY. Em outra modalidade, pelo menos uma variante de junção de cadeia invariante compreende uma variante de cadeia invariante em que li não compreende os resíduos M91 e M99
 10 do domínio CLIP.

Conclui-se que a variante de junção pode compreender qualquer combinação de peptídeos antigênicos idênticos ou não idênticos e/ou cadeia invariante idêntica ou não idêntica ou variantes da mesma.

15 Desse modo é possível 'embaralhar' seqüências (exons) compreendendo domínios ou regiões diferentes de cadeia invariante, de modo a obter variantes de cadeia invariante por junção alternativa. Desse modo também é possível 'embaralhar' seqüências (exons) compreendendo domínios ou
 20 regiões diferentes do(s) peptídeo(s) antigênico(s), de modo a obter variantes do(s) peptídeo(s) antigênico(s) por junção alternativa.

Cadeia invariante

A cadeia invariante (li) ou cadeia invariante

associada à MHC classe II ou CD74 ou p31, é uma proteína de membrana integral do tipo não polimórfica II, vide as SEQ ID Nos: 2 e 4 para as seqüências de aminoácidos de li de ser humano e camundongo, respectivamente. Cadeia invariante
5 tem múltiplas funções em maturação de linfócito e em respostas imunes adaptáveis, em particular alvejar compartimentos lisossomais onde a seqüência CLIP li pode ocupar moléculas de MHC classe II até serem fundidas com compartimentos endossomais Pieters J. 1997, Curr. Opin.
10 Immunol., 9:8996). Adicionalmente, foi mostrado como funcionando como um companheiro MHC de classe I (Morris e outros, 2004, Immunol. Res. 30:171-179) e por sua seqüência de alvejar endossomal, para facilitar a proliferação de células T-CD4+, porém não CD8+ dirigidas contra antígeno
15 ligado de forma covalente (Diebold e outros, 2001, Gene Ther. 8:487-493).

A proteína de cadeia invariante compreende vários domínios: um domínio citosólico que inclui um peptídeo de separação ou sinal (também conhecido como a seqüência de
20 alvejar lisossomal), um domínio de transmembrana, e um domínio luminal que ele próprio compreende uma região CLIP, região KEY (compreendendo os resíduos LRMK), domínio de núcleo e domínio de trimerização. Esses dois domínios são flanqueados por regiões altamente flexíveis (Strumptner-

Cuvelette & Benaroch, 2002, Biochem. Biophys. Acta., 1542:1-13). A cadeia invariante foi caracterizada em vários organismos, incluindo vertebrados (por exemplo, galinha), mamíferos (por exemplo, vaca, cão, camundongo e rato) e ser
5 humano.

A presente invenção refere-se a constructos de ácido nucléico compreendendo seqüências em que pelo menos uma cadeia invariante ou variante da mesma é específica de organismo ou pode ser relacionada a um organismo
10 específico, preferivelmente, pelo menos uma cadeia invariante é de origem vertebrada, mais preferivelmente de origem mamífera e mais preferivelmente de origem humana. Em relação ao presente a seqüência definida por SEQ ID NO: 1 é a seqüência de ácido nucléico da cadeia invariante de ser
15 humano. Em outra modalidade preferida, pelo menos uma cadeia invariante é de origem aviária, mais preferivelmente de Gallus gallus domesticus (galinha). Ainda em outra modalidade preferida, pelo menos uma cadeia invariante é derivada de peixe, mais preferivelmente de peixe que pode
20 ser cultivado em uma fazenda de criação de peixe (como salmão ou truta). Ainda em outra modalidade preferida, pelo menos uma cadeia invariante é derivada de um furão.

A cadeia invariante empregada é preferivelmente a cadeia invariante do organismo que deve receber o

constructo de ácido nucléico. É um objetivo da presente invenção que a cadeia invariante e os organismos hospedeiros ou receptores do tratamento sejam da mesma espécie.

5 Em uma modalidade da invenção, o constructo de ácido nucléico compreendendo pelo menos uma cadeia invariante ou variante da mesma com a condição de que quando o constructo de ácido nucléico compreende uma variante de pelo menos uma cadeia invariante, a cadeia invariante não compreende os
10 resíduos de aminoácidos LRMK da sequência li-KEY.

 Em outra modalidade da invenção, o constructo de ácido nucléico compreendendo pelo menos uma cadeia invariante ou variante da mesma é com a condição de que quando o constructo de ácido nucléico compreende uma variante de
15 pelo menos uma cadeia invariante, a cadeia invariante compreende uma variante do domínio li-CLIP. A variante é em uma modalidade uma substituição de metionina em posições 91 e 99 com outro aminoácido. A variante é em outra modalidade uma mutação de ponto M91A M99A dupla (substituição do
20 aminoácido metionina para alanina nas posições 91 e 99).

 Em outra modalidade, a variante li é uma deleção dos
17 primeiros aminoácidos de li ($\Delta 17li$).

 Em uma terceira modalidade, a variante li compreende tanto uma substituição de metionina nas posições 91 e 99

como uma relação dos 17 primeiros aminoácidos de li.

Os inventores descobriram surpreendentemente que os
resíduos LRMK se o domínio li-KEY não são essenciais para
sensibilização de uma resposta imune de acordo com a
5 presente invenção.

Além disso, os inventores verificaram
surpreendentemente que a substituição de metionina nas
posições 91 e 99 deli aumenta a apresentação de MHCII.

Adicionalmente, os inventores verificaram que a
10 deleção dos 17 primeiros aminoácidos de li aumenta
surpreendentemente a resposta da memória.

Os inventores verificaram ainda que uma parte central
da cadeia invariante compreendendo resíduos número 50 a 118
é essencial para obter o efeito total da mesma. Essa
15 variante de li não tem um domínio de trimerização. Desse
modo, em uma modalidade o constructo de ácido nucléico
compreende pelo menos uma cadeia invariante ou variante da
mesma em que a cadeia invariante compreende resíduos de
aminoácidos número 50 a 118 acoplados a um domínio de
20 trimerização de outra proteína. A outra proteína pode ser,
por exemplo, uma proteína bacteriana ou uma proteína de
fibra adenoviral.

A presente invenção também se refere a um constructo
de ácido nucléico em que pelo menos uma cadeia invariante

codificada é um fragmento da sequência identificada na SEQ ID NO: 2 de pelo menos 40 aminoácidos e de pelo menos 85% de identidade do mesmo fragmento de SEQ ID NO: 2.

O fragmento é um fragmento de pelo menos 40 aminoácidos de qualquer parte da cadeia invariante como exposto na SEQ ID NO: 2. Isso inclui um fragmento incluindo resíduos 1 a 40, 10 a 50, 20 a 60, 25 a 65, 30 a 70, 35 a 75, 40 a 80, 45 a 85, 50 a 90, 55 a 95, 60 a 100, 65 a 105, 70 a 110, 75 a 115, 80 a 120, 85 a 125, 90 a 130, 95 a 135, 100 a 140, 105 a 145, 110 a 150, 115 a 155, 120 a 160, 125 a 165, 130 a 170, 135 a 175, 140 a 180, 145 a 185, 150 a 190, 155 a 195, 160 a 200, 165 a 205, 170 a 210 e 175 a 216. Também inclui fragmentos como qualquer dos acima listados expandindo até 5 resíduos para qualquer lado do presente. Inclui ainda fragmento de pelo menos 50 resíduos, de pelo menos 60 resíduos, de pelo menos 70 resíduos, de pelo menos 80 resíduos, de pelo menos 90 resíduos, de pelo menos 100 resíduos, de pelo menos 110 resíduos, de pelo menos 120 resíduos, de pelo menos 130 resíduos, de pelo menos 140 resíduos, de pelo menos 150 resíduos, de pelo menos 160 resíduos, de pelo menos 170 resíduos, de pelo menos 180 resíduos, de pelo menos 190 resíduos, de pelo menos 200 resíduos e de pelo menos 210 resíduos.

Quaisquer dos fragmentos descritos acima de pelo menos

85% de identidade de sequência, por exemplo, pelo menos 91% de identidade de sequência, como pelo menos 92% de identidade de sequência, por exemplo, pelo menos 93% de identidade de sequência, como pelo menos 94% de identidade de sequência, por exemplo, pelo menos 95% de identidade de sequência, como pelo menos 96% de identidade de sequência, por exemplo pelo menos 97% de identidade de sequência, como pelo menos 98% de identidade de sequência, por exemplo 99% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 2 são incluídos no escopo da presente invenção.

A identidade/homologia entre sequências de aminoácidos pode ser calculado utilizando matrizes de marcação bem conhecidas como qualquer uma de BLOSUM 30, BLOSUM 40, BLOSUM 45, BLOSUM 50, BLOSUM 55, BLOSUM 60, BLOSUM 62, BLOSUM 65, BLOSUM 70, BLOSUM 75, BLOSUM 80, BLOSUM 85, e BLOSUM 90.

Em uma modalidade a presente invenção é um constructo de ácido nucléico em que pelo menos uma cadeia invariante codificada é um fragmento de SEQ ID NO: 2 de pelo menos 186 aminoácidos. Isso inclui quaisquer dos fragmentos como definido acima, e que desse modo partilham identidade com a sequência da cadeia invariante de SEQ ID NO: 2.

A presente invenção refere-se ainda a um constructo de ácido nucléico em que pelo menos uma cadeia invariante

codificada é pelo menos 85% idêntica à SEQ ID NO: 2.

Isso abrange que qualquer seqüência derivada da cadeia invariante como colocada na SEQ ID NO:2 de pelo menos 85% de identidade de seqüência, por exemplo pelo menos 90% de
5 identidade de seqüência, por exemplo pelo menos 92% de identidade de seqüência, como pelo menos 92% de identidade de seqüência, por exemplo pelo menos 93% de identidade de seqüência, como pelo menos 94% de identidade de seqüência, por exemplo pelo menos 95% de identidade de seqüência, como
10 pelo menos 96% de identidade de seqüência, por exemplo pelo menos 97% de identidade de seqüência, como pelo menos 98% de identidade de seqüência, por exemplo 99% de homologia de seqüência com SEQ ID NO: 2 são incluídos no escopo da presente invenção. Isso inclui seqüências que são mais
15 longas ou mais curtas do que a seqüência descrita na SEQ ID NO: 2.

Quaisquer das seqüências descritas acima independente de origem, identidade de seqüência ou comprimento são daqui em diante denominados variantes de cadeia invariante.

20 Conclui-se que está compreendido no escopo da presente invenção que uma variante de cadeia invariante de qualquer organismo pode ser uma variante de acordo com o acima, isto é, que a variante pode ser alterada na região li-KEY e/ou ser alterada na região li-CLIP e/ou ser um fragmento da

cadeia invariante de um organismo e/ou ser pelo menos 85% idêntico à cadeia invariante sobre toda a sequência da cadeia invariante ou no fragmento da mesma. A cadeia invariante também pode ser de uma espécie relacionada de organismos ou ser de uma espécie distantemente relacionada.

Outro aspecto da presente invenção refere-se à adição, remoção ou substituição de regiões, peptídeos ou domínio de pelo menos uma cadeia invariante como codificado pelo constructo de ácido nucléico. A remoção de uma ou mais dessas regiões, peptídeos ou domínios truncará a cadeia invariante resultante. A adição ou substituição de uma região, peptídeo ou domínio inclui as opções de escolher essas sequências de fontes conhecidas como proteínas ou polipeptídios de ocorrência natural ou de polipeptídios artificialmente sintetizados ou resíduos de ácido nucléico que codificam os mesmos. A adição de regiões, domínio ou peptídeos inclui a opção de adicionar um, dois ou mais de cada tipo ou de tipos diferentes de regiões, domínios, peptídeos e um, dois, três ou mais dos ácidos nucléicos que codificam essas regiões, domínios e peptídeos. Esses podem ser idênticos ou diferir entre si com base na sequência. As regiões, peptídeos e domínios não necessitam se originar do mesmo organismo como a cadeia invariante de armação.

A remoção de regiões, domínios ou peptídeos inclui a

opção de remover um, dois, três ou mais de cada tipo ou de tipos diferentes de regiões, domínios, peptídeos e remover um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze, quinze, dezesseis, dezessete,

5 dezoito, dezenove, vinte ou mais dos resíduos de aminoácidos codificando essas regiões, domínios e peptídeos. É bem conhecido do estado da técnica a execução de adições, deleções e substituições de individuais bem como trechos de nucleotídeos que codificarão o polipeptídio
10 resultante.

O alinhamento de ácido nucléico e especialmente seqüências de proteína de genes homólogos ou proteínas de organismos diferentes pode ser de grande auxílio ao determinar quais substituições, deleções, rearranjos ou
15 outras alterações seriam vantajosas para constructo. O alinhamento de seqüências de cadeia invariante humanas e de murinos como ilustrado abaixo, fornece uma indicação de quais resíduos de aminoácidos podem ser de importância para a estrutura e função da cadeia invariante nesses organismos
20 - esses são os resíduos que são conservados entre as duas seqüências. De modo semelhante, os resíduos presumivelmente

variantes. Ao tentar mudar ou deletar ou de outro modo alterar a seqüência, por exemplo, de cadeia invariante humana para aperfeiçoar sua capacidade de estimular resposta imune, pode ser também relevante examinar os
 5 resíduos conservados e fazer, por exemplo, substituições homólogas (isto é, substituições onde os aminoácidos são considerados como sendo, por exemplo, da mesma qualidade estrutural, polaridade, hidrofobicidade ou outro).

Os resíduos de aminoácidos LRMK das regiões KEY são
 10 sublinhados no alinhamento abaixo da proteína de cadeia invariante derivada de ser humano e camundongo.

humano	1	MDDQ	RD	LIS	NNE	Q	L	P	M	L	G	R	R	P	G	A	P	E	S	K	C	S	R	G	A	L	Y	T	G	F	S	I	L	V	T	L	L	L	A	G	Q	A	T	T	A	Y	F	L	Y	Q	Q	Q	G								
murino	1	MDDQ	RD	LIS	N	H	E	Q	L	P	I	L	G	N	R	P	R	E	P	E	-	R	C	S	R	G	A	L	Y	T	G	V	S	V	L	V	A	L	L	L	A	G	Q	A	T	T	A	Y	F	L	Y	Q	Q	Q	G						
humano	61	R	L	D	K	L	T	V	T	S	Q	N	L	Q	L	E	N	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>M</u>	<u>K</u>	L	P	K	P	P	K	P	V	S	K	M	R	M	A	T	P	L	L	M	Q	A	L	P	M	G	A	L	P	Q	G	P	M	Q	N	A	T	K	Y	G	N
15 murino	60	R	L	D	K	L	T	I	T	S	Q	N	L	Q	L	E	S	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>M</u>	<u>K</u>	L	P	K	S	A	K	P	V	S	Q	M	R	M	A	T	P	L	L	M	R	P	M	S	M	D	N	M	L	L	G	P	V	K	N	V	T	K	Y	G	N
humano	121	M	T	E	D	H	V	M	H	L	L	Q	N	A	D	P	L	K	V	P	P	L	K	G	S	F	P	E	N	L	R	H	L	K	N	T	M	E	T	I	D	W	K	V	F	E	S	W	M	H	H	W	L	L	F	E	M	S	R	H	
murino	120	M	T	Q	D	H	V	M	H	L	L	T	R	S	G	P	L	E	-	Y	P	Q	L	K	G	T	F	P	E	N	L	K	H	L	K	N	S	M	D	G	V	N	W	K	I	F	E	S	W	M	K	Q	W	L	L	F	E	M	S	K	N
humano	181	S	L	E	Q	K	-	P	T	D	A	P	P	K	E	S	L	E	L	E	D	P	S	S	G	L	G	V	T	K	Q	D	L	G	P	V	P	M																							
murino	179	S	L	E	E	K	K	P	T	E	A	P	P	K	E	P	L	D	M	E	D	L	S	S	G	L	G	V	T	R	Q	E	L	G	Q	V	T	L																							

20 Região KEY

Uma modalidade preferida da presente invenção se refere à remoção, substituição ou recolocação da região KEY de pelo menos uma cadeia invariante. Como descrito acima, a adição ou substituição da região KEY inclui as opções de
 25 adicionar ou substituir a região KEY existente na variante da cadeia ou cadeias invariantes escolhidas, com regiões

KEY de cadeias invariantes dos mesmos ou de outros organismos ou de variantes das regiões KEY a partir dos mesmos ou de outros organismos. As regiões KEY variantes podem, como se conclui a partir de cima, ser versões
5 mutantes especificamente geradas da região KEY, geradas por substituições, deleções ou adições de ácido nucléico individual ou múltiplo. Uma modalidade preferida compreende individualmente as seqüências N-terminalmente ou C-terminalmente adjacentes à região KEY, porém sem a própria
10 região KEY. Por adjacente quer se dizer quaisquer aminoácidos nos 10 resíduos da região KEY, nos 20 resíduos, nos 30 resíduos, nos 40 resíduos, nos 50 resíduos, nos 75 resíduos ou nos 100 resíduos da região KEY.

Uma modalidade mais preferida compreende uma ou mais
15 substituições ou deleções da região KEY, resultando na substituição ou deleção de um, dois, três ou quatro resíduos aminoácidos dos aminoácidos LRMK compreendidos na região KEY. Em uma modalidade, pelo menos um, como dois, por exemplo, três, como quatro dos aminoácidos LRMK
20 compreendidos na região KEY são deletados. Em outra modalidade, pelo menos um, como dois, por exemplo, três, como quatro dos aminoácidos LRMK compreendidos na região KEY são substituídos por outros aminoácidos. Os aminoácidos podem ser qualquer aminoácido selecionado do grupo que

consiste em: G (glicina), P (prolina), A (alanina), V (valina), L (leucina), I (isoleucina), M (metionina), C (cisteína), F (fenilalanina), Y (tirosina), W (triptofano), H (histidina), K (lisina), R (arginina), Q (glutamina), N (asparagina), E (ácido glutâmico), D (ácido aspártico), S (serina) e T (treonina).

Em uma modalidade específica, os resíduos de aminoácidos LRMK são individualmente substituídos com resíduos de aminoácidos de alanina (A), desse modo a
10 sequência lê: AAAA. Em outra modalidade, os resíduos de aminoácidos LRMK são substituídos com aminoácidos que compreendem substituições de valor igual ou sinônimos. Por exemplo, o resíduo de aminoácido L pode ser substituído com I, V, M ou F; R pode ser substituído com K, H, E ou D; M
15 pode ser substituído com L, I, F ou V; e K pode ser substituído com H ou R.

Em uma modalidade da presente invenção, a região KEY pode compreender mais dos resíduos LRMK, ou os resíduos LRMK podem ser substituídos com uma sequência de mais de
20 quatro resíduos de aminoácidos.

Uma modalidade da presente invenção refere-se a fragmentos de cadeia invariante como descrito acima sem a região KEY. Esses fragmentos podem ter pelo menos 5 resíduos de aminoácidos de comprimento, pelo menos 10

resíduos, pelo menos 15 resíduos, pelo menos 20 resíduos, pelo menos 25 resíduos, pelo menos 30 resíduos ou pelo menos 35 resíduos em comprimento. Outra modalidade refere-se a fragmentos de cadeia invariante em que o peptídeo de sinal é removido e o fragmento de cadeia invariante tem pelo menos 10 resíduos de aminoácidos de comprimento, pelo menos 15 resíduos, pelo menos 20 resíduos, pelo menos 25 resíduos, pelo menos 30 resíduos, pelo menos 35 resíduos, pelo menos 50 resíduos, pelo menos 60 resíduos, pelo menos 70 resíduos, pelo menos 80 resíduos, pelo menos 90 resíduos, pelo menos 100 resíduos, pelo menos 110 resíduos, pelo menos 120 resíduos, pelo menos 130 resíduos, pelo menos 140 resíduos, pelo menos 150 resíduos, pelo menos 160 resíduos, pelo menos 170 resíduos, ou pelo menos 180 resíduos de comprimento.

Em uma modalidade da invenção, pelo menos uma cadeia invariante codificada pelo constructo de ácido nucléico como descrito aqui não compreende os resíduos de aminoácidos LRMK da região li-KEY.

Em uma modalidade, a presente invenção se refere desse modo a um constructo de ácido nucléico compreendendo pelo menos uma cadeia invariante ou variante da mesma, ligada a pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo ou um fragmento antigênico da proteína ou peptídeo, em que a

cadeia invariante ou variante da mesma não compreende os resíduos de aminoácidos LRMK da região li-KEY.

Região CLIP

Outra modalidade da presente invenção se refere à
5 remoção, adição ou substituição da região CLIP de pelo menos uma cadeia invariante. Como descrito acima, a adição ou substituição da região CLIP inclui as opções de adicionar ou substituir a região CLIP existente na variante da cadeia ou cadeias invariantes escolhidas, com as regiões
10 CLIP de cadeias invariantes dos mesmos ou de outros organismos ou de variantes das regiões CLIP dos mesmos ou de outros organismos. As regiões CLIP variantes podem, como se conclui a partir de cima, ser versões mutantes especificamente geradas da região CLIP, geradas por
15 substituições, deleções ou adições de ácido nucléico individual ou múltiplo. Uma modalidade preferida compreende a região CLIP individualmente ou a região CLIP juntamente com a sequência N-terminalmente adjacente ou a sequência C-terminalmente adjacente sem quaisquer outras regiões ou
20 domínios de cadeia invariante. Outras modalidades preferidas compreendem individualmente as sequências N-terminalmente ou C-terminalmente adjacentes à região CLIP, porém sem a própria região clip. Por adjacente quer se dizer quaisquer aminoácidos nos 10 resíduos da região clip,

nos 20 resíduos, nos 30 resíduos, nos 40 resíduos, nos 50 resíduos, nos 75 resíduos ou nos 100 resíduos da região cLIP.

Uma modalidade preferida compreende uma ou mais substituições ou deleções da região CLIP, resultando na substituição ou deleção de um, dois, três ou quatro resíduos aminoácidos compreendidos na região CLIP. Em uma modalidade, pelo menos um, como dois, por exemplo, três, como quatro ou mais dos aminoácidos compreendidos na região CLIP são deletados. Em outra modalidade, pelo menos um, como dois, por exemplo, três, como quatro ou mais dos aminoácidos compreendidos na região CLIP são substituídos por outros aminoácidos. Os aminoácidos podem ser qualquer aminoácido selecionado do grupo que consiste em: G (glicina), P (prolina), A (alanina), V (valina), L (leucina), I (isoleucina), M (metionina), C (cisteína), F (fenilalanina), Y (tirosina), W (triptofano), H (histidina), K (lisina), R (arginina), Q (glutamina), N (asparagina), E (ácido glutâmico), D (ácido aspártico), S (serina) e T (treonina).

Uma modalidade da presente invenção se refere a fragmentos de cadeia invariante como descrito acima sem a região CLIP. Esses fragmentos podem ter pelo menos 5 resíduos de aminoácido de comprimento, pelo menos 10

resíduos, pelo menos 20 resíduos, pelo menos 25 resíduos, pelo menos 30 resíduos ou pelo menos 35 resíduos em comprimento. Outra modalidade refere-se a fragmentos de cadeia invariante em que o peptídeo de sinal é removido e o
5 fragmento de cadeia invariante tem pelo menos 10 resíduos de aminoácidos de comprimento, pelo menos 15 resíduos, pelo menos 20 resíduos, pelo menos 25 resíduos, pelo menos 30 resíduos, pelo menos 35 resíduos, pelo menos 50 resíduos, pelo menos 60 resíduos, pelo menos 70 resíduos, pelo menos
10 80 resíduos, pelo menos 90 resíduos, pelo menos 100 resíduos, pelo menos 110 resíduos, pelo menos 120 resíduos, pelo menos 130 resíduos, pelo menos 140 resíduos, pelo menos 150 resíduos, pelo menos 160 resíduos, pelo menos 170 resíduos, ou pelo menos 180 resíduos de comprimento.

15 Em uma modalidade específica, os resíduos de aminoácidos M nas posições 91 e 99 são individualmente substituídos com resíduos de aminoácido de alanina (A), desse modo a sequência lê: M91A M99A. Em outra modalidade, os resíduos de aminoácidos M nas posições 91 e 99 são
20 substituídos com aminoácidos que compreendem substituições de valor igual ou sinônimo.

Em uma modalidade da invenção, pelo menos uma cadeia invariante codificada pelo constructo de ácido nucléico como descrito aqui não compreende os resíduos de aminoácido

M nas posições 91 e 99 da sequência li-CLIP.

Em uma modalidade, a presente invenção desse modo se refere a um constructo de ácido nucléico compreendendo pelo menos uma cadeia invariante ou variante da mesma, ligada a
5 pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo ou um fragmento antigênico da proteína ou peptídeo, em que a cadeia invariante ou variante da mesma não compreende os resíduos de aminoácidos M nas posições 91 e 99 da região li-CLIP.

10 Alterações de terminal N ou C:

Uma modalidade da presente invenção se refere à remoção (deleção), substituição, ou recolocação das regiões terminais N ou C de pelo menos uma cadeia invariante. Como descrito acima, a adição ou substituição das regiões
15 terminais N ou C inclui as opções de adicionar ou substituir as regiões terminais N ou C na variante da cadeia ou cadeias invariantes escolhidas, com regiões terminais N ou C de cadeias invariantes ou outras proteínas dos mesmos organismos ou de outros organismos ou de
20 variantes de regiões terminais N ou C a partir dos mesmos ou de outros organismos. As regiões terminais N ou C variantes podem, como se conclui a partir de cima, ser versões mutantes especificamente geradas das regiões terminais N ou C, geradas por substituições, deleções ou

adições de ácido nucléico único ou múltiplo.

Uma modalidade compreende a deleção dos primeiros aminoácidos (terminais-N) ou últimos (terminais-C) de li, como o primeiro ou último 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 5 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 10 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 125, 130, 135, 140, 145 ou 150 aminoácidos de li.

Em uma modalidade específica da presente invenção, a 15 variante li compreende uma deleção dos 17 primeiros aminoácidos de li ($\Delta 17li$).

Uma modalidade da presente invenção se refere a fragmentos de cadeia invariante como descrito acima sem as regiões terminais N ou C completas. Esses fragmentos podem 20 ter pelo menos 5 resíduos de aminoácido, pelo menos 10 resíduos, pelo menos 15 resíduos, pelo menos 20 resíduos, pelo menos 25 resíduos, pelo menos 30 resíduos ou pelo menos 35 resíduos em comprimento. Outra modalidade refere-se a fragmentos de cadeia invariante em que o peptídeo de

sinal é removido e o fragmento de cadeia invariante tem pelo menos 10 resíduos de aminoácidos de comprimento, pelo menos 15 resíduos, pelo menos 20 resíduos, pelo menos 25 resíduos, pelo menos 30 resíduos, pelo menos 35 resíduos, 5 pelo menos 50 resíduos, pelo menos 60 resíduos, pelo menos 70 resíduos, pelo menos 80 resíduos, pelo menos 90 resíduos, pelo menos 100 resíduos, pelo menos 110 resíduos, pelo menos 120 resíduos, pelo menos 130 resíduos, pelo menos 140 resíduos, pelo menos 150 resíduos, pelo menos 160 10 resíduos, pelo menos 170 resíduos, ou pelo menos 180 resíduos de comprimento.

Em uma modalidade da presente invenção, todo ou parte do segmento de transmembrana de li pode ser substituído com o segmento correspondente de qualquer outra proteína, tal 15 como o receptor de quimiocine CCR6 TM6.

Em outra modalidade da presente invenção, todo ou parte do segmento de transmembrana de li pode ser substituído com o segmento correspondente do receptor de quimiocine CCR6 TM6.

20 Peptídeo Sinal

Outra modalidade da presente invenção se refere à pelo menos uma cadeia invariante em que o peptídeo de sinal é removido, substituído ou adicionado na sequência codificando a cadeia invariante. Um peptídeo sinal é uma

seqüência curta de aminoácidos que determina a localização eventual de uma proteína na célula, também denominado como um peptídeo de seleção. Peptídeos sinais que determinam a localização de proteínas para compartimentos subcelulares
5 como o retículo endoplasmático, aparelho de golgi e os vários compartimentos compreendendo o aparelho de golgi, o núcleo, a membrana de plasma, mitocôndria e os vários espaços e membranas aqui, peroxissomas, lisossomas, endossomas e vesículas secretoras entre outras são todos
10 incluídos no escopo da presente invenção. Uma modalidade preferida compreende individualmente a seqüência de alvejamento lisossomal de cadeia invariante.

Antígeno

Quaisquer das variantes acima de cadeia invariante são
15 abrangidas na presente invenção na forma em que pelo menos uma das variantes é operativamente ligada a pelo menos um antígeno como uma proteína antigênica ou peptídeo ou um fragmento antigênico da proteína ou peptídeo.

É um objetivo da presente invenção incluir porém não
20 limitar as proteínas antigênicas ou peptídeos ou fragmentos das proteínas ou peptídeos a originar dos organismos patogênicos, polipeptídios específicos de câncer e antígenos, e proteínas ou peptídeos associados a uma resposta fisiológica anormal.

Mais preferivelmente é um objetivo da presente invenção incluir um antígeno originado de quaisquer dos seguintes tipos de patógenos: vírus, microorganismos e parasitas. Isso inclui patógenos de qualquer animal conhecido. É preferível ter um antígeno de um patógeno de mamífero, isto é, um patógeno que especificamente alveja animais mamíferos como um furão. Prefere-se ter um antígeno de um patógeno humano. Em geral, qualquer antígeno que se verificar estar associado a um patógeno humano ou doença pode ser utilizado.

Em outra modalidade, é preferível ter um antígeno de um patógeno de ave, isto é, um patógeno que especificamente alvejará pássaros ou aves. É mais preferido ter um antígeno de uma galinha (*gallus gallus domesticus*). Em geral, qualquer antígeno que se verifica ser associado a um patógeno de ave pode ser utilizado.

Ainda em outra modalidade, é preferivelmente ter-se um patógeno de peixe, isto é um patógeno que especificamente alveja peixe. É mais preferido ter-se um antígeno de um peixe que pode ser criado em uma fazenda de criação de peixes. Em geral, qualquer antígeno que se verifica estar associado a um patógeno de peixe pode ser utilizado.

Antígenos virais

Em uma modalidade preferida pelo menos um antígeno

pode se originar de, porém não é limitado a quaisquer das seguintes famílias de vírus: Adenovirus, arenaviridae, astroviridae, bunyaviridae, caliciviridae, coronaviridae, flaviviridae, herpesviridae, orthomyxoviridae, paramyxoviridae, picornaviridae, poxviridae, reoviridae, retroviridae, rhabdoviridae e togaviridae.

Mais especificamente pelo menos um antígeno ou sequência antigênica pode ser derivado de qualquer dos seguintes vírus: influenza A como H1N1, H1N2, H3N2 e H5N1 (gripe aviária), influenza B, vírus de Influenza C, vírus de Hepatite A, vírus de Hepatite B, vírus de Hepatite C, vírus de Hepatite D, vírus de Hepatite E, Rotavírus, qualquer vírus do grupo de vírus Norwalk, adenovírus entérico, parvovírus, vírus de febre de Dengue, vírus da varíola do macaco, Mononegavirales, Lyssavirus como vírus da raiva, vírus de morcego Lagos, vírus Mokola, vírus Duvenhage, vírus de morcego europeu 1 & 2 e vírus de morcego australiano, Efemerovirus, Vesiculovírus, vírus de estomatite vesicular (VSV), vírus de Herpes como vírus de Herpes simplex tipos 1 e 2, varicella zoster, citomegalovirus, vírus de Epstein-Bar (EBV), vírus de herpes humano (HHV), vírus de herpes humano tipo 6 e 8, vírus de imunodeficiência humana (HIV), vírus de papiloma, vírus de herpes gama murino, arenavirus como vírus de febre

hemorrágica da Argentina, vírus de febre hemorragia da Bolívia, vírus de febre hemorrágica associado a Sabia, vírus de febre hemorrágica da Venezuela, vírus de febre Lassa, vírus Machupo, vírus de coriomeningite Linfocítica
 5 (LCMV), Bunyaviridae como vírus de febre hemorrágica da Criméia-Congo, Hantavírus, febre hemorrágica com vírus que causa síndrome renal, vírus de febre Rift Valley, Filoviridae (vilovirus) incluindo febre hemorrágica Ebola e febre hemorrágica Marburg, Flaviviridae incluindo vírus de
 10 doença de Kaysanur Forest, vírus de febre hemorrágica Omsk, vírus que causa encefalite transmitido por carrapato e Paramyxoviridae como vírus Hendra e vírus Nipah, varíola maior e varíola menor (varíola), alfavírus, como vírus de encefalite eqüina de Venezuela, vírus de encefalite eqüina
 15 do leste, vírus de encefalite eqüina do oeste, coronavírus associado à SARS (SARS-CoV), vírus de West Nile, qualquer vírus que cause encefalite.

Em uma modalidade preferida da invenção pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo é de um vírus selecionado
 20 do grupo de: HIV, vírus de hepatite C, vírus de influenza, vírus de herpes, Lassa, Ebola, varíola, gripe aviária, filovirus, Marbur, e vírus de papiloma.

Em uma modalidade mais preferida da invenção pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo é selecionado do

grupo de e/ou pode ser pelo menos um fragmento antigênico de qualquer um dos seguintes: glicoproteína de vírus de estomatite vesicular (VSV-GP); Influenza A NS-1 (proteína não estrutural 1), M1 (proteína de matriz 1), NP 5 (nucleoproteína), NEP, M2, M2e, HA, NA, PA, PB1, PB2, PB1-F2; LCMV NP, LCMV GP; Ebola GP, Ebola NP; antígenos HIV tat, vif, rev, vpr, gag, pol, nef, env, vpu; antígenos SIV tat, vif, rev, vpr, gag, pol, nef, env; vírus de herpes gama murino M2, M3 e ORF73 (como MHV-68 M2, M3 e ORF73); 10 Ovalbumina de galinha (OVA); ou um epítipo de célula T auxiliar. Está compreendido no escopo da invenção combinar dois ou mais de quaisquer dos antígenos aqui mencionados.

Antígenos de microorganismos

Uma modalidade da presente invenção inclui pelo menos 15 uma proteína antigênica ou peptídeo ou fragmento de uma proteína antigênica ou peptídeo de um microorganismo. Mais especificamente pelo menos um antígeno pode ser derivado de um dos seguintes de uma lista não exaustiva: *Anthrax* (*Bacillus anthracis*), *Mycobacterium tuberculosis*, 20 *Salmonella* (*Salmonella gallinarum*, *S. pullorum*, *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi*, *S. dublin*, *S. typhimurium*), *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, *Campylobacter* como *Campylobacter jejuni*, *Cryptococcus*

neoformans, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*,
Yersinia pseudotuberculosis, *Listeria monocytogenes*,
Leptospira species, *Legionella pneumophila*, *Borrelia*
burgdorferi, *Streptococcus* espécie como *Streptococcus*
 5 *pneumoniae*, *Neisseria meningitides*, *Haemophilus influenzae*,
Vibrio species como *Vibrio cholerae* 01, *V. cholerae* non-01,
V. parahaemolyticus, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*,
V. furnissii, *V. carchariae*, *V. hollisae*, *V.*
cincinnatiensis, *V. metschnikovii*, *V. damsela*, *V. mimicus*,
 10 *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas*
hydrophila, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria* & *Aeromonas*
veronii, *Plesiomonas shigelloides*, *Shigella* espécie como
Shigella sonnei, *S. boydii*, *S. flexneri*, e *S. dysenteriae*,
Enterovirulent Escherichia coli EEC (*Escherichia coli* -
 15 *enterotoxigênico* (ETEC), *Escherichia coli* -
enteropatogênico (EPEC), *Escherichia coli* O157:H7 *entero-*
hemorrágico (EHEC), *Escherichia coli* - *enteroinvasivo*
(EIEC)), espécie de *Staphylococcus*, como *S. aureus* e
 especialmente a espécie resistente/intermediária a
 20 *vancomicina* (VISA/VRSA) ou a espécie resistente a
multidrogas (MRSA), espécie de *Shigella*, como *S. flexneri*,
S. sonnei, *S. dysenteriae*, *Cryptosporidium parvum*, espécie
 de *Brucella* como *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B.*
suis, e *B. canis*, *Burkholderia mallei* e *Burkholderia*

pseudomallei, *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetii*,
Francisella tularensis, *Rickettsia prowazekii*, *Histoplasma*
capsulatum, *Coccidioides immitis*.

Em uma modalidade preferida da invenção pelo menos uma
 5 proteína antigênica ou peptídeo é de um microorganismo
 selecionado do grupo de: *Mycobacterium tuberculosis*,
Bacillus anthracis, espécie de *Staphylococcus* e espécie de
Vibrio.

Antígeno parasítico

10 Uma modalidade da invenção refere-se a um constructo
 de ácido nucléico, em que pelo menos uma proteína
 antigênica ou peptídeo codificado de um parasita.

Outra modalidade da presente invenção refere-se a um
 constructo de ácido nucléico que compreende combinações de
 15 pelo menos duas proteínas antigênicas ou peptídeos de
 quaisquer dos patógenos acima mencionados.

Preferivelmente o antígeno é derivado de, porém não
 limitado a, um parasita selecionado do grupo de: espécie de
 Plasmódio como *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*,
 20 *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Endolimax nana*,
Giardia lamblia, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium*
parvum, *Blastocystis hominis*, *Trichomonas vaginalis*,
Toxoplasma gondii, *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium*
muris, *Pneumocystis carinii*, *Leishmania donovani*,

Leishmania tropica, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana*, espécie *Acanthamoeba* como *Acanthamoeba castellanii*, e *A. culbertsoni*, *Naegleria fowleri*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*,
5 *Trypanosoma brucei gambiense*, *Isospora belli*, *Balantidium coli*, vermes redondos (*Ascaris lumbricoides*), vermes tipo gancho (*Necator Americanus*, *Ancylostoma duodenal*), vermes de pino (*Enterobius vermicularis*), vermes redondos (*Toxocara canis*, *Toxocara cati*), verme do coração
10 (*Dirofilaria immitis*), *Strongyloides* (*Strongyloides stercoralis*), *Trichinella* (*Trichinella spiralis*), *Filaria* (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*, *Loa loa*, *Mansonella streptocerca*, *Mansonella perstans*, *Mansonella ozzardi*), e *Anisakine larvae* (*Anisakis simplex*)
15 (verme de arenque), *Pseudoterranova* (*Phocanema*, *Terranova*) *decipiens* (verme de bacalhau ou focam), *Contracaecum species*, e *Hysterothylacium* (*Thynnascaris species*) *Trichuris trichiura*, tênia do gado (*Taenia saginata*), tênia de porco (*Taenia solium*), parasita de peixe
20 (*Diphyllbothrium latum*), e parasita de cão (*Dipylidium caninum*), fascíola Intestinal (*Fasciolopsis buski*), fascíola de sangue (*Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*) *Schistosoma haematobium*), fascíola hepática (*Clonorchis sinensis*), fascíola pulmonar oriental

(*Paragonimus westermani*), e fasciola hepática de carneiro (*Fasciola hepatica*), *Nanophyetus salmincola* e *N. schikhobalowi*.

Em uma modalidade preferida da invenção pelo menos uma
5 proteína antigênica ou peptídeo é de um parasita selecionado do grupo de: espécie de *Plasmodium*, espécie de *Leishmania* e espécie de *Trypanosoma*.

Pelo menos um antígeno da presente invenção pode ser Var2Csa de *Plasmodium falciparum*. Em uma modalidade
10 preferida da invenção, pelo menos uma proteína ou peptídeo antigênico ou fragmento de uma proteína ou peptídeo antígeno é Var2Csa.

Antígeno de animal doméstico

Um aspecto da presente invenção refere-se a antígenos
15 e/ou seqüências antigênicas derivadas de doenças ou agentes que infectam animais domésticos, especialmente animais comercialmente relevantes como porcos, vacas, cavalos, carneiros, cabras, lhamas, coelhos, marta, camundongos, ratos, cães, gatos, furões, aves domésticas como galinhas,
20 perus, faisões e outros, peixes como truta, salmão, bacalhau e outras espécies criadas em fazenda. Os exemplos de doenças ou agentes aqui dos quais pelo menos um antígeno ou seqüência antigênica pode ser derivada incluem, porém não são limitados a: doenças de espécie múltipla como:

Antrax, doença de Aujeszky, Bluetongue, Brucelose como: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* ou *Brucella suis*; febre hemorrágica da Criméia-Congo, Echinococcosis/hydatidosis, vírus da família

5 *Picornaviridae*, gênero *Aftovirus* causando febre aftosa especialmente qualquer um dos sete sorotipos imunologicamente distintos: A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asial, ou periocardite exsudativa dos ruminantes, encefalite japonesa, Leptospirose, larva do Mundo novo

10 (*Cochliomyia hominivorax*), larva do Mundo antigo (*Chrysomya bezziana*), Paratuberculose, febre Q, Raiva, febre de Rift Valley, Rinderpest, Trichinellosis, Tularemia, estomatite Vesicular ou febre de West Nile; doenças de gado como: anaplasmosse bovina, babesioses Bovina, campylobacteriose

15 genital Bovina, encefalopatia espongiforme bovina, tuberculose bovina, diarreia viral bovina, pleuropneumonia bovina contagiosa, leucose bovina enzoótica, septicemia hemorrágica, rinotraqueíte bovina infecciosa /

vulvovaginite pustular infecciosa, doença de pele

20 granulosa, febre catarral maligna, Theileriose, Trichomonose ou Tripanossomose (transmitida por tsé-tsé); doenças de carneiro e cabras como: artrite / encefalite caprina, agalactia contagiosa, pleuropneumonia caprina contagiosa, aborto enzoótico de ovelhas (clamidiose ovina),

Maedivisna, doença de carneiro de Nairobi, epididimite
 ovina (*Brucella ovis*), Peste des petits ruminants,
 Salmonellosis (*S. abortusovis*), Scrapie, Sheep pox e goat
 pox; doenças de eqüinos como: doença de cavalo africano,
 5 metrite contagiosa de eqüino, Dourine, encefalomielite
 eqüina (do leste), encefalomielite eqüina (do oeste),
 anemia infecciosa eqüina, Influenza eqüina, piroplasmose
 eqüina, rinopneumonite eqüina, arterite viral eqüina,
 Glanders, Surra (*Trypanosoma evansi*) ou encefalomielite
 10 eqüina venezuelana; doenças de suínos como: febre de suíno
 africano, febre de suíno clássica, encefalite de vírus
 Nipah, cisticercose de porco, síndrome respiratória e
 reprodutiva de porcos, doença vesicular de suíno ou
 gastroenterite transmissível; doenças de aves como:
 15 clamidiose de ave, bronquite infecciosa de ave,
 laringotraqueíte infecciosa de ave, micoplasmose de ave (*M.*
gallisepticum), micoplasmose de ave (*M. synoviae*), hepatite
 de vírus de pato, cólera de ave, tifóide de ave, influenza
 de ave altamente patogênica essa sendo qualquer vírus de
 20 influenza A ou B e especialmente H5N1, doença bursal
 infecciosa (doença de Gumboro), doença de Marek, doença de
 Newcastle, doença de Pullorum ou rinotraqueíte de peru;
 doenças de roedores de lagomorfo como: enterite de vírus,
 Mixomatose ou doença hemorrágica de coelho; doenças de

peixes como: necrose hematopoiética epizoótica, necrose hematopoiética infecciosa, viremia de primavera de carpa, septicemia hemorrágica viral, necrose pancreática infecciosa, anemia infecciosa de salmão, síndrome
5 ulcerativa epizoótica, doença de rim bacteriana (*Renibacterium salmoninarum*), Girodactilose (*Gyrodactylus salaris*), doença iridoviral de brema do Mar Vermelho; ou outras doenças como Camelpox ou Leishmaniose.

Em uma modalidade preferida da invenção pelo menos uma
10 proteína ou peptídeo antigênico é de doença de Aujeszky, febre aftosa, vírus de estomatite vesicular, influenza aviária ou doença de Newcastle.

Ainda uma modalidade preferida da presente invenção refere-se à pelo menos uma proteína ou peptídeo antigênico
15 ou fragmento da proteína ou peptídeo antigênico sendo um peptídeo ou proteína antigênica com pelo menos 85% de identidade a quaisquer dos antígenos acima descritos. A homologia ou identidade entre aminoácidos pode ser calculada por qualquer das matrizes de marcação BLOSUM
20 anteriormente mencionadas.

Antígenos cancerígenos

Muitas proteínas/glicoproteínas foram identificadas e ligadas a certos tipos de câncer; esses são mencionados como polipeptídios específicos de câncer, antígenos

associados a tumor ou antígenos de câncer. Em geral, qualquer antígeno que se verificar ser associado a tumores de câncer pode ser utilizado. Um modo no qual antígenos específicos de câncer podem ser encontrados é por análises de subtração como várias análises de microarranjo como análise de microarranjo de DNA. Aqui o padrão de expressão de gene (como visto no nível de RNA ou proteína codificada pelos genes) entre pacientes saudáveis e com câncer, entre grupos de pacientes com câncer ou entre tecido saudável e com câncer no mesmo paciente é comparado. Os genes que têm níveis de expressão aproximadamente iguais são "subtraídos" entre si deixando os genes / produtos de genes que diferem entre o tecido saudável e canceroso. Essa abordagem é conhecida na técnica e pode ser utilizada como um método de identificar novos antígenos de câncer ou para criar um perfil de expressão de gene específico para um dado paciente ou grupo de pacientes. Antígenos desse modo identificados tanto de antígeno único como combinações nas quais os mesmos podem ser verificador estar compreendidos no escopo da presente invenção.

Preferivelmente pelo menos um antígeno da presente invenção é derivado de, porém não limitado a um polipeptídeo específico de câncer selecionado do grupo de: MAGE-3, MAGE-1, gp100, gp75, TRP-2, tirosinase, MART-1,

CEA, Ras, p53, B-Catenin, gp43, GAGE-1, BAGE-1, PSA, MUC-1,
 2, 3, e HSP-70, TRP-1, gp100/pmell17, beta-HCG, mutantes
 Ras, mutantes p53, antígeno de melanoma HMW, MUC-18, HOJ-1,
 cinase dependente de ciclina 4 (Cdk4), Caspase 8, HER-
 5 2/neu, Bcr-Abl tirosine cinase, antígeno carcinoembriônico
 (CEA), telomerase, SV40 Large T, vírus de papiloma humano
 HPV tipo 6, 11, 16, 18, 31 e 33; oncogene viral derivado de
 HPV E5, E6, E7 e L1; Survivin, Bcl-XL, MCL-1 e Rho-C.

Em uma modalidade preferida da invenção, pelo menos
 10 uma proteína ou peptídeo antigênico ou fragmento de uma
 proteína ou peptídeo antigênico é de um polipeptídeo
 específico de câncer selecionado do grupo de: oncogene
 viral derivado de HPV E5, E6, E7 e L1; Survivin, Bcl-XL,
 MCL-1 e Rho-C.

15 Antígeno associado a uma resposta fisiológica anormal

Uma modalidade da invenção se refere a um constructo
 de ácido nucléico, em que pelo menos uma proteína ou
 peptídeo antigênico ou fragmento de uma proteína ou
 peptídeo antigênico é de um polipeptídeo associado a uma
 20 resposta fisiológica anormal. Tal resposta fisiológica
 anormal inclui, porém não é limitada a doenças auto-imunes,
 reações alérgicas, cânceres e doenças congênitas. Uma lista
 não exaustiva de exemplos da presente inclui doenças como
 artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose

múltipla, psoríase e doença de Crohn.

Ligador operativo

Um aspecto da presente invenção refere-se a constructo de ácido nucléico em que a ligação operativa entre a cadeia
5 invariante e a proteína ou peptídeo antigénico ou fragmento de proteína ou peptídeo antigénico é uma ligação direta ou uma ligação mediada por uma região espaçadora. Pelo termoligador operativo entende-se uma sequência de nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos que ligam juntas
10 duas partes de constructo de ácido nucléico ou polipeptídeo quimérico em um modo que garante o processamento biológico do ácido nucléico ou polipeptídeo. Se o ligador operativo for uma ligação direta, os dois ácidos nucléicos cada codificando um quadro de leitura aberta ou um fragmento de
15 um quadro de leitura aberta são colocados imediatamente adjacentes entre si e desse modo também no quadro. Se o ligador operativo for mediado por uma região espaçadora, uma série de nucleotídeos é inserida entre os nucleotídeos que codificam pelo menos uma cadeia invariante e pelo menos
20 um peptídeo antigénico, respectivamente. Está compreendido no escopo da presente invenção ter uma região espaçadora em que a região espaçadora meramente é uma série de nucleotídeos ligando pelo menos dois elementos da presente invenção em um modo retendo os quadros de leitura aberta,

ou a região espaçadora pode codificar um ou mais sinais ou elementos separados como definido abaixo.

Em uma modalidade específica a invenção compreende um ligador operativo, em que o ligador operativo é uma região
5 espaçadora.

Em uma modalidade a invenção compreende uma região espaçadora que codifica pelo menos um epítipo auxiliar para moléculas MHC da classe II. Um exemplo de um epítipo auxiliar é um determinante imunogênico como toxina de
10 Difteria, especialmente região terminal COOH de fragmento de toxina de difteria B foi mostrada como sendo imunogênica em camundongos. Além disso, HSP70, em parte ou totalmente, bem como outros peptídeos imunogênicos, como influenza viral ou seqüências imunogênicas ou peptídeos com um motivo
15 de ancoragem para moléculas HLA classe I e classe II, também podem ser codificados na região espaçadora do constructo de ácido nucléico.

Em outra modalidade a região espaçadora do constructo de ácido nucléico codifica pelo menos um sítio de clivagem
20 de protease. Sítios de clivagem de proteases lisossomais como catepsinas, proteases de aspartato e proteases de zinco bem como outras proteases intracelulares estão compreendidas no escopo da presente invenção.

Ainda em uma modalidade o ligador operativo do

constructo de ácido nucléico pode compreender pelo menos uma sequência de codificação de miRNA ou siRNA. siRNAs (RNAs interferentes pequenos) e miRNAs (microRNAs) alvejam RNAs endógenos, em um modo específico, para degradação. Um
5 siRNA ou miRNA codificado no constructo de ácido nucléico da presente invenção pode ser desse modo escolhido para alvejar um produto de gene indesejável.

Em outra modalidade o ligador operativo compreende pelo menos um poliligador ou sítio de clonagem múltiplo
10 (MCS). Poliligadores e MCS's são série de nucleotídeos compreendendo seqüências de reconhecimento de enzima de restrição, isto é, sítios onde uma enzima de restrição corta o DNA em modo cego ou espalhado facilitando a subclonagem de outros fragmentos/seqüências de DNA no
15 constructo de ácido nucléico. As seqüências de reconhecimento dos poliligadores/MCS's são tipicamente exclusivas significando que não são encontradas em outra parte no constructo de ácido nucléico. O ligador operativo pode compreender ainda um ou mais códons de parada ou
20 término que sinalizam a liberação do polipeptídio nascente a partir do ribossomo. O ligador operativo também pode compreender pelo menos um IRES (Sítio de entrada ribossômica interno) e/ou pelo menos um promotor. Um IRES é uma seqüência de nucleotídeo que permite iniciação de

tradução no meio de uma sequência de RNA mensageiro (mRNA) como parte do maior processo de síntese de proteína. Um promotor é uma sequência de DNA que permite que um gene seja transcrito. O promotor é reconhecido por polimerase 5 RNA, que então inicia transcrição, vide abaixo. O promotor pode ser único ou bidirecional.

Em uma modalidade o ligador operativo que cobre a região entre a cadeia invariante e pelo menos um antígeno é um ligador operativo que compreende pelo menos um 10 poliligador, e pelo menos um promotor, e opcionalmente também pelo menos um IRES. Esses elementos podem ser colocados em qualquer ordem. Em uma modalidade preferida adicional, o códon de PARADA da cadeia invariante foi deletado, e o poliligador foi clonado no vetor em um modo 15 que conserva o quadro de leitura aberto permitindo leitura de quadro de pelo menos um antígeno que é inserido no poliligador. Isso tem a vantagem de facilitar subclonagem de múltiplos antígenos no mesmo constructo em uma etapa ou em múltiplas etapas de clonagem e permitir a expressão 20 simultânea de múltiplos antígenos no mesmo quadro que a cadeia invariante. Um códon de PARADA pode ser inserido após o poliligador para término de tradução. Essa modalidade pode ser combinada com qualquer dos epítomos auxiliares acima, mi/siRNAs ou qualquer dos outros

elementos aqui descritos.

Uma modalidade da presente invenção se refere à colocação do ligador operativo em relação à pelo menos uma cadeia invariante e pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo ou fragmento da proteína ou peptídeo, em que pelo menos um peptídeo antigênico que codifica seqüências é colocado: na seqüência de cadeia invariante, na extremidade frontal da seqüência de cadeia invariante, na parte terminal da seqüência de cadeia invariante. Isso é feito em um modo que assegura a capacidade de leitura do quadro de leitura aberta do constructo, de modo que o peptídeo antigênico é: precedido, circundado ou arredondado por pelo menos um ligador operativo.

Outra modalidade da presente invenção refere-se ainda à colocação do ligador operativo em relação à pelo menos uma cadeia invariante e pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo ou fragmento da proteína ou peptídeo, em que pelo menos um peptídeo antigênico que codifica seqüência é preferivelmente colocado na parte terminal da cadeia invariante e um ligador operativo é inserido aqui entre: a parte terminal sendo o primeiro ou último resíduo da cadeia invariante ou fragmento do presente.

Em outra modalidade, o constructo de ácido nucléico não compreende um ligador operativo; em vez disso, pelo

menos um peptídeo antígeno que codifica seqüência é
amarrada diretamente à cadeia invariante. Pelo menos um
peptídeo antigênico que codifica seqüências pode ser
colocado: na seqüência de cadeia invariante, na extremidade
5 frontal da seqüência de cadeia invariante, na parte
terminal da seqüência de cadeia invariante. Isso é feito em
um modo assegurando a capacidade de leitura do quadro de
leitura aberto do constructo.

Há vantagens para as duas possibilidades de incluir ou
10 excluir um ligador operativo; excluir o ligador pode em uma
modalidade reduzir a possibilidade de sensibilizar uma
reposta imune contra o ligador em vez de sensibilizar um
imune contra o peptídeo antigênico.

Combinações

15 Está compreendido dentro do escopo da presente
invenção que o constructo de ácido nucléico codifica uma
pluralidade de elementos. Os elementos sendo pelo menos uma
cadeia invariante ou variante da mesma e pelo menos uma
proteína antigênica ou peptídeo ou fragmento da proteína ou
20 peptídeo. Portanto está compreendido dentro do escopo da
presente invenção ter uma pluralidade de cadeias
invariantes ou variantes das mesmas cada dessas sendo
operativamente ligadas entre si e a uma pluralidade de
proteínas antigênicas ou peptídeos ou fragmentos de

proteínas antigênicas ou peptídeos, em que esses também são operativamente ligados. Os elementos do constructo de ácido nucléico devem ser desse modo operativamente ligados entre si. Várias séries de cadeias invariantes ou variantes das
5 mesmas cada operativamente ligada a uma proteína antigênica ou peptídeo ou fragmento da proteína ou peptídeo, cada dessas séries sendo operativamente ligada entre si são abrangidas na presente invenção.

As vantagens e aspectos muito importantes da presente
10 invenção se referem ao fato de que qualquer tipo de resposta imune, por exemplo, respostas mediadas por anticorpo e mediadas por célula T, podem ser iniciadas, tanto com epítomos conhecidos como sendo antígenos fracos, como polipeptídios de propriedades antigênicas
15 desconhecidas e com múltiplos epítomos/antígenos simultaneamente.

Portanto, é também compreendido dentro do escopo da presente invenção que uma modalidade preferida seja um constructo de ácido nucléico codificando pelo menos uma
20 cadeia invariante ou variante da mesma operativamente ligada a uma pluralidade de proteínas antigênicas ou peptídeos ou fragmento de proteínas ou peptídeos, como duas, três, quatro, cinco, seis, oito, dez, doze ou mais proteínas antigênicas ou peptídeos ou fragmento de

proteínas ou peptídeos.

O constructo de ácido nucléico pode compreender elementos adicionais. Esses incluem, porém não são limitados a: sítios de entrada ribossômica interna (IRES);
5 genes que codificam proteínas relacionadas à apresentação de antígeno como LAMP, calreticulim Hsp 33, Hsp 60, Hsp70, Hsp90, Hsp100, sHSP (proteína de choque térmico pequeno) e proteínas de ligação de choque térmico como domínio de ligação de Hsp73 homólogo a DNAJ de resíduo 77; genes que
10 codificam proteínas que são relacionadas à dispersão intracelular como VP22, HIV Tat, Cx43 ou outras conexinas e constituintes de junção gap intercelular; genes codificando moléculas de ativação de célula killer natural (célula NK) como H60 e citosinas, ovalbumina de galinha, ou qualquer
15 epítipo de célula auxiliar T.

Em uma modalidade preferida da presente invenção o constructo de ácido nucléico compreende pelo menos um gene que codifica uma proteína relacionada à apresentação de antígeno como LAMP, LIMP, calreticulim Hsp 33, Hsp 60,
20 Hsp70, Hsp90, Hsp100, sHSP (proteína de choque térmico pequeno) ou domínio de ligação de Hsp73 homólogo a DNAJ de resíduo 77.

Ainda em uma modalidade preferida da presente invenção o constructo de ácido nucléico compreende pelo menos um

gene que codifica uma proteína relacionada à dispersão intracelular como VP22, Cx43, HIV Tat, outras conexinas ou constituintes de junção de gap intercelular.

Promotor

5 O termo promotor será utilizado aqui para se referir a um grupo de módulos de controle de transcricional que são agrupados em torno do sítio de iniciação para RNA polimerase II. Grande parte do pensamento sobre como os promotores são organizados deriva de análises de vários
10 promotores virais, incluindo aqueles para a timidina cinase (tk) HSV e unidades de transcrição prematura de SV40. Esses estudos aumentados por trabalho mais recente, mostraram que promotores são compostos de módulos funcionais discretos, cada consistindo em aproximadamente 7-20 bp de DNA, e
15 contendo um ou mais sítios de reconhecimento para proteínas de ativador de transcrição. Pelo menos um módulo em cada promotor funciona para posicionar o sítio de partida para síntese RNA. O exemplo mais conhecido disso é o quadrado TATA, porém em alguns promotores não tendo um quadrado
20 TATA, como o promotor para o gene de desoxinucleotidil transferase e o promotor para os genes tardios SV 40, um elemento discreto sobrepondo o próprio sítio de partida ajuda a fixar o lugar de iniciação.

Elementos promotores adicionais regulam a frequência

de iniciação de transcrição. Tipicamente, esses são localizados na região 30-110 bp à montante do sítio de partida, embora um número de promotores tenha sido recentemente mostrado como contendo elementos funcionais a jusante do sítio de partida também. O espaçamento entre elementos é flexível, de modo que a função de promotor seja preservada quando elementos são invertidos ou movidos um em relação ao outro. No promotor tk, o espaçamento entre elementos pode ser aumentado para 50 bp de separação antes da atividade começar a declinar. Dependendo do promotor, parece que elementos individuais podem funcionar cooperativamente ou independentemente para ativar a transcrição. Qualquer promotor que pode dirigir a iniciação de transcrição das seqüências codificadas pelo constructo de ácido nucléico pode ser utilizado na invenção.

Um aspecto da presente invenção compreende o constructo de ácido nucléico em que pelo menos uma cadeia invariante operativamente ligada e proteína antigênica ou peptídeo codificando seqüência é precedida por um promotor que permite expressão do constructo.

É um aspecto adicional que o promotor seja selecionado do grupo de promotores constitutivos, promotores induzíveis, promotores específicos de organismo, promotores específicos de tecido, promotores específicos de tipo de

célula e promotores específicos de inflamação.

Os exemplos de promotores incluem, porém não são limitados a: promotores constitutivos como: promotor prematuro de vírus de símio 40 (SV40), um promotor de vírus de tumor mamário de camundongo, um promotor de repetição terminal longo de vírus de imunodeficiência humana, um promotor de vírus Moloney, um promotor de vírus de leucemia de ave, um promotor prematuro imediato de vírus de Epstein-Barr, um promotor de vírus de sarcoma de Rous (RSV), um promotor de actina humana, um promotor de miosina humana, um promotor de hemoglobina humana, promotor de citomegalovírus (CMV) e um promotor de creatina de músculo humano, promotores induzíveis como: um promotor de metalotionina, um promotor de glicocorticóide, um promotor de progesterona, e um promotor de tetraciclina (tet-on ou tet-off), promotores específicos de tecido como: promotor HER-2 e promotor associado à PSA e promotores bidirecionais, que são capazes de iniciar transcrição em qualquer direção a partir do promotor.

As vantagens de utilizar um promotor induzível incluem a opção de fornecer um constructo de ácido nucléico "dormente" que pode ser ativado à vontade. Isso pode ser de uso se a sensibilização de uma resposta imune preferivelmente for somente induzida localmente VS.

Sistemicamente em um corpo (por exemplo, em casos envolvendo câncer) ou a sensibilização de uma resposta imune for prejudicial para a saúde do receptor no momento de administração.

- 5 Em uma modalidade preferida o constructo de ácido nucléico compreende um promotor selecionado do grupo de: promotor CMV, promotor SV40 e promotor RSV.

Veículo de distribuição

Um aspecto da presente invenção compreende o
10 constructo de ácido nucléico como descrito em qualquer dos
acima, compreendido em um veículo de distribuição. Um
veículo de distribuição é uma entidade pelo que uma
seqüência de nucleotídeos ou polipeptídio ou ambos pode ser
transportado de pelo menos um meio para outro. Veículos de
15 distribuição são genericamente utilizadas para expressão
das seqüências codificadas no constructo de ácido nucléico
e/ou para a distribuição intracelular do constructo ou
polipeptídio codificado na mesma.

O constructo de ácido nucléico pode ser transferida
20 para células *in vivo* ou *ex vivo*; o último por remover o
tecido alvo (isto é, células de fígado ou leucócitos) a
partir do paciente, transferir o constructo *in vitro* e
então replantar as células transduzidas no paciente.

Os métodos de distribuição não viral incluem

abordagens física (distribuição isenta de veículo) e química (distribuição baseada em vetor sintético).

Abordagens físicas, incluindo injeção de agulha, pistola de gene, injeção de jato, eletroporação, ultra-som, e distribuição hidrodinâmica, empregam uma força física que permeia a membrana de célula e facilita transferência de gene intracelular. A força física pode ser elétrica ou mecânica.

As abordagens químicas utilizam compostos de ocorrência sintética ou natural como veículos para distribuir o transgene em células. A estratégia mais freqüentemente estudada para distribuição de gene não viral é a formulação de DNA em partículas condensadas utilizando lipídeos catiônicos ou polímeros catiônicos. As partículas contendo DNA são subseqüentemente absorvidas por células através de endocitose, macropinocitose, ou fagocitose na forma de vesículas intracelulares, das quais uma pequena fração do DNA é liberada no citoplasma e migra para o núcleo, onde a expressão de transgene ocorre.

Está compreendido no escopo da presente invenção que o veículo de distribuição é um veículo selecionado do grupo de: veículos baseados em RNA, veículos/vetores baseados em DNA, veículos baseados em lipídeo, veículos baseados em polímero e veículos de RNA ou DNA derivados de forma viral.

Uma modalidade preferida da presente invenção se refere à distribuição do constructo de ácido nucléico por técnicas mecânicas ou elétricas.

- Física

5 ➤ Injeção: uma modalidade preferida se refere à injeção simples do constructo de ácido nucléico em solução. A injeção é normalmente realizada por via intramuscular (IM) em músculo esquelético, por via intradérmica (ID) ou no fígado, com o constructo de ácido nucléico sendo
10 distribuída aos espaços extracelulares. A distribuição por injeção pode ser auxiliada por eletroporação; por utilizar soluções hipertônicas de solução salina ou sacarose; por danificar temporariamente fibras de músculo com miotoxinas como bupivacaína; ou por adicionar substâncias capazes de
15 aumentar a eficiência de internalização de DNA por células alvo como transferrina, solventes imiscíveis em água, polímeros não iônicos, tensoativos ou inibidores de nuclease.

 ➤ Pistola de gene: a pistola de gene do Sistema de
20 Distribuição de partículas Biolístico é um dispositivo para injetar células com informação genética. A carga útil é uma partícula elementar de um metal pesado como ouro, prata ou tungstênio revestido com, por exemplo, DNA de plasmídeo. Essa técnica é freqüentemente simplesmente mencionada como

biolística. Hélio comprimido pode ser utilizado como o propelente. Especialmente o revestimento do constructo de ácido nucléico sobre partículas de ouro, como partículas de ouro coloidal, é uma modalidade favorecida.

5 ➤ Injeção pneumática (jato): nenhuma partícula necessária, solução aquosa.

 ➤ eletroporação, ou eletropermeabilização, é um aumento significativo na condutividade elétrica e permeabilidade da membrana de plasma de célula causado por
10 um campo elétrico externamente aplicado.

 ➤ Transferência de gene facilitada por ultra-som: ultra-som cria poros de membrana e facilita transferência de gene intracelular através de difusão passiva de DNA através dos poros de membrana. A eficiência pode ser
15 intensificada pelo uso de agentes de contraste ou condições que tornam as membranas mais fluídicas.

 ➤ Distribuição hidrodinâmica de gene: a distribuição hidrodinâmica de gene é um método simples que introduz DNA de plasmídeo descoberto em células em órgãos
20 internos altamente perfundidos (por exemplo, o fígado). Em roedores, a injeção rápida de veia de cauda de um grande volume de solução de DNA causa um transbordamento transiente de solução injetada na veia cava inferior que excede o débito cardíaco. Como resultado, a injeção induz

um fluxo de solução de DNA em retrograde para dentro do fígado, uma elevação rápida de pressão intra-hepática, expansão de fígado, e ruptura reversível de fenestra de fígado.

5• Química

➤ Distribuição de gene mediada por lipídeo catiônico: embora alguns lipídeos catiônicos individualmente apresentem boa atividade de transfecção, são freqüentemente formulados com um fosfolipídeo não carregado ou colesterol como um lipídeo auxiliar para formar lipossomas. Após misturar com lipossomas catiônicos, DNA de plasmídeo é condensado em partículas quase estáveis pequenas denominadas lipoplexos. DNA em lipoplexos é bem protegido de degradação de nuclease. Lipoplexos são capazes de acionar absorção celular e facilitar a liberação de DNA a partir das vesículas intracelulares antes de atingir compartimentos lisossomais destrutivos.

➤ Transferência de gene mediada por polímero catiônico: a maioria dos polímeros catiônicos compartilham a função de condensar DNA em partículas pequenas e facilitar absorção celular via endocitose através de interação carga-carga com sítios aniônicos em superfícies de células. Veículos de DNA de polímero catiônico incluem polietilenoimina (PEI), dendrímeros de poliamidoamina e

polipropil amina, polialil amina, dextrano catiônico, quitosana, proteínas catiônicas (polilisina, protamina, e histonas) e peptídeos catiônicos.

5 ➤ Sistema híbrido de polímero-lipídeo: DNA pré-condensado com policátions, então revestido com lipossomas catiônicos, lipossomas aniônicos, ou polímeros anfifílicos com ou sem lipídeos auxiliares.

10 Os exemplos de veículos de distribuição química incluem, porém não são limitadas a: microesferas de polímero biodegradáveis, formulações baseadas em lipídeos como veículos de lipossoma, moléculas cationicamente carregadas como lipossomas, sais de cálcio ou dendrímeros, lipopolissacarídeos, polipeptídios ou polissacarídeos.

15 Métodos de distribuição física alternativos podem incluir instilação por aerossol de um constructo de ácido nucléico descoberto em superfícies de mucosa, como a mucosa nasal e de pulmão; administração tópica do constructo de ácido nucléico nos tecidos de mucosa e de olho; e hidratação como hidratação estromal pela qual solução
20 salina é forçada para dentro do estroma de córnea do olho.

 Outra modalidade da presente invenção compreende um vetor que aqui é indicado um vetor viral (isto é, não um vírus) como um veículo de distribuição. Vetores virais de acordo com a presente invenção são feitos de um genoma

viral modificado, isto é, o DNA efetivo ou DNA que forma o genoma viral, e introduzidos em forma descoberta. Desse modo, quaisquer estruturas de revestimento circundando o genoma viral feito de proteínas virais ou não virais não
5 fazem parte do vetor viral de acordo com a presente invenção.

O vírus do qual o vetor viral é derivado é selecionado do grupo não exaustivo de: adenovírus, retrovírus, lentivírus, vírus adeno-associados, vírus de herpes, vírus
10 de vacínia, vírus espumoso, citomegalovírus, vírus de Semliki Forest, vírus de pox, vetor de vírus de RNA e vetor de vírus de DNA. Tais vetores virais são bem conhecidos na técnica.

Célula Recombinante

15 Um aspecto da presente invenção refere-se a uma célula que compreende o constructo de ácido nucléico como definido em qualquer dos acima. Tal célula recombinante pode ser utilizada como ferramenta para pesquisa *in vitro*, como um veículo de distribuição para o constructo de ácido nucléico
20 ou como parte de um regime de terapia de gene. O constructo de ácido nucléico de acordo com a invenção pode ser introduzida em células por técnicas bem conhecidas na arte e que incluem microinjeção de DNA no núcleo de uma célula, transfecção, eletroporação, fusão de lipofecção/lipossoma e

bombardeio de partículas. Células apropriadas incluem células autólogas e não autólogas, e podem incluir células xenogeneicas.

Em uma modalidade preferida o constructo de ácido
5 nucléico da presente invenção é compreendida em uma célula que apresenta antígeno (APC). Qualquer célula que apresenta antígenos em sua superfície em associação a uma molécula de MHC é considerada uma célula que apresenta antígeno. Tais células incluem, porém não são limitadas a macrófagos,
10 células dendríticas, células B, APCs híbridas, e APCs de criação. Os métodos de fazer APCs híbridos são bem conhecidos na arte.

Em uma modalidade mais preferida o APC é uma célula que apresenta antígeno profissional e mais preferivelmente
15 o APC é uma célula que expressa MHC-I e/ou MHC-II.

A APC de acordo com qualquer um dos acima pode ser uma célula tronco obtida de um paciente. Após introduzir o constructo de ácido nucléico da invenção, a célula tronco pode ser reintroduzida no paciente em uma tentativa para
20 tratar o paciente de uma condição médica. Preferivelmente, a célula isolada do paciente é uma célula tronco capaz de diferenciar em uma célula que apresenta antígeno.

É incluído adicionalmente dentro do escopo da presente invenção que a célula que apresenta antígeno compreendendo

o constructo de ácido nucléico da presente invenção não expressa nenhum sinal co-estimulador e a proteína antigênica ou peptídeo ou fragmento antigênico da proteína ou peptídeo é um auto-antígeno.

5 Anticorpos e proteínas quiméricas

Um objetivo da presente invenção é a proteína quimérica codificada pelos constructos de ácido nucléico como descrito acima, compreendendo pelo menos uma cadeia invariante operativamente ligada ou variantes da mesma e
10 pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo ou fragmento da proteína antigênica ou peptídeo. Por proteína quimérica é entendida uma proteína geneticamente construída que é codificada por uma seqüência de nucleotídeos feita por junção de dois ou mais genes completos ou parciais ou uma
15 série de ácidos nucléicos (não) aleatórios.

Um aspecto da presente invenção se refere a um anticorpo que pode reconhecer a proteína quimérica como definido acima. Pelo termo anticorpo é entendido moléculas de imunoglobulina e porções ativas de moléculas de
20 imunoglobulina. Anticorpos são, por exemplo, moléculas de imunoglobulina intactas ou fragmentos das mesmas retendo a atividade imunológica. Tais anticorpos podem ser utilizados para a imunização passiva de um animal, ou para uso em um ensaio para detectar proteínas às quais o anticorpo se

liga.

Composições de constructo de ácido nucléico

Um aspecto da presente invenção se refere a uma composição compreendendo uma seqüência de ácidos nucléicos
5 que codifica pelo menos uma cadeia invariante ou variantes da mesma operativamente ligada a pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo ou fragmento da proteína antigênica ou peptídeo. A composição pode compreender desse modo um constructo de ácido nucléico como definido em qualquer do
10 acima. A composição pode ser adicionalmente utilizada como medicamento.

A composição de constructo de ácido nucléico de acordo com a invenção pode ser formulada de acordo com métodos conhecidos como pela mistura de um ou mais veículos
15 farmacêuticamente aceitáveis, também excipientes ou estabilizadores conhecidos com o agente ativo. Esses excipientes podem ser aceitáveis para administração em qualquer indivíduo/animal, preferivelmente em vertebrados e mais preferivelmente em seres humanos visto que são não
20 tóxicos para a célula ou indivíduo sendo exposto aos mesmos nas dosagens e concentrações empregadas. Frequentemente o veículo fisiologicamente aceitável é uma solução tamponada de pH aquosa. Os exemplos de tais excipientes, veículos e métodos de formulação podem ser encontrados, por exemplo,

em Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, PA). Os exemplos de veículos fisiologicamente aceitáveis incluem, porém não são limitados a: tampões como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes
5 incluindo ácido ascórbico; polipeptídios de baixo peso molecular (menor do que aproximadamente 10 resíduos); proteínas, como albumina de soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinil pirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina,
10 asparagina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes de quelação como EDTA; alcoóis de açúcar como manitol ou sorbitol; contra-íons de formação de sal como sódio; e / ou tensoativos não iônicos como
15 TWEEN™, polietileno glicol (PEG) e PLURONICS™.

Para formular uma composição farmacêuticamente aceitável apropriada para administração eficaz, tais composições de acordo com a invenção, conterão uma quantidade eficaz do constructo de ácido nucléico, o
20 constructo de ácido nucléico compreendida em um veículo de distribuição ou a proteína quimérica codificada no constructo de ácido nucléico como descrito aqui. Freqüentemente, se a sensibilização da resposta imune com proteína ou polipeptídios como codificado pelo constructo

de ácido nucléico da presente invenção, um veículo será utilizado como armação por acoplar as proteínas ou peptídeos à mesma e desse modo auxiliar na indução de uma resposta imune. A proteína veículo pode ser qualquer

5 veículo convencional incluindo qualquer proteína apropriada para apresentar determinantes imunogênicos. Veículos apropriados são tipicamente macromoléculas lentamente metabolizadas, grandes como proteínas, polissacarídeos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos

10 poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados de lipídeos (como gotículas de óleo ou lipossomas), e partículas de vírus inativo. Tais veículos são bem conhecidos por aqueles com conhecimentos comuns na técnica. adicionalmente, esses veículos podem funcionar como agentes

15 imunoestimuladores ("adjuvantes"). A imunização do animal pode ser realizada com adjuvantes e/ou veículos farmacêuticos. Proteínas de veículo convencionais incluem, porém não são limitadas a, hemocianina de lapa californiana, proteínas de soro como transferrina, albumina

20 de soro bovino, ou albumina de soro humano, uma ovalbumina, imunoglobulinas, ou hormônios como insulina. O veículo pode estar presente juntamente com um adjuvante ou independentemente do mesmo.

A seguir, a composição ou composições de constructo de

ácido nucléico pretendem abranger composições úteis para uso profilático e terapêutico, incluindo estimular uma resposta imune em um paciente. É adicionalmente considerado que a composição da invenção não induz qualquer reação de toxicidade local ou sistêmica ou quaisquer outros efeitos colaterais.

Em uma modalidade preferida, a frase 'composição' como utilizado aqui se refere a uma composição para sensibilizar uma resposta imune.

10 Em uma modalidade preferida o constructo de ácido nucléico é acondicionado. Acondicionamento significa que o constructo de ácido nucléico inclui meio selecionado de, porém não limitado ao grupo de: vetores baseados em DNA ou baseados em RNA, veículos baseados em lipídeo, vetores de expressão viral, vetores de distribuição viral, revestimento de partículas de ouro coloidais e microesferas de polímero biodegradáveis. Quaisquer dos meios de distribuição anteriormente mencionados podem ser desse modo utilizados para fins de embalagem para uso em uma
15
20 composição.

Em uma modalidade o meio de acondicionamento do constructo de ácido nucléico é um vetor de expressão viral selecionado de, porém não limitado ao grupo de: adenovírus, retrovírus, lentivírus, vírus adeno-associado, vírus de

herpes, vírus de vacínia e vetor de vírus de DNA. O vetor viral pode ser um vetor viral deficiente em replicação ou condicionalmente deficiente em replicação.

Um aspecto da invenção se refere a uma composição que
5 compreende pelo menos dois vetores. Isso abrange que qualquer uma ou duas constructos de ácido nucléico diferentes como descrito pode ser acondicionada pelo menos em dois vetores, esses vetores sendo de um tipo como descrito em qualquer dos acima. A invenção refere-se ainda
10 a uma composição compreendendo três, quatro, cinco ou seis vetores. Novamente, esses vetores podem diferir entre si ou não, e podem conter constructos de ácido nucléico idênticas ou diferentes como descrito acima. Um aspecto adicional da presente invenção refere-se a uma composição compreendendo
15 pelo menos uma proteína quimérica como codificado por qualquer um dos constructos de ácido nucléico descritos aqui. Quando uma proteína ou polipeptídeo quimérico deve ser utilizado como imunógeno, pode ser produzido por expressão de qualquer uma ou mais dos constructos de ácido
20 nucléico descritas acima em uma célula recombinante ou pode ser preparado por síntese química por métodos conhecidos na arte. Como descrito acima, tais proteínas quiméricas e/ou peptídeos podem ser acoplados a veículos para aumentar a resposta imunológica às proteínas/peptídeos e podem ser

administradas com ou sem um adjuvante e/ou excipiente.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se ao uso do constructo de ácido nucléico como descrito aqui para a produção de uma composição.

5 Intensificação de uma resposta imune: adjuvantes tradicionais

Adjuvantes podem ser incluídos na composição para intensificar a resposta imune específica. Desse modo, é particularmente importante identificar um adjuvante que
10 quando combinado com o(s) antígeno(s)/constructos de ácido nucléico e/ou veículos de distribuição (qualquer um dos quais pode ser também referido como determinante imunogênico) resulta em uma composição capaz de induzir uma resposta imunológica específica forte. O determinante
15 imunogênico pode ser também misturado com dois ou mais adjuvantes diferentes antes da imunização. As composições são também mencionadas como composições imunogênicas no presente texto.

Um grande número de adjuvantes foi descrito e
20 utilizado para a geração de anticorpos em animais de laboratório, como camundongo, ratos e coelhos. Em tal cenário a tolerância de feito colateral é bem elevada visto que o principal objetivo é obter uma resposta forte de anticorpo. Para uso e para aprovação para uso em produtos

farmacêuticos, e especialmente para uso em seres humanos é necessário que os componentes da composição, incluindo o adjuvante, sejam bem caracterizados. É adicionalmente exigido que a composição tenha risco mínimo de qualquer
5 reação adversa, como granuloma, abscessos ou febre.

Uma modalidade da presente invenção refere-se a uma composição compreendendo um adjuvante. Em uma modalidade preferida a composição é apropriada para administração a um mamífero, como um ser humano. Portanto, o adjuvante
10 preferido é apropriado para administração a um mamífero e mais preferivelmente é apropriado para administração a um ser humano.

Em outra modalidade preferida a composição é apropriada para administração a um pássaro ou peixe, e mais
15 preferivelmente a uma galinha (*Gallus gallus domesticus*). Portanto, o adjuvante preferido é apropriado para administração a um pássaro ou um peixe.

A escolha de adjuvante pode ser adicionalmente selecionada por sua capacidade em estimular o tipo de
20 resposta imune desejada, ativação de célula B ou/e célula T e a composição pode ser formulada para otimizar distribuição e apresentação para os tecidos linfáticos relevantes.

Adjuvantes pertinentes a presente invenção podem ser

agrupados de acordo com sua origem, seja mineral, bacteriana, de planta, sintética ou produto hospedeiro. O primeiro grupo de acordo com essa classificação são os adjuvantes minerais, como compostos de alumínio. Antígenos precipitados com sais de alumínio ou antígenos misturados com ou adsorvidos a compostos de alumínio realizados foram utilizados extensamente para aumentar respostas imunes em animais e seres humanos. Partículas de alumínio foram demonstradas em linfonodos regionais de coelhos sete dias após imunização, e pode ser que outra função significativa seja dirigir antígeno para áreas contendo célula T nos próprios nodos. A potência de adjuvante foi mostrada como correlacionando com insinuação dos linfonodos de drenagem. Embora muitos estudos confirmassem que antígenos administrados com sais de alumínio levam à imunidade humoral aumentada, a imunidade mediada por célula parece ser somente levemente aumentada, como medido por hipersensibilidade do tipo retardada. Hidróxido de alumínio também foi descrito como ativando a via de complemento. Esse mecanismo pode desempenhar um papel na resposta inflamatória local bem como produção de imunoglobulina e memória de célula B, além disso, hidróxido de alumínio pode proteger o antígeno de catabolismo rápido. Principalmente devido ao seu excelente registro de segurança, compostos de

alumínio são atualmente os únicos adjuvantes utilizados em seres humanos.

Outro grande grupo de adjuvantes é aquele de origem bacteriana. Adjuvantes com origem bacteriana podem ser purificados e sintetizados (por exemplo, dipeptídeos de muramila, lipídeo A) e mediadores hospedeiros foram clonados (interleucina 1 e 2). A última década trouxe progresso significativo na purificação química de vários adjuvantes de componentes ativos de origem bacteriana:

10 *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, lipopolissacarídeo, adjuvante completo de Freund (FCA) e adjuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) e Adjuvante Merck 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.).

Adicionalmente, adjuvantes apropriados de acordo com a

15 presente invenção são, por exemplo, adjuvante clássico Titermax (SIGMA-ALDRICH), ISCOMS, Quil A, ALUN, vide US 5.876.735 e 5.554.372, derivados de lipídeo A, derivados de coleratoxina, derivados de HSP, derivados de LPS, matrizes de peptídeo sintético, GMDP e outro bem como combinado com

20 imunoestimuladores (US 5.876.735). *B. pertussis* é de interesse como adjuvante no contexto da presente invenção devido a sua capacidade em modular imunidade mediada por célula através da ação sobre populações de linfócito-T. para lipopolissacarídeo e adjuvante completo de Freund,

frações ativas de adjuvante foram identificadas e sintetizadas que permitem estudo de relações de função-estrutura. Esses são também considerados para inclusão em composições imunogênicas de acordo com a presente invenção.

5 Verificou-se que lipopolissacarídeo (LPS) e seus vários derivados, incluindo lipídeo A, são adjuvantes poderosos em combinação com lipossomas ou outras emulsões de lipídeo. Não é certo ainda se derivados com toxicidade suficientemente baixa para uso geral em seres humanos podem
10 ser produzidos. Adjuvante completo de Freund é o padrão na maioria dos estudos experimentais.

Óleo mineral pode ser adicionado à composição imunogênica para proteger o antígeno de catabolismo rápido.

Muitos outros tipos de materiais podem ser utilizados
15 como adjuvantes em composições imunogênicas de acordo com a presente invenção. Incluem produtos de planta como saponina, produtos de animais como quitina e inúmeros produtos químicos sintéticos.

Adjuvantes, de acordo com a presente invenção, podem
20 ser também categorizados por seus mecanismos de ação propostos. Esse tipo de classificação é necessariamente de certo modo arbitrário porque a maioria dos adjuvantes parece funcionar por mais de um mecanismo.

Adjuvantes podem atuar através de localização e

distribuição de antígeno ou por efeitos diretos sobre células que compõem o sistema imune, como macrófagos e linfócitos. Outro mecanismo pelo qual adjuvante de acordo com a invenção intensificam a resposta imune é por criação
5 de um depósito de antígeno. Isso parece contribuir para a atividade de adjuvante de compostos de alumínio, emulsões de óleo, lipossomas, e polímeros sintéticos. A atividade de adjuvante de lipopolissacarídeos e dipeptídeos de muramila parece ser mediada principalmente através da ativação do
10 macrófago, ao passo que B. Pertussis afeta tanto macrófagos como linfócitos. Exemplos adicionais de adjuvantes que podem ser úteis quando incorporados em composições imunogênicas de acordo com a presente invenção são descritos em US 5.554.372.

15 Adjuvantes úteis em composições de acordo com a presente invenção podem ser desse modo sais minerais, como hidróxido de alumínio e géis de fosfato de cálcio ou alumínio, emulsões de óleo e formulações baseadas em tensoativo como QS21 (saponina purificada), AS02 (SBAS2,
20 emulsão de óleo em água + lipídeo monofosforila A (MPL) + QS21), Montanide ISA 51 e ISA-720 (emulsão de água em óleo estabilizada), Adjuvante 65 (contendo óleo de amendoim, monooleato de manide e monoestearato de alumínio), RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Utah), adjuvantes em

partículas, como virosomas (veículos lipossomais unilamelares incorporando hemaglutina de influenza), AS04 (sal de Al com MPL), ISCOMS (complexo estruturado de saponinas e lipídeos (como colesterol), co-glicolide de polilactide (PLG), derivados microbianos (naturais e sintéticos) como lipídeo A de monofosforila (MPL), Detox (MPL + esqueleto de parede de célula M. Phlei), AGP (RC-529 (monossacarídeo acrilado sintético)), DC_chol (imunostimuladores lipídais capazes de auto-organizar-se em lipossomas), OM-174 (derivado de lipídeo A), motivos CpG (oligonucleotídeos sintéticos contendo motivos CpG imunostimuladores), toxinas bacterianas modificadas, LT e CT, com efeitos adjuvantes não tóxicos, imunomoduladores humanos endógenos, por exemplo, hGM-CSF ou hIL-12 ou Immudaptin (conjunto tandem C3d), veículos inertes como partículas de ouro.

Exemplos adicionais de adjuvantes compreendem: emulsões de óleo imunostimuladoras (por exemplo, água em óleo, óleo em água, água em óleo em água como, por exemplo, adjuvante incompleto de Freund, como Montanide®, Specol, sais minerais como, por exemplo, $\text{Al}(\text{OH})_3$, AlPO_4 , produtos microbianos, Saponinas como Qual A, produtos sintéticos, bem como formulações adjuvantes, e complexos estimuladores imunes (ISCOMs) e citosinas, componentes/bactérias

inativadas por calor, nanocontas, LPS, LTA. Uma lista de outros adjuvantes comumente utilizados é revelada nas páginas 6-8 em WO 2003/089471, a lista sendo pelo presente incorporada a título de referência.

5 Composições imunogênicas de acordo com a invenção também podem conter diluentes como tampões, antioxidantes como ácido ascórbico, polipeptídios de baixo peso molecular (menor do que aproximadamente 10 resíduos), proteínas, aminoácidos, carboidratos incluindo glicose, sacarose ou
10 dextrinas, agentes de quelação como EDTA, glutathione e outros estabilizadores e excipientes. Solução salina tamponada neutra ou solução salina misturada com albumina de soro não específica são diluentes apropriados exemplares.

15 Adjuvantes são genericamente incluídos nas composições imunogênicas em uma quantidade de acordo com as instruções do fabricante.

Intensificação de uma Resposta Imune: adjuvantes não tradicionais

20 *Modulação de citosina*

Para uma vacina ser eficaz, deve induzir uma resposta imune apropriada para um dado patógeno. Isso pode ser realizado por modificações na forma de antígeno expresso (isto é, intracelular VS. Secretado), o método e via de

distribuição, e a dose de DNA distribuída. Entretanto, também pode ser realizado pela co-administração de DNA de plasmídeo (pDNA) codificando moléculas reguladores imunes, por exemplo, citosinas, linfocinas ou moléculas co-estimuladoras. Esses "adjuvantes genéticos", juntamente com quaisquer dos 'adjuvantes tradicionais' ou 'outros adjuvantes imunoestimuladores' como delineado aqui, podem ser administrados em diversos modos:

. como uma mistura de 2 plasmídeos separados, um codificando o imunógeno e o outro codificando a citosina;

. como um vetor bi- ou policistrônico único, separado por regiões espaçadoras; ou

. como uma quimera codificada por plasmídeo, ou proteína de fusão; ou

. em sua forma nativa, isto é, uma proteína ou nucleotídeo.

Em geral, a co-administração de agentes pró-inflamatórios (como várias interleucinas, fator de necrose tumoral e GM-CSF) mais citosinas que induzem TH2 aumentam as respostas de anticorpo, ao passo que agentes pró-inflamatórios e citosinas que induzem TH1 diminuem respostas humorais e aumentam respostas citotóxicas (que é mais importante em proteção viral, por exemplo). As moléculas co-estimuladoras como B7-1, B7-2 e CD40L são

também utilizadas às vezes.

Esse conceito foi aplicado com sucesso em administração tópica de pDNA codificando IL-10. B7-1 codificado por plasmídeo (um ligando em APCs) aumentou com
 5 sucesso a resposta imune em modelos anti-tumor, e a mistura de plasmídeos codificando GM-CSF e a proteína circunsporozoite de *P. yoelii* (PyCSP) aumentou a proteção contra desafio subsequente (ao passo que PyCSP codificada por plasmídeo individualmente não aumentou). GM-CSF pode
 10 fazer com que células dendríticas apresentem antígeno mais eficientemente, e aumentem a produção de IL-2 e ativação de célula TH, desse modo acionando a resposta imune aumentada. Isso pode ser adicionalmente aumentado por primeiramente sensibilizar com uma mistura de pPyCSP e pGM-CSF, e
 15 posteriormente reforçar com um PyCSP que expressa poxvirus recombinante. Entretanto, a co-injeção de plasmídeos codificando Gm-CSF (ou IFN- γ ou IL-2) e uma proteína de fusão de proteína de superfície de merozoite *P. chabaudi* 1 proteína de superfície de vírus de hepatite B (Extremidade-
 20 C) (PcMSP1-HBs) na realidade aboliu proteção contra desafio, em comparação com proteção adquirida por distribuição de pPcMSP-1-HBs individualmente.

Outros adjuvantes imunoestimuladores

Em uma modalidade, qualquer um dos seguintes pode ser

utilizado como um adjuvante imunoestimulador para o constructo de ácido nucléico ou composição de acordo com a presente invenção:

LPS (lipopolissacarídeo), Poli-IC (poli-inositol
5 citosina) ou qualquer outro adjuvante que lembre RNA de fita dupla, LL37, RIG-1 helicase, IL-12, IL-18, CCL-1, CCL-5, CCL-19, CCL-21, GM-CSF, CX3CL, CD86, PD-1, PD-1 secretado, IL10-R, IL10-R secretado, IL21, ICOSL, 41BBL, CD40L e qualquer outra proteína ou sequência de ácido
10 nucléico que estimule uma resposta imune.

Em uma modalidade, o adjuvante imunoestimulador é fundido com uma proteína de fibra adenoviral. Por exemplo, CX3CL pode ser fundido com proteínas de fibra adenoviral.

Motifes imunoestimuladores CpG

15 O próprio DNA plasmídico parece ter um efeito adjuvante no sistema imune. Verificou-se que DNA de plasmídeo derivado de bactérias desencadeia mecanismos de defesa imune inatos, a ativação de células dendríticas, e a produção de citosinas TH1. Isso se deve ao reconhecimento
20 de certas seqüências de dinucleotídeo CpG que são imunoestimuladoras. Seqüências estimuladoras de CpG (CpG-S) ocorrem vinte vezes mais freqüentemente em DNA derivado bacterianamente do que em eucariotas. Isso é porque eucariotas apresentam "supressão de CpG" - isto é, pares de

dinucleotídeo de CpG ocorrem muito menos freqüentemente do que esperado. Adicionalmente, seqüências de CpG-S são hipometiladas. Isso ocorre freqüentemente em DNA bacteriano, enquanto motivos CpG ocorrendo em eucariotas

5 são todos metilados no nucleotídeo de citosina. Ao contrário, seqüências de nucleotídeo que inibem a ativação de uma resposta imune (denominada neutralização de CpG ou CpG-N) são representadas em excesso em genomas eucarióticos. Verificou-se que a seqüência

10 imunoestimuladora ótima é um dinucleotídeo de CpG não metilado flanqueado por duas purinas 5' e duas pirimidinas 3'. Adicionalmente, regiões de flanquear fora desse hexâmero imunoestimulador são opcionalmente ricos de guanina para assegurar ligação e absorção em células alvo.

15 O sistema imune inato trabalha sinergisticamente com o sistema imune adaptável para montar uma resposta contra a proteína codificada por DNA. Seqüências de CpG-S induzem ativação de célula-B policlonal e a regulação ascendente de expressão e secreção de citosina. Macrófagos estimulados

20 secretam IL-12, IL-18, TNF- α , IFN- α , IFN- β e IFN- γ , enquanto células B estimuladas secretam IL-6 e um pouco de IL-12. A manipulação de seqüências de CpG-S e CpG-N na espinha dorsal de plasmídeo de vacinas de DNA pode assegurar o sucesso da resposta imune ao antígeno

codificado, e acionar a resposta imune em direção a um fenótipo TH1. Isso é útil se um patógeno exigir uma resposta TH para proteção. Sequências de CpG-S foram também utilizadas como adjuvantes externos tanto para DNA como
5 vacinação de proteína recombinante com taxas de sucesso variáveis. Outros organismos com motivos CpG hipometilados também demonstraram a estimulação de expansão de célula B policlonal. Entretanto, o mecanismo por trás disso pode ser mais complicado do que metilação simples - não se verificou
10 que DNA de murino hipometilado monte uma resposta imune.

Formulações de DNA

A eficiência de imunização de DNA pode ser aperfeiçoada por estabilizar DNA contra degradação, e aumentar a eficiência de distribuição de DNA em células que
15 apresentam antígeno. Isso pode ser obtido por revestir micropartículas catiônicas biodegradáveis (como poli(lactide-co-glicolide) formuladas com brometo de cetil trimetil amônio) com DNA. Tais micropartículas revestidas com DAN podem ser tão eficazes em elevar CTL quanto vírus
20 de vacínia recombinante, especialmente quando misturado com alum. Partículas com 300 nm de diâmetro parecem ser mais eficientes para absorção por células que apresentam antígeno.

Administração

Constructos de ácido nucléico e composições de acordo com a invenção podem ser administrados a um indivíduo em quantidades terapeuticamente eficazes. A quantidade eficaz pode variar de acordo com uma variedade de fatores como a
5 condição do indivíduo, peso, sexo e idade. Outros fatores incluem o modo de administração.

Em uma modalidade, o constructo de ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode ser distribuída a um sujeito na forma de DNA, RNA, LNA, PNA, INA, TINA, HNA,
10 ANA, CNA, CeNA, GNA, TNA, Gap-mers, Mix-mers, Morfolinos ou qualquer combinação dos mesmos.

Em uma modalidade, o constructo de ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode ser distribuído a um sujeito na forma de DNA.

15 Em outra modalidade, o constructo de ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode ser distribuído a um sujeito na forma de DNA. Desse modo, o constructo de ácido nucléico pode ser transcrito em RNA antes da administração.

Ainda em outra modalidade, o constructo de ácido
20 nucléico de acordo com a presente invenção pode ser distribuído a um sujeito na forma de proteína. Desse modo, o constructo de ácido nucléico pode ser traduzido em proteína antes da administração.

Na modalidade na qual o constructo de ácido nucléico

de acordo com a presente invenção é distribuído a um
sujeito na forma de uma proteína, a proteína pode ter sido
modificada para aumentar a estabilização e/ou otimizar a
distribuição na célula. A proteína pode ter estabilidade
5 aumentada devido à presença de ligações de dissulfeto (por
exemplo, US 5,102,985 soluções tratadas de proteínas em
forma reduzida com peróxido de hidrogênio para gerar
proteínas tendo uma ponte de dissulfeto intramolecular em
90 - 96% de rendimento), um aumento em resíduos polares,
10 otimização de carga de superfície, pontes de sal de
superfície, encapsulação (por exemplo, com silicato
mesoporoso) ou a proteína pode ser ligada a proteínas de
choque térmico (como Hsp-60, Hsp-70, Hsp-90, Hsp20, Hsp-27,
Hsp-84 e outros), domínio de translocação tat HIV,
15 proteínas de fibra adenoviral ou quaisquer outras proteínas
ou domínios.

As composições farmacêuticas ou veterinárias podem ser
fornecidas ao indivíduo por uma variedade de vias como
subcutânea (sc ou s.c.), tópica, oral e intramuscular (im
20 ou i.m.) a administração de composições farmacêuticas é
realizada por via oral ou parenteral. Os métodos de
distribuição parenteral incluem administração tópica,
intra-arterial (diretamente no tecido), intramuscular,
intracerebral (ic ou i.c.), subcutânea, intramedular,

intratecal, intraventricular, intravenosa (iv ou i.v.), intraperitoneal ou intranasal. A presente invenção também tem o objetivo de fornecer formulações farmacêuticas tópicas, orais, sistêmicas e parenterais, apropriadas, para
5 uso nos métodos de sensibilizar uma resposta imune com a composição.

Por exemplo, as composições podem ser administradas em tais formas de dosagem oral como tabletes, cápsulas (cada incluindo liberação regulada e formulações de liberação
10 controlada), pílulas, pós, grânulos, elixires, tinturas, soluções, suspensões, xaropes e emulsões ou por injeção. De modo semelhante, também podem ser administrados em forma intravenosa (tanto bolo como infusão), intraperitoneal, subcutânea, tópica com ou sem oclusão, ou intramuscular,
15 todas utilizando formas bem conhecidas por aqueles com conhecimentos comuns na técnica farmacêutica. Uma quantidade eficaz, porém não tóxica da composição, compreendendo qualquer um dos compostos aqui descrito pode ser empregada. Além disso, todas e quaisquer formas de
20 dosagem convencionais que são conhecidas na arte como sendo apropriadas para formular composição de peptídeo imunogênica injetável são abrangidas, como formas e soluções liofilizadas, suspensões ou formas de emulsão contendo, se necessário, veículos farmacêuticamente

aceitáveis convencionais, diluentes, preservativos, adjuvantes, componentes de tampão, etc.

Em uma modalidade, a composição para sensibilização e/ou vacina de reforço subsequente é dada como uma
5 formulação de liberação lenta ou controlada.

Modos de administração preferidos do constructo ou composição de ácido nucléico de acordo com a invenção incluem, porém não são limitadas à administração sistêmica, tal como, administração intravenosa ou subcutânea,
10 administração intradérmica, administração intramuscular, administração intranasal, administração oral, administração retal, administração vaginal, administração pulmonar e genericamente qualquer forma de administração de mucosa. Além disso, está compreendido no escopo da presente
15 invenção que o meio para qualquer das formas de administração mencionadas aqui é incluído na presente invenção.

Um constructo de ácido nucléico ou composição de acordo com a presente invenção pode ser administrado de uma
20 vez, ou qualquer número de vezes como duas, três, quatro ou cinco vezes.

Em uma modalidade preferida, o constructo de ácido nucléico ou composição é administrado uma vez, seguido por administração de uma vacina apropriada.

Em outra modalidade preferida, o constructo de ácido nucléico ou composição é administrado como uma série de administrações antes da administração da vacina. Tal série pode compreender administrar o constructo de ácido nucléico
5 ou composição diariamente, cada segundo dia, cada terceiro dia, cada quarto dia, cada quinto dia, cada sexto dia, semanalmente, bi-semanalmente, ou a cada terceira semana para um total de uma, duas, três, quatro ou cinco vezes.

Em uma modalidade, o período de tempo entre a
10 primeira administração do constructo de ácido nucléico ou composição para sensibilizar o sistema imune e em segundo lugar a vacina para reforço é separado pelo menos em um dia, como separado pelo menos em dois dias, por exemplo, separado em três dias, como pelo menos separado em quatro
15 dias, por exemplo separado em cinco dias, como separado pelo menos em seis dias, por exemplo, separado em sete dias, como pelo menos separado em oito dias, por exemplo separado em nove dias, como pelo menos separado em dez dias, por exemplo separado em quinze dias, como pelo menos
20 separado em vinte dias, por exemplo, separado em vinte e cinco dias.

A sensibilização com o constructo de ácido nucléico ou composição é desse modo destinada a ser adicionalmente reforçada por administrar uma vacina. A administração pode

estar em uma forma ou parte de corpo diferente da administração anterior ou similar à administração anterior.

A injeção de reforço é uma injeção de reforço homóloga ou heteróloga. Uma injeção de reforço homóloga é onde a
5 primeira administração e administrações subseqüentes compreendem os mesmos constructos e mais especificamente o mesmo veículo de distribuição. Uma injeção de reforço heteróloga é onde constructos idênticos são compreendidos em vetores diferentes.

10 Uma forma de administração preferida da composição de acordo com a presente invenção é administrar a composição na área do corpo, dentro ou fora, mais provável de ser o receptáculo de uma dada infecção. O receptáculo de infecção é a área do corpo na qual a infecção é recebida, por
15 exemplo, em relação à influenza, o receptáculo de infecção são os pulmões.

O constructo de ácido nucléico ou composição da presente invenção pode ser administrado em qualquer organismo ao qual pode ser vantajoso, especialmente
20 qualquer animal como um animal vertebrado. Está compreendido dentro do escopo da presente invenção que o meio e modos de administração da composição são adaptados ao receptor.

Um receptor preferido da composição é um mamífero e o

mamífero é em uma modalidade mais preferida da presente invenção selecionado do grupo de vacas, porcos, cavalos, carneiros, cabras, lhamas, camundongos, ratos, macacos, cães, gatos, furões e seres humanos. Na modalidade mais
5 preferida o mamífero é um ser humano.

Outro receptor preferido da composição é qualquer vertebrado da classe de aves (pássaro), como *Gallus gallus domesticus* (galinha).

Uma modalidade da presente invenção inclui uma
10 composição compreendendo ainda um segundo ingrediente ativo. O segundo ingrediente ativo é selecionado de, porém não limitado ao grupo de adjuvantes, antibióticos, quimioterapêuticos, anti-alergênicos, citosinas, fatores de complemento e moléculas co-estimuladoras do sistema imune.

15 Outra modalidade da presente invenção compreende um kit e partes, em que o kit inclui pelo menos um constructo de ácido nucléico ou composição de acordo com qualquer um do acima, um meio para administrar o constructo de ácido nucléico ou composição e a instrução sobre como fazer isso.
20 Está compreendido dentro do escopo da presente invenção incluir múltiplas dosagens da mesma composição ou várias composições diferentes. Em uma modalidade preferida o kit de partes compreende ainda um segundo ingrediente ativo. Em uma modalidade mais preferida, o segundo ingrediente ativo

é uma vacina apropriada, isto é, uma vacina capaz de reforçar a resposta imune criada por sensibilização anterior da resposta imune.

A presente invenção compreende ainda um método para
5 potenciar uma resposta imune em um animal, compreendendo administrar ao animal um constructo de ácido nucléico ou composição de acordo com qualquer um dos acima, seguido por administrar uma vacina apropriada, desse modo sensibilizando e reforçando o sistema imune de um sujeito.

10 A resposta imune pode ser, porém não é limitada a, qualquer um dos seguintes tipos de respostas: uma resposta dependente de MHC-I, uma resposta dependente de MHC-I e/ou MHC-II, uma resposta dependente de célula T, uma resposta dependente de célula T CD4+, uma resposta independente de
15 célula T CD4+, uma resposta dependente de célula T CD8+ e uma resposta imune dependente de célula B. vacinas apropriadas são aquelas que são capazes de reforçar o sistema imune subsequente à sensibilização do sistema imune com o constructo de ácido nucléico ou composição de acordo
20 com a presente invenção.

Em uma modalidade adicional, a presente invenção refere-se a um método de tratamento de um indivíduo necessitando da mesma, compreendendo administrar a composição com descrito aqui acima para tratar uma condição

clínica no indivíduo.

Aumento da potência de uma vacina

Uma modalidade da invenção se refere a um constructo de ácido nucléico que codifica pelo menos uma cadeia invariante ou variante da mesma e pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo ou fragmento de uma proteína antigênica ou peptídeo, em que pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo ou fragmento de uma proteína antigênica ou peptídeo é de um vírus, bactéria ou parasita.

Dados apresentados aqui mostram que não é simples desenvolver regimes de reforço de sensibilização utilizando constructos de ácido nucléico compreendendo cadeia invariante ou variante da mesma. Desse modo, como apresentado na figura 1, um constructo de DNA nu compreendendo cadeia invariante e um antígeno (DNA-liGP) é capaz de sensibilizar uma resposta imune, ao passo que um constructo de DNA nu compreendendo um antígeno porém não cadeia invariante (DNA-GP) não é capaz de sensibilizar uma resposta imune. Além disso, os dados apresentados na figura 12 mostram que um vetor adenoviral compreendendo um antígeno (AdGP) é capaz de sensibilizar certas (Ad-liGP) porém não todas as respostas imunes (Ad-GP), ao passo que dados apresentados na figura 13 mostram que um vetor adenoviral compreendendo cadeia invariante com um antígeno

(Ad-liGP) não é capaz de sensibilizar quaisquer respostas imunes (Ad-liGP e Ad-GP) sob regimes de tratamento e dosagem normais. Entretanto, é possível otimizar sensibilização Ad-liGP de um reforço Ad-liGP utilizando
5 doses mais baixas de Ad-liGP para sensibilização (como mostrado na figura 14).

É um objetivo da presente invenção fornecer um constructo de ácido nucléico codificando pelo menos uma cadeia invariante e um antígeno viral, bacteriano ou
10 parasítico ou um fragmento do mesmo, em que a cadeia invariante é uma variante de cadeia invariante, para sensibilizar uma resposta imune, em que a sensibilização é seguida por uma vacinação de reforço subsequente com uma vacina de câncer. O variante de cadeia invariante pode ser
15 qualquer variante como especificado em outro lugar aqui, compreendendo cadeia invariante em que os resíduos de aminoácidos li-KEY LRMK foram alterados, por exemplo, por deleção ou substituição, ou em que parte da região CLIP foi alterada, por exemplo, por deleção ou substituição.

20 Em uma modalidade, a presente invenção é dirigida ao uso de um constructo de ácido nucléico para aumentar a potência de uma vacina.

Em uma modalidade, a presente invenção revela um método para aumentar a potência de uma vacina compreendendo

as etapas de:

a) Fornecer um constructo de ácido nucléico que compreende cadeia invariante ou um variante da mesma e um peptídeo antigênico ou fragmento do mesmo,

5 b) Sensibilizar o sistema imune de um sujeito por administrar o constructo de ácido nucléico da etapa (a), desse modo estimulando uma resposta imune no sujeito, e

c) Reforçar a resposta imune da etapa (b) por administrar uma vacina apropriada.

10 Em uma modalidade, a presente invenção revela um método para aumentar a potência de uma vacina compreendendo as etapas de:

a) Fornecer um constructo de ácido nucléico que compreende um variante de cadeia invariante e um peptídeo
15 antigênico ou fragmento do mesmo,

b) Sensibilizar o sistema imune de um sujeito por administrar o constructo de ácido nucléico da etapa (a) desse modo estimulando uma resposta imune no sujeito, e

c) Reforçar a resposta imune da etapa (b) por
20 administrar uma vacina apropriada,

Em que a variante de cadeia invariante compreende alteração dos resíduos de aminoácido LRMK li-KEY, por exemplo, por deleção ou substituição.

Em uma modalidade, a presente invenção revela um

método para aumentar a potência de uma vacina compreendendo as etapas de:

a) Fornecer um constructo de ácido nucléico que compreende um variante de cadeia invariante e um peptídeo antigênico ou fragmento do mesmo,

b) Sensibilizar o sistema imune de um sujeito por administrar o constructo de ácido nucléico da etapa (a) desse modo estimulando uma resposta imune no sujeito, e

c) Reforçar a resposta imune da etapa (b) por administrar uma vacina apropriada, em que a variante de cadeia invariante compreende alteração da região CLIP, por exemplo, por deleção ou substituição.

Em uma modalidade, a presente invenção revela um método para aumentar a potência de uma vacina compreendendo as etapas de:

a) Fornecer um constructo de ácido nucléico que compreende um variante de cadeia invariante e um peptídeo antigênico ou fragmento do mesmo,

b) Sensibilizar o sistema imune de um sujeito por administrar o constructo de ácido nucléico da etapa (a) desse modo estimulando uma resposta imune no sujeito, e

c) Reforçar a resposta imune da etapa (b) por administrar uma vacina apropriada,

Em que a variante de cadeia invariante não compreende

os 17 primeiros aminoácidos.

Em outra modalidade, a presente invenção é dirigida ao uso de um constructo de ácido nucléico para sensibilização de uma resposta imune.

5 Em uma modalidade, a presente invenção revela um método para sensibilização de uma resposta imune compreendendo as etapas de:

 a) Fornecer um constructo de ácido nucléico que compreende uma cadeia invariante ou um variante da mesma e
10 um peptídeo antigênico ou fragmento do mesmo,

 b) Sensibilizar o sistema imune de um sujeito por administrar o constructo de ácido nucléico da etapa (a) desse modo estimulando uma resposta imune no sujeito, e

 c) Reforçar a resposta imune da etapa (b) por
15 administrar uma vacina apropriada.

Em uma modalidade, a presente invenção revela um método para sensibilização de uma resposta imune compreendendo as etapas de:

 a) Fornecer um constructo de ácido nucléico que
20 compreende um variante de cadeia invariante e um peptídeo antigênico ou fragmento do mesmo,

 b) Sensibilizar o sistema imune de um sujeito por administrar o constructo de ácido nucléico da etapa (a) desse modo estimulando uma resposta imune no sujeito, e

c) Reforçar a resposta imune da etapa (b) por administrar uma vacina apropriada, em que a variante de cadeia invariante compreende alteração dos resíduos de aminoácido LRMK li-KEY, por exemplo, por deleção ou substituição.

Em uma modalidade, a presente invenção revela um método para sensibilização de uma resposta compreendendo as etapas de:

a) Fornecer um constructo de ácido nucléico que compreende um variante de cadeia invariante e um peptídeo antigênico ou fragmento do mesmo,

b) Sensibilizar o sistema imune de um sujeito por administrar o constructo de ácido nucléico da etapa (a) desse modo estimulando uma resposta imune no sujeito, e

c) Reforçar a resposta imune da etapa (b) por administrar uma vacina apropriada, em que a variante de cadeia invariante compreende alteração da região CLIP, por exemplo, por deleção ou substituição.

Em uma modalidade, a presente invenção revela um método para sensibilização de uma resposta compreendendo as etapas de:

a) Fornecer um constructo de ácido nucléico que compreende um variante de cadeia invariante e um peptídeo antigênico ou fragmento do mesmo,

b) Sensibilizar o sistema imune de um sujeito por administrar o constructo de ácido nucléico da etapa (a) desse modo estimulando uma resposta imune no sujeito, e

c) Reforçar a resposta imune da etapa (b) por
5 administrar uma vacina apropriada,
em que a variante de cadeia invariante não compreende os 17
primeiros aminoácidos.

Aumento da potência de uma vacina contra câncer

Uma modalidade da invenção refere-se a um constructo
10 de ácido nucléico codificando pelo menos uma cadeia
invariante ou variante da mesma e pelo menos uma proteína
antigênica ou peptídeo ou fragmento de uma proteína
antigênica ou peptídeo, em que pelo menos uma proteína
antigênica ou peptídeo ou fragmento de uma proteína
15 antigênica ou peptídeo é de um antígeno de câncer ou
polipeptídeo específico de câncer.

É um objetivo da presente invenção fornecer um
constructo de ácido nucléico que codifica pelo menos uma
cadeia invariante e um antígeno de câncer ou um fragmento
20 do mesmo, em que a cadeia invariante está em sua forma
nativa, do tipo selvagem, para sensibilizar uma resposta
imune, em que a sensibilização é seguida por uma vacinação
de reforço subsequente com uma vacina contra câncer.

Também é um objetivo da presente invenção fornecer um

constructo de ácido nucléico que codifica pelo menos uma cadeia invariante e um antígeno de câncer ou um fragmento do mesmo, em que a cadeia invariante é uma variante de cadeia invariante, para sensibilizar uma resposta imune, em
5 que a sensibilização é seguida por uma vacinação de reforço subsequente com uma vacina contra câncer. A variante de cadeia invariante pode ser qualquer variante como especificado em outro lugar aqui, compreendendo cadeia invariante em que os resíduos de aminoácidos LRMK li-KEY
10 foram alterados, por exemplo, por deleção ou substituição, ou em que parte da região CLIP foi alterada, por exemplo, por deleção ou substituição ou em que os 17 primeiros aminoácidos foram deletados.

Conclui-se que quando a vacina subsequentemente
15 administrada utilizada para reforçar uma resposta imune é uma vacina contra câncer, a cadeia invariante codificada pelo constructo de ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode estar em sua forma de tipo selvagem, nativa, ou pode ser uma variante de cadeia invariante.

20 Em uma modalidade, a presente invenção é dirigida ao uso de um constructo de ácido nucléico para aumentar a potência de uma vacina contra câncer.

Em uma modalidade, a presente invenção revela um método para aumentar a potência de uma vacina contra câncer

compreendendo as etapas de:

a) Fornecer um constructo de ácido nucléico que compreende uma cadeia invariante ou uma variante da mesma e um peptídeo antigênico específico de câncer ou fragmento do mesmo,

b) Sensibilizar o sistema imune de um sujeito por administrar o constructo de ácido nucléico da etapa (a) desse modo estimulando uma resposta imune no sujeito, e

c) Reforçar a resposta imune da etapa (b) por administrar uma vacina contra câncer apropriada.

Em uma modalidade, a presente invenção revela um método para aumentar a potência de uma vacina contra câncer compreendendo as etapas de:

a) Fornecer um constructo de ácido nucléico que compreende uma cadeia invariante e um peptídeo antigênico específico de câncer ou fragmento do mesmo,

b) Sensibilizar o sistema imune de um sujeito por administrar o constructo de ácido nucléico da etapa (a) desse modo estimulando uma resposta imune no sujeito, e

c) Reforçar a resposta imune da etapa (b) por administrar uma vacina contra câncer apropriada, em que a cadeia invariante está em sua forma de tipo selvagem, nativa.

Em uma modalidade, a presente invenção revela um

método para aumentar a potência de uma vacina contra câncer compreendendo as etapas de:

a) Fornecer um constructo de ácido nucléico que compreende uma variante de cadeia invariante e um peptídeo
5 antigênico específico de câncer ou fragmento do mesmo,

b) Sensibilizar o sistema imune de um sujeito por administrar o constructo de ácido nucléico da etapa (a) desse modo estimulando uma resposta imune no sujeito, e

c) Reforçar a resposta imune da etapa (b) por
10 administrar uma vacina contra câncer apropriada,
em que a variante de cadeia invariante compreende alteração dos resíduos de aminoácidos LRMK li-KEY por, por exemplo, deleção ou substituição e/ou alteração de parte da região CLIP por, por exemplo, deleção ou substituição e/ou deleção
15 dos 17 primeiros aminoácidos de li.

Em outra modalidade, a presente invenção é dirigida ao uso de um constructo de ácido nucléico para sensibilização de uma resposta imune.

Em uma modalidade, a presente invenção revela um
20 método para sensibilização de uma resposta imune compreendendo as etapas de:

a) Fornecer um constructo de ácido nucléico que compreende uma cadeia invariante ou uma variante da mesma e um peptídeo antigênico específico de câncer ou fragmento do

mesmo,

b) Sensibilizar o sistema imune de um sujeito por administrar o constructo de ácido nucléico da etapa (a) desse modo estimulando uma resposta imune no sujeito, e

5 c) Reforçar a resposta imune da etapa (b) por administrar uma vacina contra câncer apropriada.

Em uma modalidade, a presente invenção revela um método para sensibilização de uma resposta imune compreendendo as etapas de:

10 a) Fornecer um constructo de ácido nucléico que compreende uma cadeia invariante e um peptídeo antigênico específico de câncer ou fragmento do mesmo,

b) Sensibilizar o sistema imune de um sujeito por administrar o constructo de ácido nucléico da etapa (a)

15 desse modo estimulando uma resposta imune no sujeito, e

c) Reforçar a resposta imune da etapa (b) por administrar uma vacina contra câncer apropriada,

Em que a cadeia invariante está em sua forma do tipo selvagem, nativa.

20 Em uma modalidade, a presente invenção revela um método para sensibilização de uma resposta imune compreendendo as etapas de:

a) Fornecer um constructo de ácido nucléico que compreende uma variante de cadeia invariante e um peptídeo

antigênico específico de câncer ou fragmento do mesmo,

b) Sensibilizar o sistema imune de um sujeito por administrar o constructo de ácido nucléico da etapa (a) desse modo estimulando uma resposta imune no sujeito, e

5 c) Reforçar a resposta imune da etapa (b) por administrar uma vacina contra câncer apropriada,

em que a variante de cadeia invariante compreende alteração dos resíduos de aminoácido LRMK li-KEY por, por exemplo, deleção ou substituição e/ou alteração de parte da região

10 CLIP por, por exemplo, deleção ou substituição, e/ou deleção dos 17 primeiros aminoácidos de li.

Aumentar a potência de uma vacina dirigida em uma resposta fisiológica anormal

É um objetivo da presente invenção fornecer um
15 constructo de ácido nucléico codificando pelo menos uma cadeia invariante e um polipeptídio associado a uma resposta fisiológica anormal ou um fragmento do mesmo, em que a cadeia invariante está em sua forma do tipo selvagem, nativa para sensibilizar uma resposta imune, em que a
20 sensibilização é seguida por uma vacina de reforço subsequente com uma vacina dirigida na resposta fisiológica anormal.

Também é um objetivo da presente invenção fornecer um constructo de ácido nucléico codificando pela menos uma

cadeia variante e um polipeptídeo associado a uma resposta fisiológica anormal ou um fragmento da mesma, em que a cadeia invariante é uma variante de cadeia invariante, para sensibilizar uma resposta imune, em que a sensibilização é
5 seguida por uma vacinação de reforço subsequente com uma vacina dirigida na resposta fisiológica anormal. A variante de cadeia invariante pode ser qualquer variante como especificado em outro lugar aqui, compreendendo cadeia invariante em que os resíduos de aminoácidos LRMK li-KEY
10 foram alterados, por exemplo, por deleção ou substituição, ou em que parte da região CLIP foi alterada, por exemplo, por deleção ou substituição, ou em que os 17 primeiros aminoácidos de li foram deletados.

Conclui-se que quando a vacina subsequentemente
15 administrada utilizada para reforço de uma resposta imune é uma vacina dirigida na resposta fisiológica anormal, a cadeia invariante codificada pelo constructo de ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode estar em sua forma do tipo selvagem, nativa, ou pode ser uma
20 variante de cadeia invariante.

Em uma modalidade, a presente invenção é dirigida ao uso de um constructo de ácido nucléico para aumentar a potência de uma vacina dirigida em uma resposta fisiológica anormal.

Em outra modalidade, a presente invenção é dirigida ao uso de um constructo de ácido nucléico para sensibilização de uma resposta imune.

Em uma modalidade, a presente invenção revela um
5 método para aumentar a potência de uma vacina dirigida em uma resposta fisiológica anormal compreendendo as etapas de:

a) Fornecer um constructo de ácido nucléico que compreende uma cadeia invariante ou uma variante da mesma e
10 um peptídeo antigênico ou fragmento do mesmo associado a uma resposta fisiológica anormal,

b) Sensibilizar o sistema imune de um sujeito por administrar o constructo de ácido nucléico da etapa (a) desse modo estimulando uma resposta imune no sujeito, e

15 c) Reforçar a resposta imune da etapa (b) por administrar uma vacina apropriada dirigida em uma resposta fisiológica anormal.

Em uma modalidade, a presente invenção revela um método para aumentar a potência de uma vacina dirigida em
20 uma resposta fisiológica anormal compreendendo as etapas de:

a) Fornecer um constructo de ácido nucléico que compreende uma cadeia invariante e um peptídeo antigênico ou fragmento do mesmo associado a uma resposta fisiológica

anormal,

b) Sensibilizar o sistema imune de um sujeito por administrar o constructo de ácido nucléico da etapa (a) desse modo estimulando uma resposta imune no sujeito, e

5 c) Reforçar a resposta imune da etapa (b) por administrar uma vacina apropriada dirigida em uma resposta fisiológica anormal,

em que a cadeia invariante está em sua forma do tipo selvagem, nativa.

10 Em uma modalidade, a presente invenção revela um método para aumentar a potência de uma vacina dirigida em uma resposta fisiológica anormal compreendendo as etapas de:

a) Fornecer um constructo de ácido nucléico que
15 compreende uma variante de cadeia invariante e um peptídeo antigênico ou fragmento do mesmo associado a uma resposta fisiológica anormal,

b) Sensibilizar o sistema imune de um sujeito por administrar o constructo de ácido nucléico da etapa (a)
20 desse modo estimulando uma resposta imune no sujeito, e

c) Reforçar a resposta imune da etapa (b) por administrar uma vacina apropriada dirigida em uma resposta fisiológica anormal,

em que a variante de cadeia invariante compreende alteração

dos resíduos de aminoácidos LRMK de li-KEY por, por exemplo, deleção ou substituição e/ou alteração de parte da região CLIP por, por exemplo, deleção ou substituição, e/ou deleção dos 17 primeiros aminoácidos de li.

5 Tipos de vacina

Um aspecto da presente invenção se refere à sensibilização de uma resposta imune em um sujeito por administrar um constructo de ácido nucléico compreendendo antígeno ligado em li, seguido por um reforço subsequente
10 obtido por administrar ao mesmo sujeito uma vacina apropriada.

Vacinas apropriadas de acordo com a presente invenção têm pelo menos uma característica idêntica em comum com o constructo de ácido nucléico utilizada para sensibilização
15 de uma resposta imune. A característica idêntica pode ser compreendida em parte ou total de uma cadeia invariante, a parte ou toda de um peptídeo antigênico, parte ou toda de uma estrutura de espinha dorsal como parte ou toda de uma região promotora, parte ou toda de um intensificador, parte
20 ou toda de um terminador, parte ou toda de uma cauda poli-A, parte ou toda de um ligador, parte ou toda de um poliligador, parte ou toda de um ligador operativo, parte ou toda de um sítio de clonagem múltiplo (MCS), parte ou todo de um marcador, parte ou todo de um códon de PARADA,

parte ou todo de um sítio de entrada ribossômico interno (IRES) e parte ou todo de uma sequência homóloga hospedeira para integração ou outros elementos definidos.

Em uma modalidade preferida, a característica
5 idêntica é parte ou todo de um peptídeo antigênico ou um epítipo de célula T auxiliar ubíquo. Em uma modalidade mais preferida, a característica idêntica é parte ou toda de um peptídeo antigênico.

Em outra modalidade preferida, a característica
10 idêntica é parte ou toda de cadeia invariante.

Vacinas podem ser consideradas como tradicionais ou inovadoras. Quaisquer dos tipos acima citados de vacinas podem ser utilizadas na etapa de reforço subsequente de acordo com a presente invenção.

15 Vacinas tradicionais ou vacinas de primeira geração se baseiam em organismos inteiros; cepas patogênicas que foram mortas, ou cepas com patogenicidade atenuada.

Técnicas biológicas moleculares foram utilizadas para desenvolver novas vacinas, vacinas de segunda geração, com
20 base em proteínas antigênicas individuais a partir dos organismos patogênicos. De forma conceptual, o uso de peptídeos antigênicos em vez de organismos inteiros evitaria patogenicidade enquanto fornece uma vacina contendo os antígenos mais imunogênicos. Esses incluem

vacinas à base de toxóide com base em composto tóxico inativado são bem conhecidos, e vacinas de subunidade com base em um fragmento de uma cepa patogênica atenuada ou inativada.

5 Vacinas conjugadas: certas bactérias têm revestimentos externos de polissacarídeos que são pouco imunogênicos. Por ligar esses revestimentos externos com proteínas (por exemplo, toxinas), o sistema imune pode ser levado a reconhecer o polissacarídeo como se fosse um
10 antígeno de proteína.

 Vacina de vetor recombinante: por combinar a fisiologia de um microorganismo e o DNA do outro, imunidade pode ser criada contra doenças que têm processos de infecção complexos.

15 Vacinas sintéticas são compostas principalmente ou totalmente de peptídeos sintéticos, carboidratos ou antígenos.

 Vacinas de DNA (ou genéticas), ou vacinas de terceira geração são candidatos novos e promissores para o
20 desenvolvimento de vacinas tanto profiláticas como terapêuticas. vacinas de DNA são compostas de um pequeno pedaço circular de DNA (um plasmídeo) que foi geneticamente construído para produzir um ou mais antígenos de um microorganismo. O DNA de vacina é injetado nas células do

corpo, onde a "maquinaria interna" das células hospedeiras "lê" o DNA e converte o mesmo em proteínas patogênicas. Como essas proteínas são reconhecidas como estrangeiras, são processadas pelas células hospedeiras e exibidas em sua
5 superfície, para alertar o sistema imune, que então aciona uma gama de respostas imunes. A resistência da resposta imune seguinte é determinada através de uma combinação da potência do vetor (isto é, DNA nu, vetores virais, vírus atenuado vivo, etc.), o nível de expressão do antígeno, e o
10 próprio antígeno recombinante (Isto é, aglutinantes de MHC de elevada ou baixa afinidade, determinantes estruturais selecionando por repertório de célula T ou B mais ou menos limitado, etc.). É genericamente considerado verdadeiro que a indução eficiente de memória imunológica requer ou
15 beneficia das interações de células T CD4+ (célula auxílica) com células T CD8+ (citotóxicas) e células B que mediam muitos dos efeitos de memória imune.

Em uma modalidade da presente invenção, a sensibilização de uma resposta imune com um constructo de
20 ácido nucléico de acordo com a presente invenção é seguida pela administração subsequente de uma vacina de primeira geração ou tradicional para reforçar a resposta imune.

Em uma modalidade da presente invenção, a sensibilização de uma resposta imune com um constructo de

ácido nucléico de acordo com a presente invenção é seguida pela administração subsequente de uma vacina de segunda geração para reforçar a resposta imune.

Em uma modalidade da presente invenção, a
5 sensibilização de uma resposta imune com um constructo de ácido nucléico de acordo com a presente invenção é seguida pela administração subsequente de uma vacina de terceira geração ou DNA para reforçar a resposta imune.

O uso de cadeia invariante em constructos de vacina
10 de DNA para aumentar imunogenicidade é bem conhecido no estado da técnica. Em uma modalidade da presente invenção, a sensibilização de uma resposta imune com um constructo de ácido nucléico de acordo com a presente invenção é seguida pela administração subsequente de uma vacina de DNA
15 compreendendo cadeia invariante ou uma variante da mesma para reforçar a resposta imune.

Em uma modalidade da presente invenção, a sensibilização de uma resposta imune com um constructo de ácido nucléico de acordo com a presente invenção é seguida
20 pela administração subsequente de uma vacina adenoviral para reforçar a resposta imune.

Vacinas podem ser adicionalmente monovalentes (também chamadas univalentes) ou multivalentes (também chamadas polivalentes). Uma vacina monovalente é projetada para

imunizar contra um antígeno único ou microorganismo único. Uma vacina multivalente ou polivalente é projetada para imunizar contra duas ou mais cepas do mesmo microorganismo, ou contra dois ou mais microorganismos.

5 Descrição Detalhada dos Desenhos

A Figura 1 mostra a sensibilização de DNA com uma vacina de DNA nu à base de cadeia li aumenta significativamente a geração de células CD8+T específicas de vírus após reforço subsequente com um vetor viral altamente eficiente. Os camundongos foram imunizados por 10 pistola de genes duas vezes com 3 semanas de separação com DNA-liGP, DNA-GP ou deixados não tratados. Três semanas após a última imunização, todos os camundongos foram injetados na pata da perna direita com 2×10^7 IFU Ad5-liGP, 15 e 4 semanas após os animais foram sacrificados, e esplenócitos foram analisados como descrito na figura 1. números de células T CD8+ de IFN- γ específicos de epítipo são apresentadas como média $\pm$ SE (n=5 camundongos/grupo). * indica significância estatística relativa a camundongos 20 vacinados com Ad5-liGP somente (testes de soma de classificação Mann-Whitney). Os resultados de um de dois experimentos similares são representados.

A Figura 2 mostra a localização dos domínios e as mutações testadas na sequência li. Domínios em WT li são

representados acima da barra. ESS; sinal de separação endossomal, TM; domínio de transmembrana, KEY; região de aumentar apresentação de peptídeo, CLIP; peptídeo de cadeia invariante associada a classe II, TRIM; domínio de trimerização. Extensão de mutações de deleção e substituições em li é marcada baixo da barra. A; Ad- Δ 17IiGP, b; Ad-IiLTMGP, c; Ad-IiUTMGP, d; Ad- Δ 50IiGP, e; Ad-Ii1-201GP, f; Ad-Ii1-118GP, g; Ad-Ii1-105GP, h; Ad-IiCLIPGP, i; Ad-IiKEYGP, j; Ad-Ii51-118GP.

10 A Figura 3 mostra que li aumenta dramaticamente a apresentação superficial de célula do epítipo derivado de SIINFELK/H-2kb OVA. Células dendríticas derivadas de medula óssea foram transfectadas com Ad-OVA, Ad-liOVA ou Ad-liGP (controle negativo), e coloridas superficialmente para MHC 15 classe II (colore células dendríticas maduras) e com um anticorpo específico de SIINFELK/H-2kb (epítipo de OVA).

A Figura 4 mostra que li trabalha somente em is. A) expressão de li a partir de vetores Ad-liGP e Ad-li + G; expressão de li foi normalizada para GAPDH em células COS7 20 infectadas com 50 moi de Ad-liGP e Ad-li + GP. B) proliferação de célula T restrita em GP33 TCR318 em respostas a Ad-GP, Ad-liGP ou Ad-li + BMDCs transduzidos por GP (célula dendrítica derivada de medula óssea).

A Figura 5 mostra que deleções de N-terminal e

substituições não efetuam a capacidade estimuladora de li. Proliferação de células T restritas a GP33 TCR 318 em resposta a Ad-GP, Ad-IiGP, Ad- Δ 17IiGP, Ad-IiLTMGP, Ad-IiUTMGP, BMDCs transduzidos de Ad- Δ 50IiGP (célula
5 dendrítica derivada de medula óssea).

A Figura 6 mostra que deleções de C-terminal e substituições não efetuam capacidade estimuladora de li. Proliferação de células T restritas a GP33 TCR 318 em resposta a Ad-GP, Ad-IiGP, Ad-li1-205GP, Adli1-118GP e
10 BMDCs transduzidos de Ad-li1--105GP (célula dendrítica derivada de medula óssea).

A Figura 7 mostra que somente uma deleção de N- e C-terminal reduz capacidade estimuladora de li. Proliferação de células T restrita de TCR 318 GP33 em resposta a Ad-GP, Ad-liGP, Ad-liCLIPGP, Ad-liKEYGP e BMDCs transduzidos por
15 Ad-1151-118GP (sistema de cultura de célula dendrítica derivada de medula óssea).

A Figura 8 mostra resposta de dose de vacinas Ad-GP e Ad-11GP. Grupos de camundongos foram vacinados com as
20 vacinas indicadas nas cepas indicadas. 14 dias após vacinação os camundongos foram sacrificados, e esplenócitos estimulados com os epítomos indicados. O número total de esplenócitos CD8+ específicos foi determinado por coloração intracelular e análise FACS. Os dados mostram que Ad-liGP

induz respostas em dosagens muito baixas, e desse modo a sensibilização com um Ad-liGP de dose baixa (ou qualquer antígeno) e reforço subsequente com uma dose mais elevada Ad-liGP (ou qualquer antígeno) pode ser aplicável para regimes de reforço de sensibilização homóloga.

A Figura 9 mostra uma comparação de Ad-GP, Ad-liGP e Ad-liCLIPGP para apresentação de MHC classe II (estimulação de células T CD4+). Proliferação de células T restritas a GP61-80 SMARTA em resposta a Ad-GP, Ad-liGP e BMDCs transduzidos por Ad-liCLIPGP mostram uma apresentação de antígeno MHCII aumentada de Ad-liCLIPGP.

A Figura 10 mostra uma comparação de Ad-GP, Ad-IiGP, Ad-GPLamp-1 e Ad-IiΔ17GP em um estudo de curso de tempo in vivo.

A Figura 11 mostra uma comparação de Ad-GP, Ad-IiGP, Ad-IiΔ17GP, Ad-IiKEYGP, Ad-IiCLIPGP, Ad-Ii1-117GP e Ad-Ii1-199GP respostas in vivo.

A Figura 12 mostra que Ad-GP é capaz de sensibilização de um reforço Ad-liGP subsequente. 3 grupos de camundongos C57BL/6 foram vacinados com Ad-GP. 60 dias após esses camundongos foram deixados sem serem incomodados, vacinados com Ad-GP ou vacinados com Ad-liGP. Um 4º grupo de camundongos foi incluído que foram vacinados com Ad-GP. 120 dias após as primeiras vacinações, os

camundongos foram sacrificados e células específicas de antígeno reconhecendo os epítomos indicados foram quantificadas por reestimulação ex vivo com os peptídeos e coloração intracelular para produção de interferon- γ .

5 A Figura 13 mostra que Ad-liGP não é capaz de sensibilizar um reforço de Ad-GP ou Ad-liGP subsequente. 3 grupos de camundongos C57BL/6 foram vacinados com Ad-liGP. 60 dias após esses camundongos foram deixados sem serem incomodados, vacinados com Ad-GP ou vacinados com Ad-liGP.

10 Um 4º grupo de camundongos foi incluído que foram vacinados com Ad-liGP. 120 dias após as primeiras vacinações, os camundongos foram sacrificados e células específicas de antígeno reconhecendo os epítomos indicados foram quantificadas por reestimulação ex vivo com os peptídeos e

15 coloração intracelular para produção de interferon- γ . Isso mostra que sensibilização de Ad-liGP pode não ser reforçado com Ad-liGP, ao passo que a sensibilização de DNA-liGP pode ser reforçada com Ad-liGP (vide a figura 1).

 A Figura 14 mostra uma resposta de dose de vacinas de

20 Ad-GP e Adli-GP. Grupos de camundongos foram vacinados com a vacina indicada nas cepas indicadas. 14 dias após vacinação os camundongos foram sacrificados, e esplenócitos estimulados com os epítomos indicados. O número total de

esplenócitos de CD8+ foi determinado por coloração intracelular e análise FACS.

A Figura 15 mostra o receptor Mano acoplado a uma variante de cadeia invariante compreendendo resíduos 50 a 215 (li50-215), adicionalmente acoplado a uma proteína de fibra adenoviral. A proteína de fibra adenoviral (fibra Ad) pode originar de qualquer sorotipo de adenovírus. O receptor de manose pode ser um ou mais domínios do receptor de Manose. O li pode ser um variante de ou li de comprimento total. Ag = antígeno.

Exemplos da Invenção

A invenção será adicionalmente ilustrada com referência aos seguintes exemplos. Será reconhecido que o que segue é somente exemplo e que modificações em detalhe podem ser feitas enquanto ainda estão compreendidas no escopo da invenção.

Exemplo 1: Sensibilização com uma vacina de DNA nu baseada em cadeia li significativamente aumenta a geração de células T CD8+ específicas de vírus após reforço subsequente com um vetor viral otimizado.

A sensibilização com uma vacina de DNA nu (isto é, um constructo de ácido nucléico) é mostrada para aumentar a resposta imune criada por imunização subsequente com vetor Ad5 (adenovírus sorotipo 5). A sensibilização com

glicoproteína (GP) de LCMV (vírus de coriomeningite linfocítico) que expresso constructo de DNA-liGP (DNA fundida com cadeia invariante (li)) é aqui demonstrada para aumentar significativamente a resposta de célula T CD8\$
5 induzida pelo mesmo constructo de gene distribuída em um vetor de adenovírus sorotipo 5 (Ad5-liGP), fornecendo um forte argumento para a inclusão de constructos de DNA baseadas em cadeia li em protocolos de imunização heterólogos futuros ("reforço de sensibilização").

10 O estudo dos requerentes mostra que o efeito de imunointensificação de ligação de cadeia li não é limitado ao vetor Ad5, porém é relevante em uma plataforma de DNA também. Além disso, dado o fato de que cadeia li aumenta a apresentação de mais de um epítopo, isso coloca vacinas de
15 DNA baseadas em cadeia li como candidatos muito promissores para vários regimes de reforço de sensibilização heterólogos.

Resultados & Discussão

Um modo para aperfeiçoar a memória de célula T
20 induzida é através de regime de reforço de sensibilização heterólogo, por exemplo, sensibilização de DNA nu seguido por um reforço de vetor. Desse modo tendo no laboratório dos requerentes o vetor apropriado, adenovírus deficiente em replicação que expressa LCMV GP fundido com cadeia li

p31 (Ad5-liGP) essa possibilidade foi testada experimentalmente. Em primeiro lugar, os requerentes realizaram vacinação de DNA padrão, vacinação de pistola de genes duas vezes com 3 semanas de separação com DNA-liGP ou DNA-GP. Três semanas após a segunda vacinação de DNA, os dois grupos de camundongos e controles casados foram imunizados por inoculação de 2×10^7 IFU Ad5-liGP na pata da perna direita, e 4 semanas após o número de células T CD8+ específicas de vírus no baço foram enumeradas por meio de ICCS para IFN- γ e citometria de fluxo. Os camundongos sensibilizados com o constructo de DNA fundida continham significativamente mais células T CD8+ IFN- γ específicas de GP₃₃₋₄₂ e GP₂₇₆₋₂₈₆ do que os camundongos não sensibilizados, e uma tendência similar foi observada para células específicas de GP₉₂₋₁₀₁, embora nesse caso a diferença não fosse estatisticamente significativa. Ao contrário, a sensibilização com DNA nu codificando GP na ausência de li teve pouco efeito sobre o nível de células T CD8+ de memória específica de GP induzidas por imunização subsequente com Ad5-liGP (figura 1). Deve ser observado que o efeito observado de incluir li não reflete aumento não específico da imunorreatividade de camundongos vacinados, visto que sensibilização de DNA com um vetor incluindo

somente li, porém sem GP, não teve efeito sobre o nível de células T CD8+ específicas de GP em camundongos subseqüentemente inoculados com o vetor adenoviral (dados não mostrados).

5 Os requerentes mostraram que o uso do vetor de DNA aperfeiçoado como parte de um regime de reforço de sensibilização heterólogo aumentará significativamente a resposta induzida por um vetor viral já otimizado (Holst e outros, 2008). Isso indica fortemente que mesmo imunização
10 baseada em vetor muito imunogênico pode ser adicionalmente aperfeiçoada através de sensibilização inicial do hospedeiro com uma vacina de DNA nu baseada em cadeia li. No total, uma vez que a fusão de cadeia li com o antígeno levará à sensibilização para uma resposta de célula T CD8+
15 ampla, vacinas de DNA baseadas em cadeia li devem representar uma vantagem clara com relação à estratégias de prevenção contra vírus de mutação rápida como parte de regimes de reforço de sensibilização heteróloga.

Materiais e Métodos

20 Camundongos. Camundongos do tipo selvagem C57BL/6 (B6) foram obtidos da Taconic M&B (Ry, Dinamarca). Camundongos B6 deficientes em perforin foram criados localmente de pares de reprodutores originalmente obtidos do The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Camundongos com

sete a 10 semanas de idade foram utilizados em todos os experimentos, e animais de fontes externas foram sempre deixados aclimatar com o ambiente local por pelo menos 1 semana antes do uso. Todos os animais foram alojados sob condições isentas de patógeno específico como validado por classificação de sentinelas. Todos os experimentos de animais foram realizados de acordo com diretrizes nacionais.

Procedimento de imunização e constructo de vacina DNA.

As vacinas de DNA são produzidas utilizando o vetor de expressão eucariótica pACCMV.pLpA contendo a cadeia invariante de murino seguido por GP de LCMV ou LCMV GP sozinho. Os constructos foram gerados como recentemente descrito (Holst e outros, 2008). A cepa de *E. coli* XL1-azul (Stratagene, EUA) foi transformada com os constructos por eletroporação. Seqüenciamento de DNA utilizando seqüenciamento cíclico, Terminador Big Dye e analisador genético AB1310 (ABIprims, EUA) identificaram clones positivos. Os primers foram obtidos de TAG, Copenhague, Dinamarca. Preparações de DNA em grande escala foram produzidas utilizando Qiagen Maxi Prep (Qiagen, EUA).

Imunização de pistola gênica.

O DNA foi revestido em 1.6 nm de partículas de ouro em uma concentração de 2 µg DNA/mg de ouro, e os complexos de

ouro/DNA foram revestidos sobre tubos de plástico de tal modo que 0,5 mg de ouro foi distribuído para o camundongo pr injeção (1 µg DNA pr. Injeção). Esses procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (Biorad, CA, EUA) (Bartholdy e outros, 2003). Os camundongos foram imunizados na pele abdominal utilizando um dispositivo de pistola de gene portátil empregando Hélio comprimido (400 psi) como a força motriz de partícula. A menos que de outro modo mencionado, os camundongos foram imunizados duas vezes com um intervalo de 3-4 semanas e então deixados descansar por 3 semanas antes de desafio/pesquisa adicional.

Vírus.

LCMV do clone de cepa Armstrong 13 foi utilizado na maioria dos experimentos. A menos que de outro modo mencionado, os camundongos a serem infectados receberam uma dose de 10^5 pfu de clone 13 em uma injeção i.v. de 0,3 ml, ou 20 pfu em 0,03 ml na pata da perna direita (f.p.). Para injeção i.c. os camundongos receberam 20 pfu de clone Armstrong neurotrópico 53b em um volume de 0,03 ml. GP ligado por cadeia invariante que codifica adenovírus deficiente em replicação (Ad5-liGP) foi produzido e titulado como recentemente descrito (Holst e outros, 2008).

Titulação de vírus.

Títulos de vírus de órgão foram ensaiados por um ensaio de foco imune como anteriormente descrito (Battegay e outros, 1991).

Esgotamento in vivo de células T CD4+ e CD8+.

5 Os mAbs anti-CD4 (clone GK1.5) e anti-CD8 (clone 53.6.72) foram utilizados. Os camundongos a terem as células esgotadas receberam uma dose de 200 µg em um volume de 0,3 ml de PBS por via intraperitoneal nos dias -1 e 0 em relação à infecção; para tratamento simulado IgG de rato
10 purificado (Jackson ImmunoResearch) foi utilizado em vez disso. A eficiência de esgotamento de célula foi verificada por citometria de fluxo.

Estudo de sobrevivência. A mortalidade foi utilizada para avaliar a gravidade clínica de meningite induzida por
15 LCMV aguda. Os camundongos foram verificados duas vezes por dia por um período de 14 dias ou até atingir 100% de mortalidade.

Ensaio de reação de inchaço de pata específico de LCMV. Os camundongos foram infectados localmente na pata da
20 perna direita como descrito acima, e a reação de inchaço local foi seguida até o dia 14 p.i. A espessura da pata foi medida com um compasso de calibre de dial (Mitutoyo 7309, Mitutoyo Co., Tóquio, Japão), e inchaço específico de vírus foi determinado como a diferença em espessura da pata

direita infecta e esquerda não infectada (Christensen e outros, 1994).

Preparações de células.

Baços de camundongos foram assepticamente removidos e transferidos para solução de sal equilibrada de Hanks (HBSS). As suspensões de células únicas foram obtidas por pressão dos órgãos através de uma malha de aço estéril fina. As células foram lavadas duas vezes com HBSS, e a concentração de células foi ajustada em RPMI 1640 contendo 10% de soro de vitelo fetal (FCS), suplementado com 2-mercaptoetanol, L-glutamina, e solução de estreptomicina-penicilina.

mAb para citometria de fluxo.

Os seguintes mAbs foram todos adquiridos de PharMingen (San Diego, CA) como anticorpos anti-camundongo de rato: anti-CD44 conjugado com FITC, anti-CD8a conjugado com Cy-Chrome, anti-CD4 conjugado com Cy-Chrome e antiIFN- γ conjugado com ficoeritrina (PE).

Análise citométrica de fluxo.

Para visualização de células CD8⁺/CD4⁺ específicas de LCMV, (produzindo interferon- γ), $1-2 \times 10^6$ esplenócitos foram suspensos novamente em 0,2 ml de meio RPMI completo suplementado com 10 unidades de IL-2 recombinante de murino

(R&D Systems Europe Ltd;.. Abingdon, RU), 3 uM monensina (Sigma Chemicals, Co., St. Louis, MO) e 1 ug/ml de peptídeo relevante e incubado por 5 horas a 37°C. os seguintes peptídeos foram utilizados para células CD8+ GP33-41, GP276-86, GP92-101, GP118-125, e NP396-404 para controle; para células T CD4+ GP61-80. Após incubação, as células foram coloridas superficialmente, lavadas, permeabilizadas e coloridas com mAb específico de IFN- γ como descrito anteriormente (Andreasen e outros, 2000; Christensen e outros, 2003). Anticorpo com isotipo casado serviu como controle para coloração não específica. As células foram analisadas utilizando um FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) e pelo menos 10^4 células vivas foram gated utilizando uma combinação de ângulo baixo e dispersão lateral para excluir células mortas e resíduos. A análise de dados foi realizada utilizando software Cell-Quest.

Exemplo 2: Ativação de célula T CD8+ aumentada de antígeno ligado por li é independente de li nativo.

A sequência li contém múltiplas regiões com funções em processamento de antígeno incluindo: um domínio de separação citoplásmica e domínio de trimerização, um domínio de sinalização de membrana próxima e citoplásmica, domínios de trimerização citoplásmica, intramembrana e periplasmica o motivo "chave" envolvido em destravar as

moléculas MHC para facilitar ligação de peptídeos exógenos, ligar motivos para MHC classe I e II na região CLIP, um sítio de glicosilação periplasmica bem como uma região estruturalmente não identificada de interação com CD44 e Fator de inibição de migração de macrófago (MIF) (figura 2).

A ligação li aumenta a apresentação de antígeno tanto em MHC classe I como em classe II. Utilizando Ad-liOVA (OVA é albumina) ou transdução de Ad-OVA de células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDC), os requerentes verificaram que ligação li realmente induziu um aumento dramático em apresentação de antígeno restrito a MHC classe I, como medido por coloração direta com um anticorpo dirigido contra o epítopo OVA SIINFEKL apresentado em H-2Kb (figura 3). A expressão de antígeno restrito de MHC classe I aumentada a partir das seqüências ligadas em li trabalha diretamente na APC independente de células T CD4+ de MHC classe II e qualquer outro tipo de célula e pode ser diretamente medida em culturas de célula dendrítica.

20 *Li em cis*

Para estabelecer se li trabalha somente em cis ou também em trans, um quadro de leitura adicional no vetor adenoviral foi estabelecido por sintetizar um promotor de fosfoglicerato cinase (pGK) com um sinal de poliadenilação

de β -globina e a clonagem disso na região E3 da espinha dorsal adenoviral. Esse vetor pode ser então utilizado para recombinação com o vetor secundário utilizado para criar o vetor Ad-GP (que expressa LCMV GP a partir do quadro de leitura E1 sob controle do promotor CMV humano e poliA SV40). O vetor novo expressa LCMV GP a partir da região E1 adenoviral e li da região E3 (Ad-li+GP). O promotor foi verificado para a indução de células fluorescentes verdes por transfecção em células COS7, e uma medição de expressão de mRNA li células COS7 infectadas com Ad-li+GP e Ad-liGP confirma que li é pelo menos tão eficientemente expresso a partir do promotor pGK como do promotor CMV (figura 4A). a comparação das células TCR318 estimulada com BMDC infectada com Ad-GP, Ad-liGP e Ad-li+GP mostra claramente que li deve ser ligado ao antígeno para ter algum efeito (figura 4B). Teria sido surpreendente se a expressão de li em trans tivesse mostrado eficácia como as culturas de BMDC utilizadas para a estimulação já expressam li.

Alterações de N-terminal:

Iniciando a partir do terminal-N, os requerentes fizeram 1) uma deleção dos 17 primeiros aminoácidos (Ad- Δ 17liGP) que remover os sinais de separação endossomal baseados em Leucina, 2) uma substituição da primeira metade do segmento de transmembrana (Ad-liL TMGP), com o segmento

correspondente do receptor de quimiocina CCR6 TM6, 3) uma substituição da segunda metade do segmento de transmembrana com o segmento CCR6 TM6 correspondente (Ad-liUTMGP), e finalmente 4) deleção completa dos 50 primeiros aminoácidos (Ad-Δ50liGP). A deleção mencionada por último removeu o citosólico inteiro, TM e região proximal de membrana. Nenhuma dessas mutações teve nenhum efeito sobre a capacidade da sequência li restante aumentar a estimulação de células T CD8⁺ (figura 5).

10 Alterações de C-terminal:

A partir da extremidade C os requerentes fizeram deleções do último 14 aa (Ad-li1-201GP, isso remove o sinal de glicosilação de terminal-C), o último 97 aa (Ad-li1-118GP) e o último 110 aa (Ad-li1-105GP). Nenhum efeito sobre a capacidade da sequência de li restante aumentar a estimulação de células T CD8⁺ foi observado pelo 1-201, ao passo que somente tendências incompatíveis e menores de reduções puderam ser vistas a partir da mutação 1-105 e das mutações 1-118 (figura 6).

20 Mutações:

Os requerentes também tentaram fazer mutações de ponto no sítio de ligação de MHC classe I relatado da região CLIP (Ad-liCLIPGP: um M duplo para mutação de ponto A - M91A M99A - projetado para abolir interação li com

moléculas de MHC classe I), e o motivo KEY (Ad-liKEYGP: uma mutação de ponto quádruplo AAAA que destruiria o segmento de li-Key). Nenhuma dessas mutações eram key para a estimulação intensificada mediada por li de células T CD8+.

5 Os únicos dados interessantes vieram quando os requerentes combinaram truncamentos de terminal C e N. desse modo quando os requerentes testaram uma variante de 51-118 (Ad-li51-118GP), uma redução acentuada na capacidade estimuladora de células T CD8+ foi observada, porém o

10 mutante era ainda superior ao Ad-GP (figura 7).

Exemplo 3

Em uma modalidade da invenção, uma glicosiltransferase não humana combinada com proteínas de ligação de glicosila acopladas a li é fornecida. Li pode

15 ser em comprimento total ou uma variante, em que a variante pode ser uma versão truncada de li compreendendo resíduos números 50 a 215. Essa variante tem atividade total apesar da falta de um domínio de transmembrana. Opcionalmente, um adjuvante ou um ou mais domínio de translocação pode ser

20 adicionalmente fornecido. Na figura 15 é fornecido um desenho esquemático de uma modalidade em que o receptor de Manose (uma lectina dependente de cálcio freqüentemente alvejada em vacinas) é acoplado a uma variante de cadeia invariante compreendendo resíduos 50 a 215 (li50-215),

adicionalmente acoplada a uma proteína de fibra adenoviral. A proteína de fibra adenoviral (fibra Ad) pode originar de qualquer sorotipo de adenovírus. O receptor de manose pode ser um ou mais domínios do receptor de Manose.

5 Em um exemplo específico, um adenovírus expressando Egghead (uma proteína de Drosófila) em um quadro de leitura, e expressando o receptor de Manose (ou domínios do receptor de Manose) acoplado a uma variante de li tendo atividade total sem uma região de transmembrana como a
10 variante li50-215 adicionalmente acoplada a e proteína de fibra adenoviral em outro quadro de leitura é fornecido.

A glicosiltransferase como Egghead e as proteínas de ligação de glicosila como receptor de Manose podem ser expressos de quadros de leitura diferentes no mesmo vetor
15 Adenoviral, ou a glicosiltransferase como Egghead e as proteínas de ligação de glicosil como receptor de Manose podem ser expressas de vetores Adenovirais diferentes administrados simultaneamente.

Egghead acopla Manose em todas as proteínas ER
20 (retículo endoplasmático) glicosiladas. A manosição de proteínas secretadas pode causar desse modo a ligação de proteína manosilada ao complexo de fibra Ad-li-receptor de Manose (como mostrado na figura 15). A fibra adenoviral do complexo faz com que as proteínas secretadas ligadas ao

complexo sejam absorvidas por outras células, ativando essas a se tornarem imune-estimulantes e fornecendo acesso do complexo ao citosol onde li pode exercer seus efeitos.

Essa tecnologia pode ser utilizada para construir uma
5 vacina que pode ser administrada diretamente em, por exemplo, cânceres.

Lista de Referências

Andreasen, S. O., Christensen, J. E., Marker, O. & Thomsen, A. R. (2000). Role of CD40 ligand and CD28 in
10 induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses. J Immunol 164, 3689-3697.

Bartholdy, C., Stryhn, A., Hansen, N. J., Buus, S. & Thomsen, A. R. (2003). Incomplete effector/memory differentiation of antigen-primed CD8+ T cells in gene gun
15 DNA-vaccinated mice. Eur J Immunol 33, 1941-1948.

Battegay, M., Cooper, S., Althage, A., Banziger, J., Hengartner, H., e Zinkernagel, R.M. (1991). Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates. J.Virol.Methods
20 33:191-198.

Becker, T.C., Noel, R.J., Coats, W.S., Gomez-Foix, A.M., Alam, T., Gerard, R.D., e Newgard, C.B. (1994). Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. Methods Cell Biol. 43 Pt A:161-189.

Christensen, J. P., Marker, O. & Thomsen, A. R. (1994). The role of CD4+ T cells in cell-mediated immunity to LCMV: studies in MHC class I and class II deficient mice. *Scand J Immunol* 40, 373-382.

5 Christensen, J. P., Kauffmann, S. O. & Thomsen, A. R. (2003). Deficient CD4+ T cell priming and regression of CD8+ T cell functionality in virus-infected mice lacking a normal B cell compartment. *J Immunol* 171, 4733-4741.

Diebold, S. S., M. Cotten, N. Koch, and M. Zenke. 10 (2001). MHC class II presentation of endogenously expressed antigens by transfected dendritic cells. *Gene Ther.* 8:487-493.

Holmes JP, Benavides LC, Gates JD, Carmichael MG, Hueman MT, Mittendorf EA, Murray JL, Amin A, Craig D, von 15 Hofe E, Ponniah S, Peoples GE. (2008). Results of the first phase I clinical trial of the novel II-key hybrid preventive HER-2/neu peptide (AE37) vaccine. *J Clin Oncol.* Jul 10;26(20):3426-33.

Holst, P. J., Sorensen, M. R., Mandrup Jensen, C. M., 20 Orskov, C., Thomsen, A. R. & Christensen, J. P. (2008). MHC Class II-Associated Invariant Chain Linkage of Antigen Dramatically Improves Cell-Mediated Immunity Induced by Adenovirus Vaccines. *J Immunol* 180, 3339-3346.

Kallinteris NL, Lu X, Blackwell CE, von Hofe E,

Humphreys RE, Xu M. (2006). Ii-Key/MHC class II epitope hybrids: a strategy that enhances MHC class II epitope loading to create more potent peptide vaccines. Expert Opin. Biol. Ther. 6(12):1311-1321.

5 Morris, C. R., A. J. Reber, J. L. Petersen, S. E. Vargas, and J. C. Solheim. (2004). Association of intracellular proteins with folded major histocompatibility complex class I molecules. Immunol.Res. 30:171-179.

Pieters, J. (1997). MHC class II restricted antigen
10 presentation. Curr.Opin.Immunol. 9:89-96.

Sambrook e outros, eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 2^a edição, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

Strumptner-Cuvelette, P., e P. Benaroch. (2002).
15 Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. Biochem. Biophys. Acta., 1542:1-13.

WO 2007/062656

US 2008/0095798

WO 2003/089471

20 US 5,554,372

US 5,876,735

US 5,102,985

REIVINDICAÇÕES

1. Constructo de ácido nucleico **caracterizado pelo** fato de compreender sequências que codificam

a. Pelo menos uma cadeia invariante ou variante da mesma operativamente ligada a

b. Pelo menos uma proteína ou peptídeo antigênico ou um fragmento antigênico da referida proteína ou peptídeo,

em que a sequência de ácido nucleico da pelo menos uma cadeia invariante ou variante compreende sozinha os nucleotídeos 1 a 327 da SEQ ID NO: 1, na ausência dos nucleotídeos 328 a 339 ou degenerados da mesma que codificam os aminoácidos 1 a 76 da SEQ ID NO: 2, mas na ausência dos aminoácidos 77 a 80.

2. Constructo de ácido nucléico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a pelo menos uma proteína ou peptídeo antigênico ou um fragmento antigênico da referida proteína ou peptídeo de um organismo patogênico é selecionado do grupo de patógenos que compreendem: vírus, micro-organismos e parasitas.

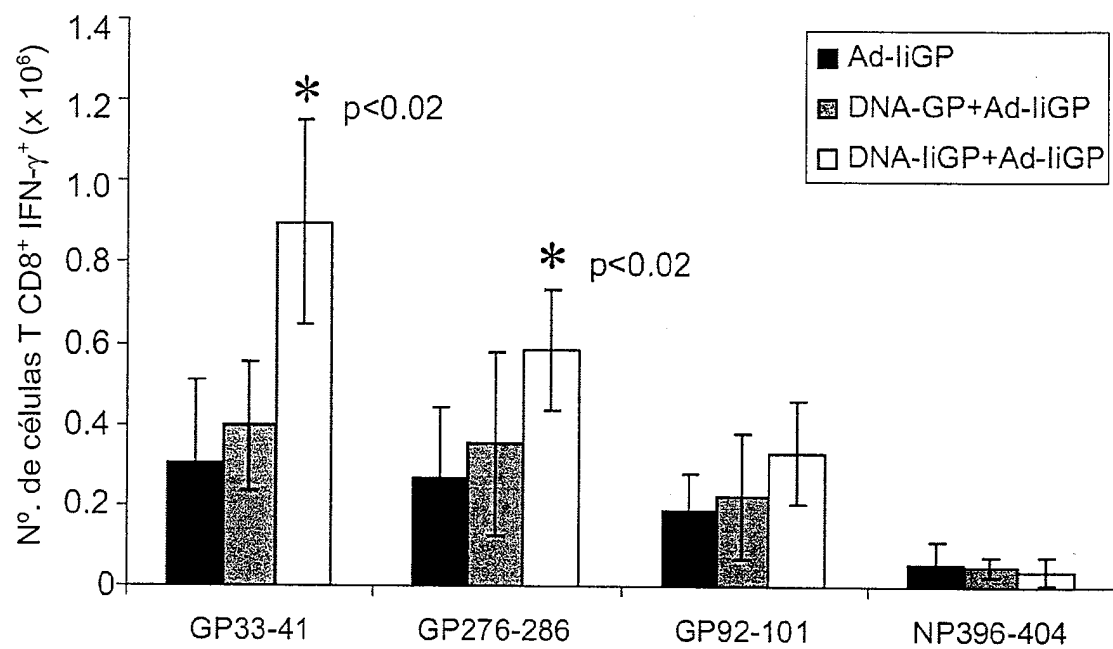
3. Constructo de ácido nucléico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, **caracterizado pelo** fato de que pelo menos uma proteína ou peptídeo antigênico ou um fragmento antigênico da referida proteína ou peptídeo é de um polipeptídeo específico de câncer.

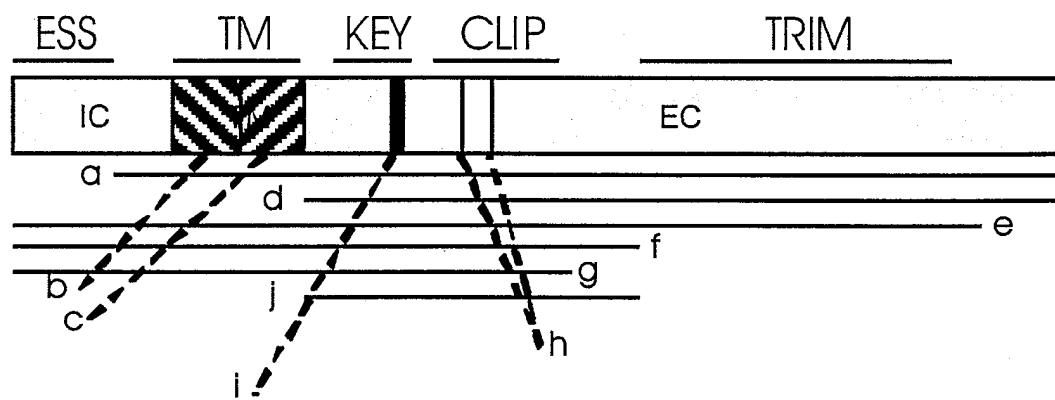
4. Constructo de ácido nucléico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado pelo** fato de que o ligante operativo entre a pelo menos uma cadeia invariante ou variante e a proteína ou peptídeo

antigênica ou um fragmento antigênica da proteína ou peptídeo é uma ligação direta.

5. Constructo de ácido nucléico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo** fato de que o ligante operativo entre a pelo menos uma cadeia invariante ou variante e a proteína ou peptídeo antigênica ou um fragmento antigênica da proteína ou peptídeo é uma região espaçadora.

6. Composição **caracterizada pelo** fato de que compreende um constructo de ácido nucléico conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 para uso como medicamento.

*FIGURA 1*

*FIGURA 2*

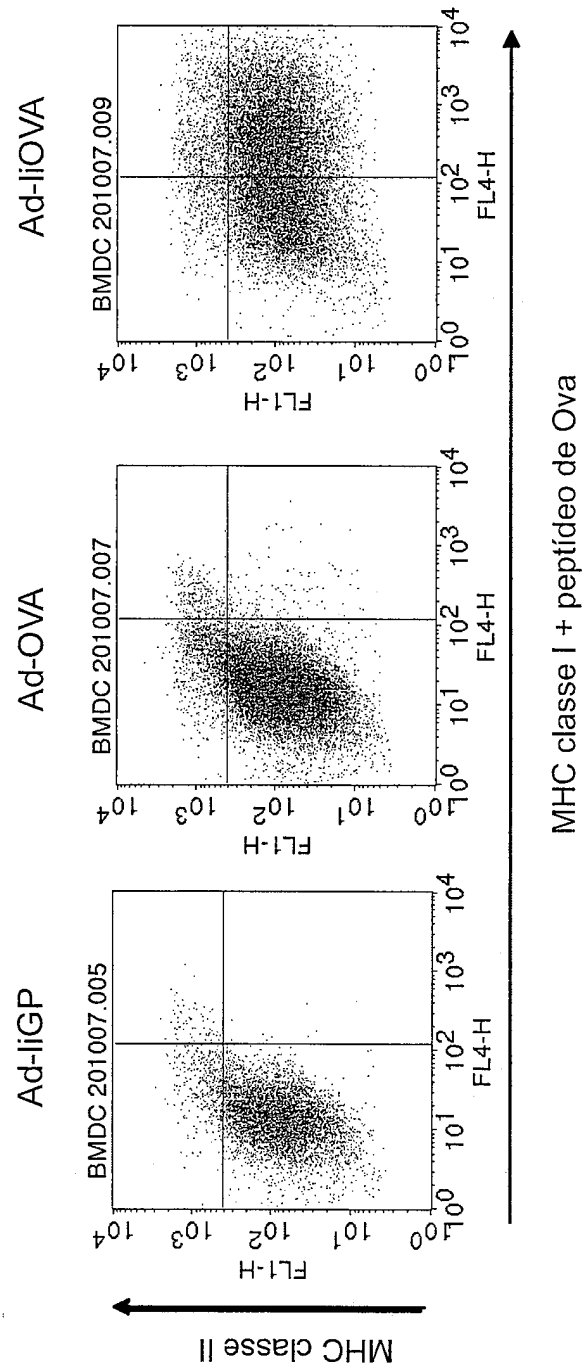


FIGURA 3

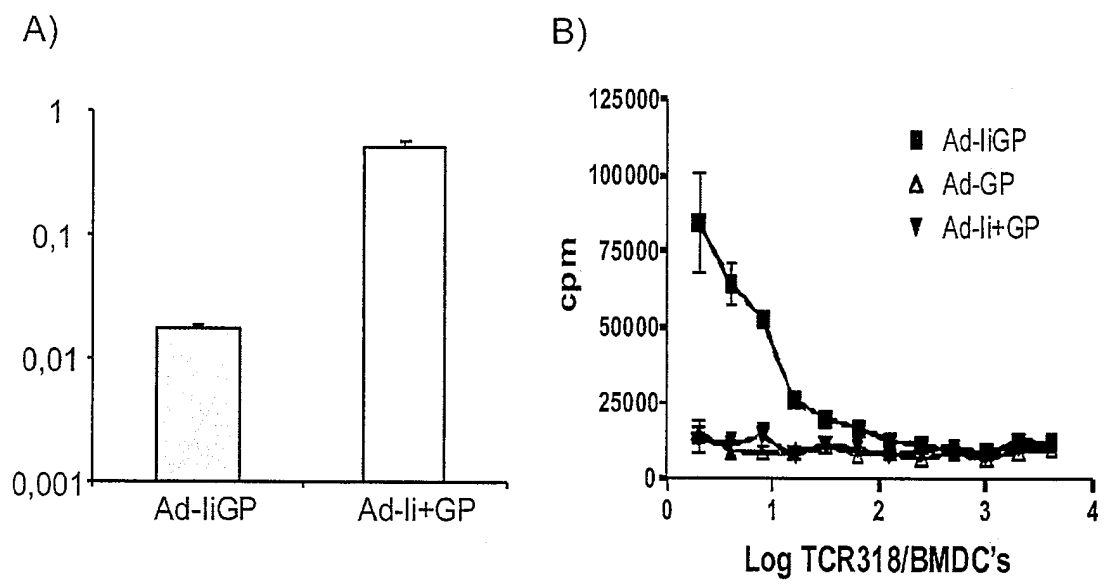


FIGURA 4

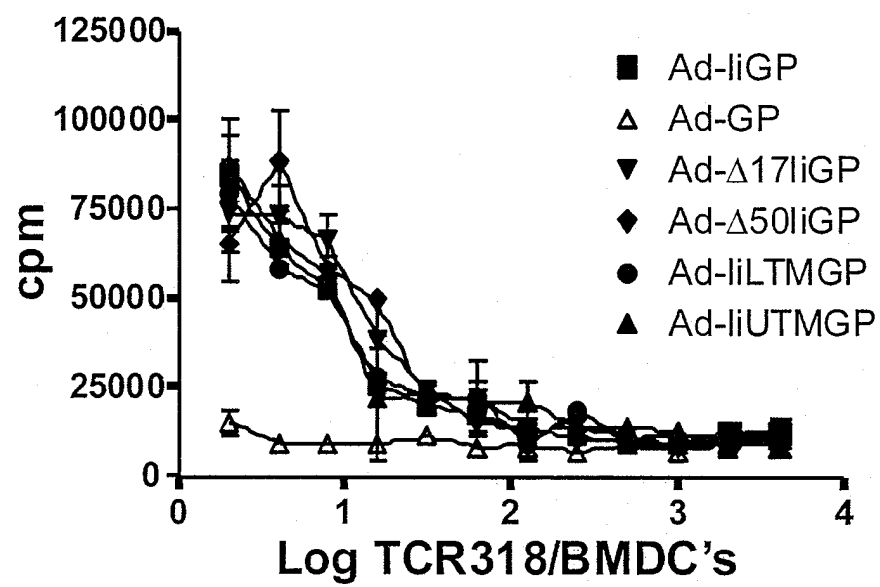


FIGURA 5

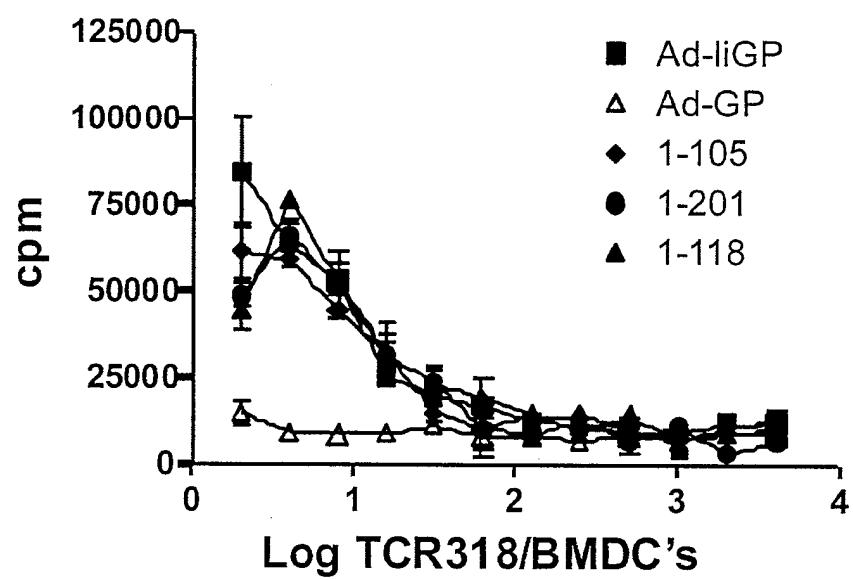


FIGURA 6

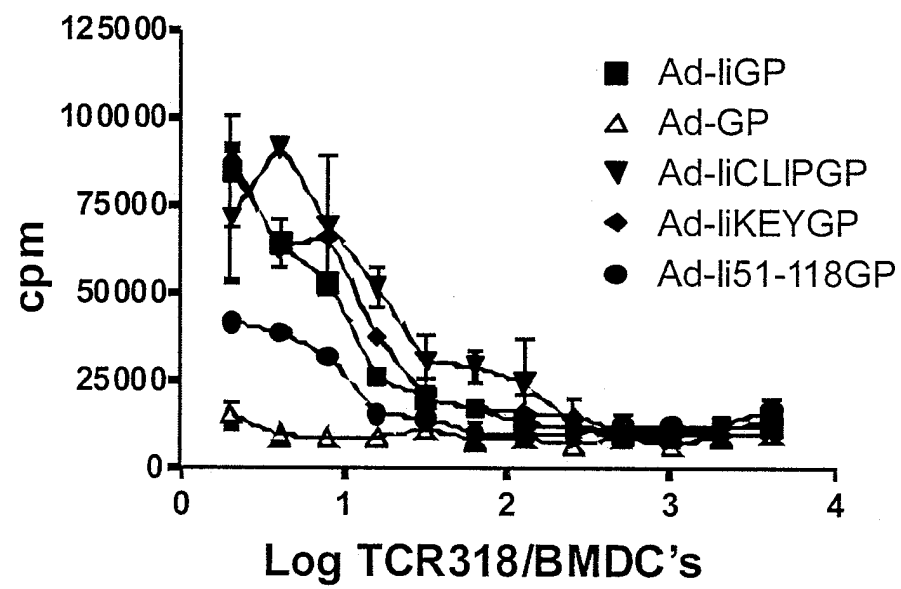


FIGURA 7

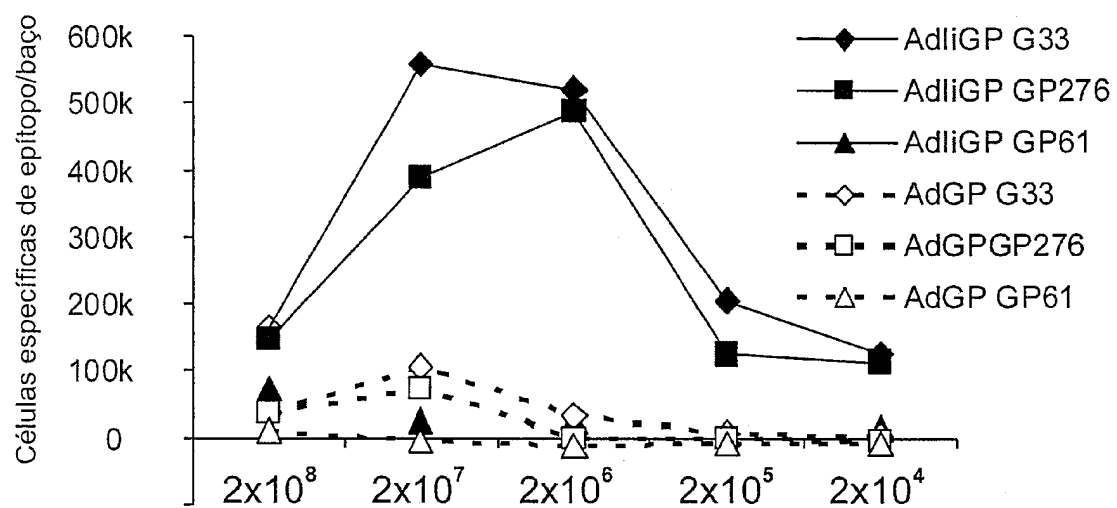


FIGURA 8

Comparação de liGP, liCLIPGP e GP não ligado
para apresentação de Ag MHC classe II

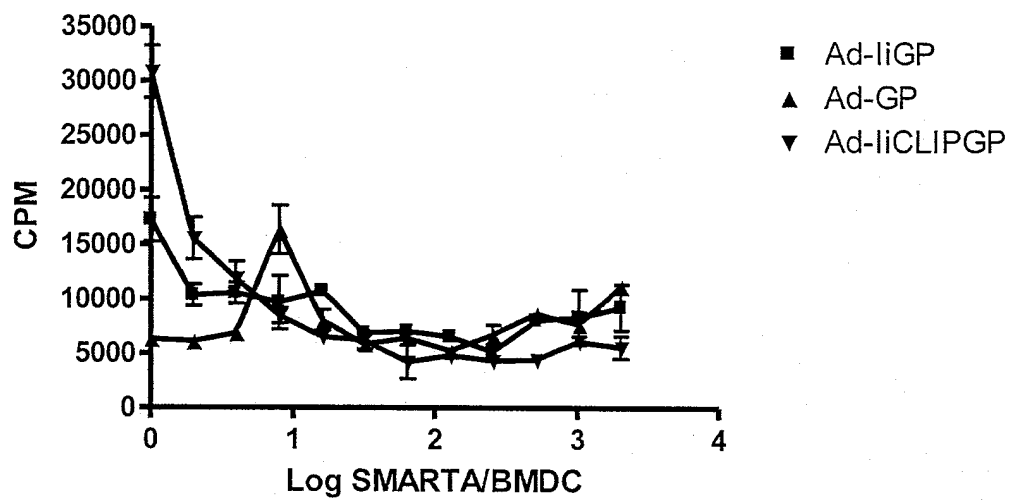


FIGURA 8

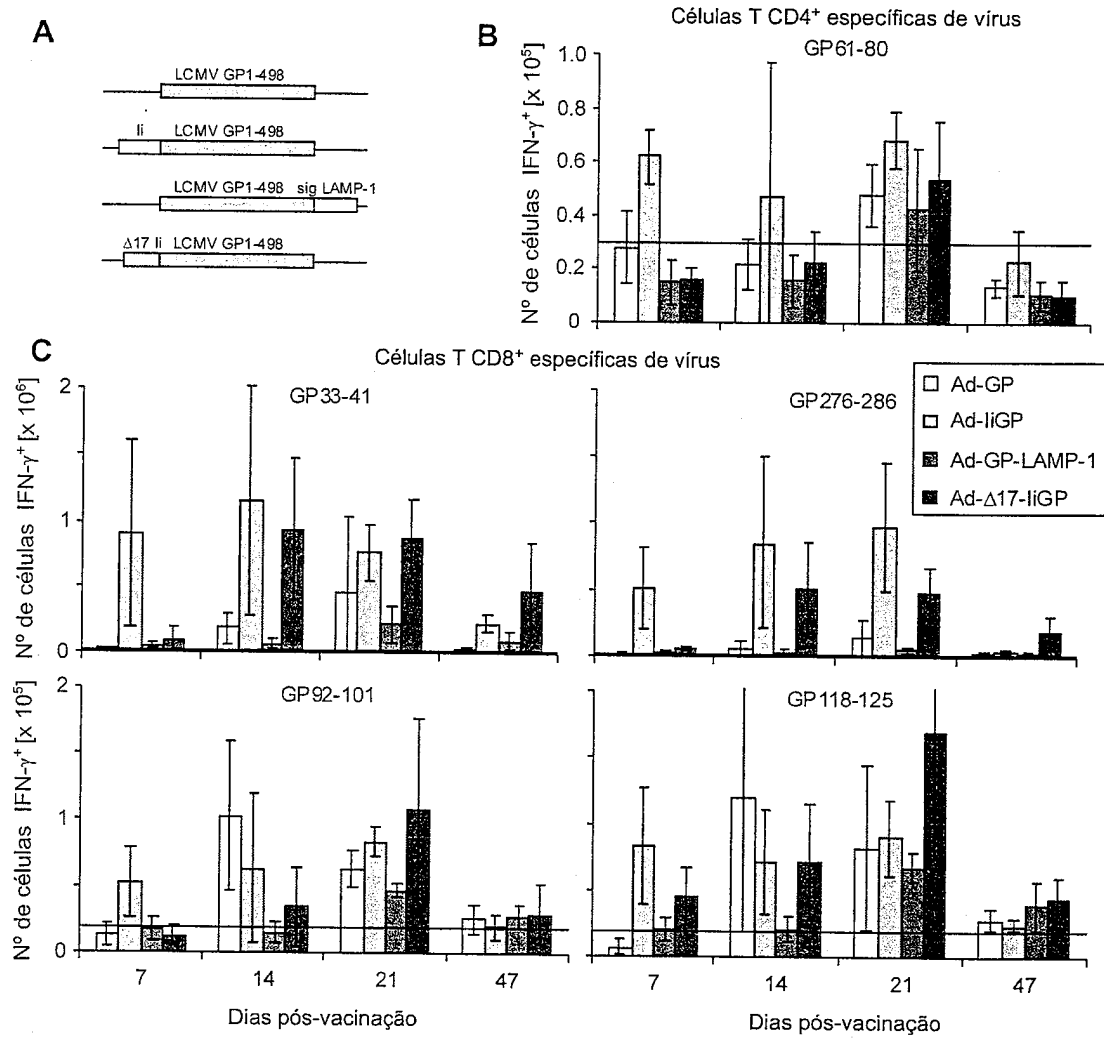


FIGURA 10

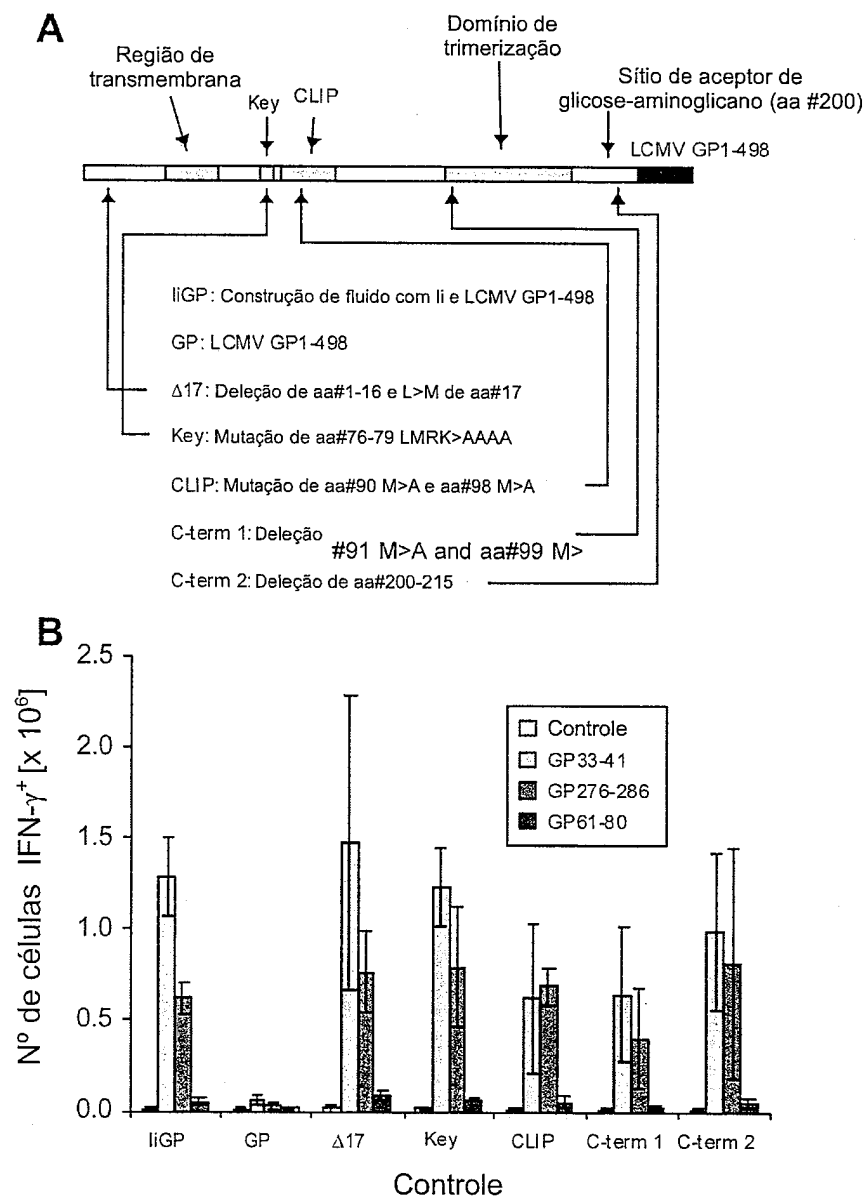
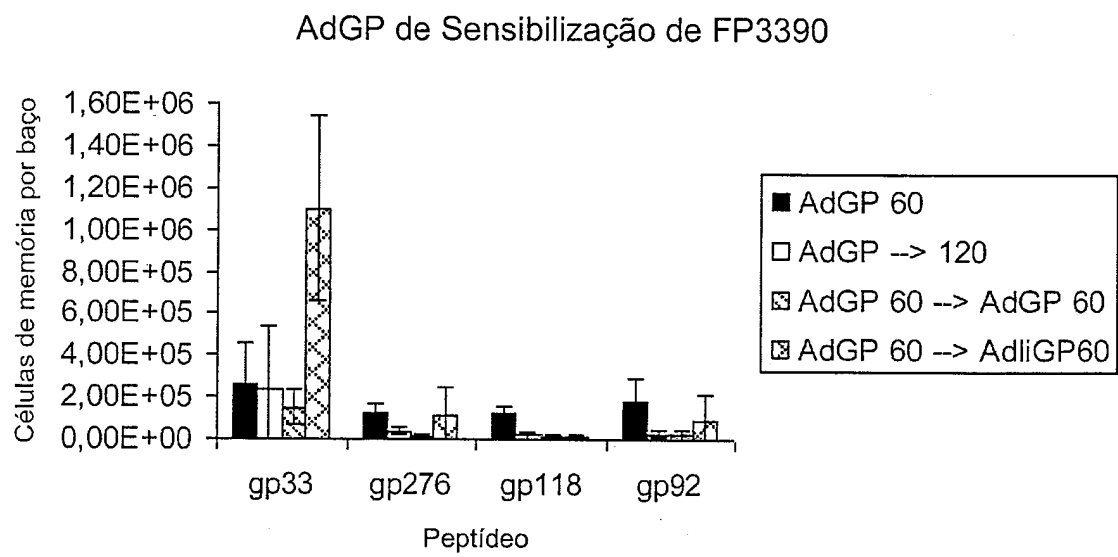


FIGURA 11

*FIGURA 12*

AdliGP de Sensibilização de FP3390

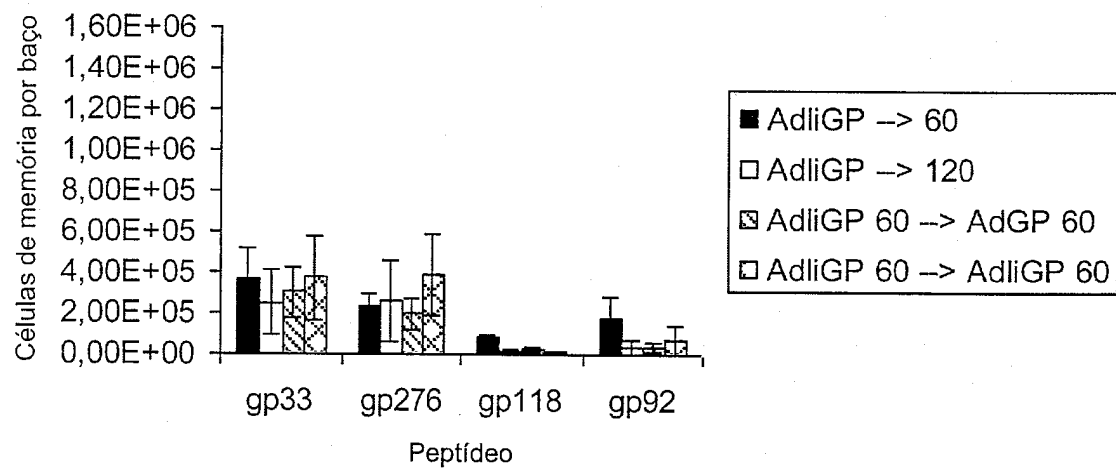


FIGURA 13

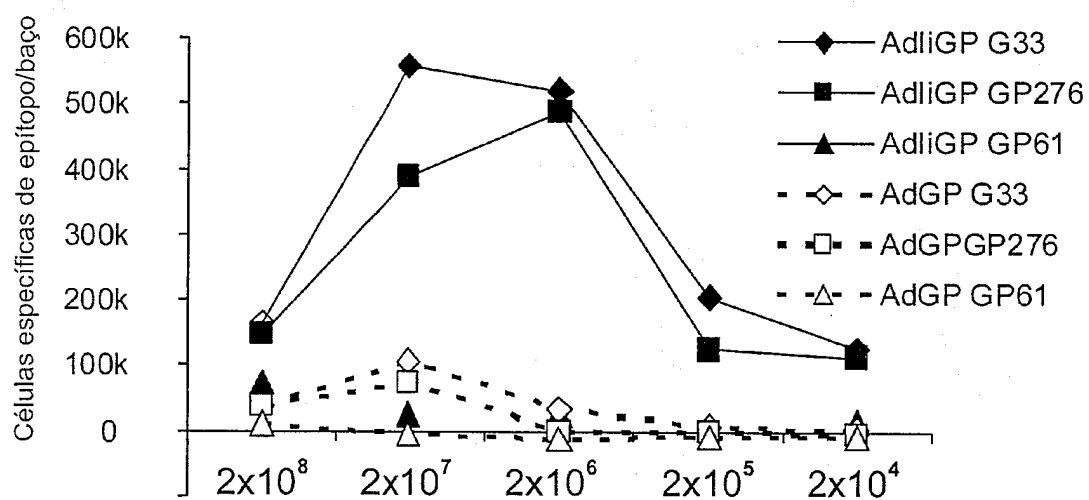
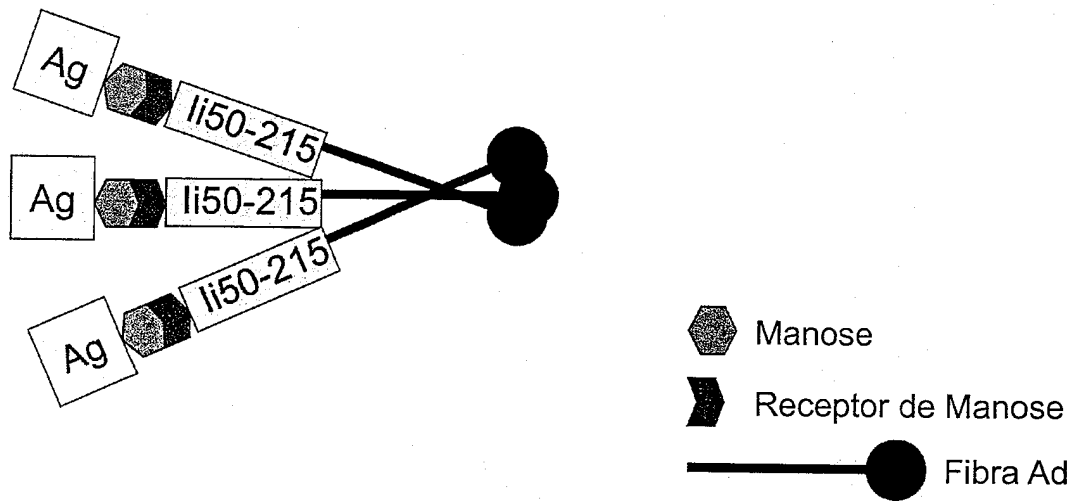


FIGURA 14

*FIGURA 15*