



(11) *Número de Publicação:* PT 862634 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C12N015/37 A A61K039/12 B

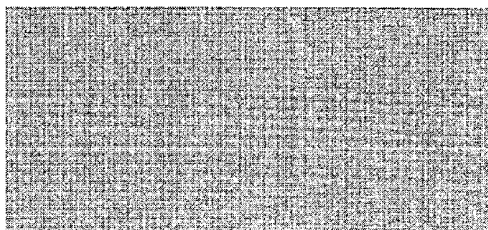
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1997.07.29	(73) <i>Titular(es):</i> TRANSGENE S.A. 11, RUE DE MOLSHEIM F-67000 STRASBOURG FR
(30) <i>Prioridade:</i> 1996.07.30 FR 9609584	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1998.09.09	(72) <i>Inventor(es):</i> JEAN MARC BALLOUL NADINE BIZOUARNE MARIE-PAULE KIENY FR FR FR
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.09.19	(74) <i>Mandatário(s):</i> MANUEL GOMES MONIZ PEREIRA RUA DO ARCO DA CONCEIÇÃO 3, 1º AND. 1100 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTRA OS TUMORES E INFECÇÕES DE PAPILOMAVÍRUS

(57) *Resumo:*

CMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTRA OS TUMORES E INFECÇÕES DE PAPILOMAVÍRUS



DESCRIÇÃO

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTRA OS TUMORES E INFECÇÕES DE PAPILOMAVÍRUS

A presente invenção tem por objectivo uma composição farmacêutica destinada ao tratamento ou à prevenção das lesões associadas aos papilomavírus e mais particularmente aos papilomavírus humanos (HPV) de tipo 16, 18, 31, 33 e 45.

Os papilomavírus são vírus de ADN que possuem um genoma circular de cerca de 7900 pares de bases rodeado por um envelope proteico. Identificou-se um certo número de tipos de papilomavírus bovinos (BPV), humanos (HPV) e sequenciou-se o seu genoma (Pfister, 1987, in *The papovaviridae: The Papillomaviruses* (edição Salzman e Howley) Plenum Press, Nova Iorque, p. 1-38). Ele compreende uma região precoce e uma região tardia. A região tardia contém dois quadros de leitura L1 e L2 que codificam para os componentes principais do envelope. A região precoce contém pelo menos os quadros de leitura E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Os produtos de expressão E1 e E2 regulam a replicação viral e a expressão dos genes virais enquanto que os das regiões E5, E6 e E7 estão implicados nos processos de transformação oncogénica das células infectadas. Com efeito, demonstrou-se experimentalmente que a proteína E5 de BPV-1 pode *in vitro* transformar células (Schlegel et al., Science 233, 464-467). As proteínas E6 de BPV-1 e E7 de HPV-16 estão implicadas na indução e na manutenção da transformação oncogénica. O poder transformante de E7 foi demonstrado para HPV-16 e HPV-18 (Kanda et al., 1988, J. Virol. 62, 610-613, Vousden et al., 1988, Oncogene Res., 3, 1-9; Bedell et al., 1987, J. Virol. 61, 3635-3640). Não foi posta em evidência função em E4.

No homem, os HPV estão associados a patologias indo de infecção benigna da pele às verrugas e aos tumores malignos. Estes vírus são altamente específicos dos epitélios da epiderme das vias genitais, orais e respiratórias. Os dados epidemiológicos sugerem fortemente o papel de certas estirpes no cancro do colo do útero e das vias baixas, em particular os HPV-16 e 18 e em menor grau os HPV-31, 33 e 45. O cancro do colo do útero é a segunda causa de cancro feminino no mundo. Segundo a OMS, 460000 novos casos são reportados cada ano entre os quais 200000 casos pelo menos estão claramente associados aos HPV. Toda uma série de estudos demonstram o papel transformante destes vírus, a sua integração específica no genoma das células

neoplásicas, a sua actividade génica nas células cancerosas e a importância da expressão dos genes precoces E6 e E7 na manutenção do fenótipo maligno das células neoplásicas HPV positivas (Monsenego, J. Impact Medecin, 11 de Março de 1994).

As patologias associadas aos vírus HPV possuem um problema terapêutico devido à sua natureza persistente e recorrente. Foram já utilizadas várias abordagens no tratamento destas doenças como a cirurgia, a quimioterapia, os agentes antivirais e a imunoterapia.

A este respeito, a patente europeia EP 0 462 187 descreve uma abordagem de vacinação utilizando os genes precoces dos papilomavírus para estabelecer uma imunidade em relação aos tumores resultantes da integração do genoma HPV no ADN celular e nos quais as proteínas do envelope deixam de estar expressas. O pedido WO 93/02184 ensina uma abordagem terapêutica baseada na utilização dos antígenos de envelope a título de agentes imunogénicos. Estes documentos não sugerem a possibilidade de associar o efeito preventivo alcançado pelos polipéptidos precoces e o efeito curativo conferido pelo polipéptidos tardios dos papilomavírus para gerar composições adaptadas ao conjunto das patologias graves devidas aos HPV. Além disso, no decurso dos últimos anos, foi proposto utilizar os polipéptidos tendo uma actividade imuno-estimuladora com o fim de activar as células T com um resultado mais ou menos benéfico segundo as patologias alvo (ver por exemplo WO 96/11279).

Além disso, os documentos WO93/00436 e WO94/23037 descrevem as propriedades imunogénicas da proteína L2 de BPV que podem ser aproveitadas para o tratamento ou a prevenção dos tumores de papilomavírus. Uma formulação particular associa as proteínas L2 e E7 de BPV-4 produzidas por via recombinante em *E. coli*. É de referir que a actividade anti-tumoral alcançada pela associação L2 + E7 é similar à obtida com L2 sozinho.

O documento WO96/11274 descreve composições farmacêuticas para a prevenção ou o tratamento das infecções de papilomavírus obtidas pela expressão do polipéptido L1 e de um polipéptido de fusão L2-E7 no sistema baculovírus. Os VLPs (para *Virus Like Particles*) quimeras apresentando o polipéptido E7 na sua superfície são produzidos nas células de insectos Sf 9 e purificados por centrifugação sobre gradiente de sucrose. Os coelhos imunizados por estas partículas quimeras geram os anti-corpos contra os polipéptidos virais L1 e E7. O documento WO96/11274 divulga igualmente os VPLs

apresentando uma molécula imuno-estimuladora na sua superfície e ilustra a sua inserção na região de L2 exposta ao exterior do envelope.

Por fim, os documentos WO96/260912 e WO97/46693 descrevem composições terapêuticas destinadas ao tratamento das infecções ou tumores de papilomavírus compreendendo um polipéptido originário de uma região precoce e/ou um polipéptido originário de uma região tardia do genoma de um papilomavírus em associação com uma proteína tendo uma actividade imuno-estimuladora. Em particular, o documento WO96/29091 descreve o efeito benéfico da interleucina-12 para o tratamento das lesões associadas ao papilomavírus e considera a combinação da interleucina-12 com um antígeno de papilomavírus sob a forma quer de composições polipeptídicas, quer de vectores recombinantes expressando os referidos polipéptidos, e o documento WO97/46693 descreve envelopes vazios VLPs formadas por auto-reunião dos polipéptidos tardios L1 ou L1+L2, a título de veículo de transferência de um material genético codificante para uma proteína de interesse. Os VLPs são aproveitados para libertar *in vivo* um material genético de interesse, por exemplo codificante para uma citocina tal como a interleucina-2, um polipéptido tendo uma actividade co-estimuladora, tal como B7.1 e B7.2 ou ainda os polipéptidos precoces de um papilomavírus.

A presente invenção refere-se mais precisamente a uma preparação baseada sobre uma mistura de antígenos originários de regiões precoces ou tardias de um papilomavírus ou um vector que as expresse simultaneamente, com o fim de estabelecer imunidade durável contra as células infectadas. Os candidatos vírus vacínicos propostos no quadro da presente invenção podem ser utilizados a título preventivo (imunoprofilaxia), para limitar o desenvolvimento ou a propagação da infecção viral aos tecidos vizinhos, ou a título curativo (imunoterapia), para impedir ou reduzir uma evolução tumoral nos pacientes infectados. A utilização de antígenos de envelope vai induzir a produção de anticorpos contra os epítopes antigénicos localizados à superfície das partículas virais impedindo a infecção de se estabelecer de forma duradoura. O uso de proteínas precoces vai permitir induzir uma imunidade contra as células infectadas após integração do ADN viral.

A presente invenção fornece igualmente uma preparação associando um polipéptido originário de um papilomavírus e uma molécula imuno-estimuladora. Uma das vantagens de uma tal composição é a de combinar a imunidade específica induzida pelos antígenos virais e a imunidade não específica induzida pela molécula imuno-estimuladora e destinada a reforçar a resposta específica.

O fim da presente invenção é pôr à disposição do público composições farmacêuticas que permitem o tratamento das infecções de HPV e, mais particularmente, as patologias graves tais como o cancro do colo do útero, de uma eficácia melhorada em relação às composições da técnica anterior.

É esta a razão pela qual a presente invenção tem por objectivo uma composição farmacêutica destinada ao tratamento ou à prevenção de uma infecção ou tumor de papilomavírus que compreende a título de agentes terapêuticos:

- (1) pelo menos um polipéptido originário da região precoce de um papilomavírus e pelo menos um polipéptido originário da região tardia de um papilomavírus,
 - (2) pelo menos um polipéptido originário da região precoce de um papilomavírus, pelo menos um polipéptido originário da região tardia de um papilomavírus e pelo menos um polipéptido tendo uma actividade imuno-estimuladora,
- com excepção da combinação constituída por um polipéptido originário da região precoce E7 de um papilomavírus e por um polipéptido originário da região tardia L2 de um papilomavírus, e
 - e sendo entendido que o referido polipéptido tendo uma actividade imuno-estimuladora e/ou o referido polipéptido originário da região precoce não seja(m) fundido(s) ao referido polipéptido originário da região tardia.

De um modo geral, o termo polipéptido faz referência a todo ou parte do polipéptido nativo, a um polipéptido quimera resultante da fusão de sequências de origens diferentes ou a uma variante caracterizada por pelo menos uma mutação (delecção, inserção e/ou substituição) de um aminoácido. De modo mais particular, um polipéptido em uso no quadro da presente invenção tem especialmente uma sequência em aminoácidos cujo grau de similaridade com a sequência nativa é superior a 75%, vantajosamente, superior a 85% e, de preferência, superior a 95%. O grau de similaridade pode ser facilmente calculado com o auxílio de um programa de computador apropriado ou alinhando as sequências de modo a obter o grau máximo de homologia e contabilizando o número de posições nas quais os aminoácidos de duas sequências são idênticos em relação ao número total de posições. A sequência dos genomas de HPV-16 e de HPV-18 é divulgada em Genbank nos números de acesso K02718 e X05015, respectivamente.

Como recordado anteriormente, o genoma dos vírus da família dos papilomavírus, em particular BPV e HPV, codificam para pelo menos 8 polipéptidos, dois polipéptidos tardios

L1 e L2 compoendo o envelope viral e 6 polipéptidos precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) implicados na regulação, na manutenção do genoma viral e na transformação das células infectadas.

Se bem que o conjunto das proteínas de um papilomavírus possa ser utilizada no quadro da presente invenção, escolhe-se com vantagem utilizar um polipéptido derivado da proteína E6, da proteína E7 ou das proteínas E6 e E7. Pode ser vantajoso recorrer a uma variante não oncogénica mutada ao nível das regiões implicadas no processo de transformação das células infectadas. Tais variantes são descritas na literatura (Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105; Crook et al., 1991, Cell 67, 547-556; Heck et al., Proc. Natl. Sci. USA 89, 4442-4446; Phelps et al., 1992, J. Viro. 66, 2418-2427).

Um polipéptido preferido originário da região tardia de um papilomavírus deriva da proteína L1, da proteína L2 ou das proteínas L1 e L2.

Segundo formas de realização (2) e (3) particularmente vantajosas, uma composição de acordo com a invenção compreende igualmente um polipéptido tendo uma actividade imuno-estimuladora. Por "imuno-estimuladora", entende-se a capacidade de estimular uma resposta imunitária humoral activando os linfócitos B, afim de amplificar a produção de anticorpos dirigidos contra os antígenos de papilomavírus, ou a estimular uma resposta imunitária de mediação celular activando os linfócitos T, afim de desencadear uma resposta citotóxica significativa contra as células tumorais ou infectadas por um papilomavírus. A título indicativo, a imuno-estimulação pode ser avaliada em modelo animal (por comparação da taxa de rejeição de um animal ao qual se enxertou um tumor expressando o antígeno alvo, isto na presença e na ausência do imuno-estimulador). De uma maneira mais geral, os meios para pôr em evidência uma imuno-estimulação são indicados em Roitt (in *Immunology*, 4ª edição, Moby Ltd.).

Pode utilizar-se uma molécula imuno-estimuladora nativa tal como encontrada num mamífero e, em particular no homem, uma parte dela, uma molécula química proveniente da fusão de sequências de origens diversas ou mutante, na condição todavia de conservar a função imuno-estimuladora. Entre todas as moléculas que se podem considerar, preferir-se-á utilizar um polipéptido constituído por, ou derivado de, interleucina-2, de interleucina-7, de interleucina-12 e das moléculas de co-adesão B7.1 e

B7.2, sendo particularmente preferidas no quadro da presente invenção a interleucina-2 e a molécula B7.1.

Uma composição preferida de acordo com a invenção compreende:

- (1) um polipéptido originário da região E6, um polipéptido originário da região E7, um polipéptido originário da região L1 e um polipéptido originário da região L2 de um papilomavírus,
- (2) um polipéptido originário da região E6, um polipéptido originário da região E7, um polipéptido originário da região L1 e um polipéptido originário da região L2 de um papilomavírus e um polipéptido derivado de interleucina-2,
- (3) um polipéptido originário da região E6, um polipéptido originário da região E7, um polipéptido originário da região L1, um polipéptido originário da região L2 de um papilomavírus e um polipéptido derivado da moléculas B7.1, ou
- (4) um polipéptido originário da região E6, um polipéptido originário da região E7, um polipéptido originário da região L1, um polipéptido originário da região L2 de um papilomavírus, um polipéptido derivado da moléculas B7.1 e um polipéptido derivado de interleucina-2.

Dado as observações recordadas mais acima sobre a frequência de infecção por certos tipos de HPV nos casos do cancro do colo do útero, uma composição de acordo com a invenção compreende um polipéptido originário de um papilomavírus de risco, de tipo HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 e/ou HPV-45 e, em particular do vírus HPV-16. Claro que, no caso onde a composição incluía diversos antígenos de papilomavírus, estes podem ser de uma origem comum ou diferente.

De um modo geral, um polipéptido originário de um papilomavírus ou tendo uma actividade imuno-estimuladora pode ser produzido por métodos convencionais de síntese química ou ainda pelas técnicas do ADN recombinante (ver por exemplo Maniatis et al., 1989, *Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Mais particularmente, um processo de preparação compreende o acto de cultivar uma célula transformada por um fragmento de ADN codificante para o polipéptido em questão, para gerar uma célula produtora, e o acto de recolher o referido polipéptido a partir da cultura. A célula produtora pode ser de uma origem qualquer e sem limitação, uma bactéria, uma levedura ou ainda uma célula de mamífero, na medida em que o fragmento de ADN considerado está quer integrado no seu genoma quer integrado num vector de

expressão apropriado capaz de se replicar. Claro que o fragmento de ADN é colocado sob o controle de sinais de transcrição e de tradução permitindo a sua expressão na célula produtora. Vectores de expressão e sinais de controle são conhecidos do perito.

A presente invenção visa igualmente uma composição farmacêutica destinada ao tratamento ou à prevenção de uma infecção ou tumor de papilomavírus que compreende a título de agente(s) terapêutico(s) um ou vários vector(es) recombinante(s) no(s) quais são inseridos fragmentos de ADN codificante para:

- (1) um polipéptido originário da região precoce de um papilomavírus e pelo menos um polipéptido originário da região tardia de um papilomavírus, ou
- (2) um polipéptido originário da região precoce de um papilomavírus, pelo menos um polipéptido originário da região tardia de um papilomavírus e pelo menos um polipéptido tendo uma actividade imuno-estimuladora;

sendo os referidos fragmentos de ADN colocados sob o controle de elementos necessários à sua expressão numa célula ou num organismo hospedeiro.

Segundo esta alternativa além disso preferida, o agente terapêutico é um vector no qual são inseridos os fragmentos de ADN codificante para os polipéptidos originários de um papilomavírus ou imuno-estimuladores tais como definidos anteriormente. Este tipo de composição apresenta a vantagem de uma produção barata e de uma grande estabilidade em condições de ambiente variadas. Em particular, as condições de conservação são menos constrangedoras.

Os fragmentos de ADN codificante para um polipéptido originário de um papilomavírus podem ser obtidos por clonagem, por PCR (Polymerase Chain Réaction) ou por síntese química segundo as técnicas convencionais commumente em uso a partir de células papilomavírus positivas obtidas de pacientes ou de colecções.

O gene codificante para um polipéptido tendo uma actividade imuno-estimuladora pode igualmente ser isolado segundo as técnicas padrão a partir do genoma de uma célula (tipo genómica) ou dos ARN mensageiros de uma célula na qual ele é expresso (tipo ADN complementar). Além disso, o gene em questão pode codificar para (i) uma molécula solúvel, quer intracelular quer segredada no meio exterior ou (ii) uma molécula ancorada na membrana e portanto presente na superfície das células que o expressam.

Um vector recombinante preferido no quadro da invenção é um vector viral no genoma do qual foram inseridos os fragmentos de ADN citados anteriormente, de maneira a permitir a sua transferência e a sua expressão numa célula ou num organismo hospedeiro. Um vector viral que pode ser utilizado no quadro da presente invenção, pode ser derivado especialmente de um poxvírus, de um adenovírus, de um retrovírus, de um vírus de herpes ou de um vírus associado ao adenovírus. Vantajosamente, tratar-se-á de um vector não integrativo e de uma virulência atenuada. Esses vectores, bem como as suas técnicas de preparação, são conhecidos do perito.

No caso em que se utiliza um vector adenoviral, ter-se-á de preferência de recorrer a um vector não replicativo por deleção de regiões essenciais à replicação e, especialmente, da maioria da região E1 a fim de evitar a sua propagação no seio do organismo hospedeiro ou no ambiente. Claro que se pode modificar ou delectar outras regiões do genoma adenoviral, na medida em que as funções essenciais defectivas são complementadas em *trans*. Um vector adenoviral preferido de acordo com a invenção reterá as sequências essenciais à formação do envelope, a saber os ITRs (Inverted Terminal Repeat) 5' e 3' e a região de formação do envelope. Os diferentes vectores adenovirais bem como as suas técnicas de preparação são convencionais e estão descritas em Graham e Preveet (1991, in *Methods in Molecular Biology*, vol 7, p. 109-128; Ed: E.J. Murey, The Human Press Inc.) e no pedido internacional WO 94/28152. Se se trata de um retrovírus, conservam-se os LTRs (Long Terminal Repeat) e as sequências de formação do envelope (ver por exemplo Naviaux e Verma, 1992, *Current Opinion in Biotechnology*, 3, 540-547).

Segundo um modo de realização vantajoso, um vector viral recombinante de acordo com a invenção deriva de um poxvírus e, especialmente, de um poxvírus de aviário, tal como o poxvírus do canário, de um fowlpox ou de vírus da vacínia, sendo este último preferido. Entre todos os vírus da vacínia que se podem considerar no quadro da presente invenção, escolhe-se de preferência as estirpes Copenhaga, Wyeth e Ankara modificada (MVA para Modified Vaccinia Virus Ankara). As condições gerais de obtenção de um vírus da vacínia capaz de expressar um gene heterólogo são ensinadas na patente europeia EP 83 286 e no pedido EP 206 920. Quanto ao vírus MVA, ele é mais particularmente descritos em (Mayr et al., 1975, *Infection* 3, 6-14; Sutter e Moss, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10847-10851).

Claro que, no quadro da presente invenção, os fragmentos de ADN são colocados sob o controle dos elementos necessários à sua expressão. Estes incluem os elementos apropriados de regulação da transcrição bem como os sinais de iniciação e de terminação da tradução. O promotor reveste-se de uma importância particular. De um modo geral, recorrer-se-á a um promotor funcional no organismo ou na célula hospedeiro que se quer tratar e adaptado ao vector usado. Além disso, ele pode ser modificado de maneira a conter as sequências reguladoras, por exemplo um elemento activador da transcrição ou das sequências respondendo a certos sinais celulares. A este respeito, pode ser vantajoso utilizar um promotor específico de tecido, já que as lesões associadas aos papilomavírus são localizadas ao nível das vias genitais, ou um promotor respondendo a sinais especificamente tumorais (por exemplo activado em presença de factores de crescimento geralmente sobre-expressos pelas células tumorais) afim de limitar a expressão apenas às células tumorais.

Entre os promotores considerados no quadro da presente invenção, podem citar-se os promotores SV40 (Virus Simian 40), HMG (Hydroxy-Methyl-Glutaryl-coenzyme A), TK (Thymidine Kinase); CMV (cytomégalo vírus) RSV (Rous Sarcoma Virus), o MLP (Major Late Promoter) do adenovírus adaptados ao vector adenoviral e o LTR do Mo-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) mais específicos dos vectores retrovirais. Quando o promotor deriva de um poxvírus, de preferência o promotor será o promotor de um gene do poxvírus utilizado, por exemplo o promotor do gene codificante para a proteína 7,5K, H5R, TK ou K1L do vírus da vacínia. Estes últimos estão descritos na literatura e podem ser clonados a partir do genoma viral pelas técnicas clássicas.

Além disso, os elementos necessários à expressão podem igualmente comportar sequências melhorando a expressão ou a manutenção na célula hospedeira (intrão, sequência sinal, sequência terminadora da transcrição, local de iniciação da tradução, sequências modificando a apresentação do polipéptido às células do sistema imunitário do hospedeiro...). No entanto, tratando-se de um vector derivado de um poxvírus, evitar-se-á o uso de intrões.

Uma composição de acordo com a invenção pode ser obtida quer com vários vectores recombinantes expressando, cada um, um polipéptido dado quer com um só vector expressando os fragmentos de ADN correspondendo aos polipéptidos escolhidos colocados sob o controle de elementos independentes ou comuns. Segundo esta última

opção, pode recorrer-se a sequências que permitam iniciar a tradução de maneira interna (IRES) ou a fusões em fase dos diferentes genes.

As condições gerais de obtenção de um vector recombinante em uso na presente invenção estão largamente descritas no estado da técnica. Tratando-se de um vector poxviral, podemos nos referir à patente europeia EP 83 186. Estas condições são aplicáveis aos outros vírus aceitáveis como vector que possuem uma região genómica não essencial, na qual os blocos de expressão podem ser incorporados. Claro que eles podem ser inseridos no mesmo *locus* ou num *locus* diferente. Por exemplo, quando se utiliza um vírus da vacínia da estirpe Copenhaga, o local de inserção preferido é o *locus* TK e/ou o *locus* K1L. A inserção ao nível do gene viral TK tem por efeito inactivá-lo e assim facilitar a selecção dos recombinantes. No quadro de um vírus da vacínia da estirpe MVA, a inserção dos genes de papilomavírus e imuno-estimuladores pode realizar-se no seio de uma das excisões I a VI e, de preferência, na zona de excisão II ou III (Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol 72, 1031-1038; Sutter et al., 1994, Vaccine 12, 1032-1040).

Conforme os fins que se pretendem alcançar para a presente invenção, um vector recombinante pode além disso compreender um bloco de expressão de um gene marcador de selecção afim de facilitar as etapas de isolamento e de purificação do vírus recombinante. Pode citar-se especialmente o gene *Neo* conferindo a resistência ao antibiótico G418, o gene *pac* de resistência à puromicina, o gene TK do vírus do herpes simplex de tipo 1 (HSV-1) que confere a sensibilidade a certos análogos de nucleósidos tais como o ganciclovir ou o aciclovir, os genes bacterianos *LacZ* codificante para a β -galactosidase e *gus A* codificante para a β -glucuronidase. Estes dois últimos marcadores enzimáticos permitem assinalar os vírus recombinantes por coloração dos substratos X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido) e XglcA (5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-glucoronido) respectivamente.

Uma composição farmacêutica de acordo com a invenção com vista ao tratamento ou à prevenção de uma infecção ou tumor de papilomavírus, compreende um ou vários vectore(s) recombinante(s) derivado(s) de um vírus da vacínia no(s) quais são inseridos:

- (1) pelo menos um fragmento de ADN codificante para pelo menos um polipéptido da região tardia de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a proteína E6 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a

- proteína E7 de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a molécula B7.1,
- (2) pelo menos um fragmento de ADN codificante para pelo menos um polipéptido da região tardia de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a proteína E6 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína E7 de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a interleucina-2,
 - (3) pelo menos um fragmento de ADN codificante para pelo menos um polipéptido da região tardia de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a proteína E6 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína E7 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a molécula B7.1 e um fragmento de ADN codificante para a interleucina-2
 - (4) um fragmento de ADN codificante para a proteína E6 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína E7 de um papilomavírus um fragmento de ADN codificante para a proteína L1 de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a proteína L2 de um papilomavírus,
 - (5) um fragmento de ADN codificante para a proteína E6 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína E7 de um papilomavírus um fragmento de ADN codificante para a proteína L1 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína L2 de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a molécula B7.1,
 - (6) um fragmento de ADN codificante para a proteína E6 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína E7 de um papilomavírus um fragmento de ADN codificante para a proteína L1 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína L1 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a interleucina-2, ou
 - (7) um fragmento de ADN codificante para a proteína E6 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína E7 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína L1 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína L2 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a molécula B7.1 e um fragmento de ADN codificante para a interleucina-2.

Pelo contrário, uma composição farmacêutica de acordo com a invenção mais particularmente destinada a fins de imunoprevenção, compreende um ou vários vectore(s)

recombinante(s) derivado(s) de um vírus da vacínia no(s) quais são inseridos pelo menos um fragmento de ADN codificante para pelo menos um polipéptido da região precoce de um papilomavírus e:

- (1) um fragmento de ADN codificante para a proteína L1 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína L2 de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a molécula B7.1,
- (2) um fragmento de ADN codificante para a proteína L1 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína L2 de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a interleucina-2,
- (3) um fragmento de ADN codificante para a proteína L1 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína L2 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a interleucina-2 e um fragmento de ADN codificante para a molécula B7.1.

Uma composição de acordo com a invenção pode ser preparada segundo os processos conhecidos no domínio das vacinas e as doses aplicáveis podem variar numa larga gama. Elas são especialmente função dos polipéptidos e do vírus utilizados, da patologia a tratar, do estado do paciente e de outros parâmetros que podem ser avaliados pelo clínico. Todavia, em geral, a dose de vírus por quilograma será de 10^4 a 10^{11} , vantajosamente de 10^6 a 10^{10} e, de preferência de 10^7 a 10^9 , unidades formando colónias (ufp) quando o agente terapêutico é um vector viral e de 0,05 a 500 mg, vantajosamente de 0,5 a 200 mg e, de preferência de 1 a 100 mg quando o agente terapêutico é de origem polipeptídica.

Uma composição de acordo com a invenção pode ser administrada segundo qualquer via convencional de administração, em particular por via intravenosa, intramuscular, subcutânea ou sub-epitelial ou ainda por escarificação. No caso de um tumor acessível, é igualmente possível recorrer a uma injeção directa no local ou na proximidade do tumor ou a uma aplicação tópica. A título de vacina, uma composição de acordo com a invenção pode ser administrada segundo as práticas correntes no domínio, por exemplo um dose única ou repetida uma ou diversas vezes após certo tempo de intervalo. Pelo contrário, no quadro do tratamento curativo, ela pode ser administrada frequentemente durante um período suficiente para que o tratamento seja eficaz. Quando o agente terapêutico é um vector viral, esse vírus está de preferência sob a forma viva. Tratando-se de um vector poxviral, prefere-se utilizar uma estirpe atenuada como a estirpe MVA ou a estirpe Copenhaga timidina quinase negativa. Por fim um vector viral recombinante pode ser

atenuado por um tratamento apropriado conhecido do perito. Todavia, pode considerar-se injectar um vector recombinante morto.

Segundo um modo de realização preferido, uma composição farmacêutica de acordo com a invenção compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um vector recombinante, em associação com um suporte aceitável de um ponto de vista farmacêutico. O suporte é escolhido de modo a permitir a sua administração por injeção ao homem ou ao animal. Ela pode igualmente compreender um veículo, um diluente e/ou um adjuvante e apresentar-se sob forma líquida ou liofilizada.

A presente invenção refere-se igualmente a, uma composição farmacêutica de acordo com a invenção para o tratamento ou a prevenção de cancro do colo do útero, de uma displasia do colo de baixo grau e de uma infecção de papilomavírus.

Enfim, a presente invenção diz igualmente respeito a um método de tratamento ou de prevenção das patologias acima citadas, segundo o qual se administra a um indivíduo tendo necessidade de um tal tratamento uma quantidade eficaz de um ponto de vista farmacêutico de uma mistura de polipéptido ou de um vector recombinante em uso na presente invenção.

A presente invenção é ilustrada por referência às Figuras seguintes:

A Figura 1 é uma representação esquemática do vector pTG5021 permitindo a transferência para o *locus* TK da vacínia Copenhaga dos genes tardios L1 e L2 de HPV-16 colocados sob o controle do promotor p7,5K, estando as duas cassetes em orientação oposta uma em relação à outra.

A Figura 2 é uma representação esquemática do vector pTG5065 permitindo a transferência para o *locus* K1L da vacínia Copenhaga dos genes precoces E6 e E7 de HPV-16 colocados sob o controle do promotor pH5R (estando as duas cassetes em orientação oposta uma em relação à outra), do gene IL-2 humano (IL2h) colocado sob o controle do promotor p7,5K e do gene marcador LacZ (*bla*GAL) colocado sob o controle do promotor pK1L.

A Figura 3 ilustra de maneira esquemática a estratégia que se pode utilizar para introduzir os genes tardios L1 e L2 de HPV-16 no seio da zona de exclusão II de um vírus da vacínia MVA, estando os braços de recombinação esquerda e direita indicados (BRG2 e BRD2), respectivamente.

EXEMPLOS

A presente invenção é mais particularmente descrita, sem por isso ser limitada, com o auxílio dos exemplos seguintes.

As construções descritas acima são realizadas segundo as técnicas gerais de engenharia genética e de clonagem molecular, detalhadas em Maniatis et al., (1989, *supra*) ou segundo as recomendações do fabricante quando se utiliza um kit comercial. A mutagenese dirigida *in vitro* por oligonucleótidos sintéticos é efectuada com o auxílio do kit distribuído por Amersham. As técnicas de amplificação por PCR são conhecidas do perito (ver por exemplo PCR Protocols-A guide to methods and applications, 1990, editado por Innis, Gelfand, Sninsky e White, Academic Press Inc). Tratando-se da sinalização de locais de restrição, a técnica utilizada consiste num enchimento das extremidade 5' protuberantes com o auxílio de um fragmento da ADN polimerase I de *E. Coli* (Klenow).

As etapas de clonagem, os bacteriófagos M13 recombinantes são multiplicados sobre a estirpe *E. Coli* NM522 (Stratagène) num meio mínimo geleizado (agar 7,5%) ou num meio rico LBM líquido. Os plasmídeos recombinantes transportando o gene resistente à ampicilina são replicados nas estirpes *E. Coli* C600 (Stratagène), BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580) e NM522 sobre meio geleizado ou líquido suplementado com 100 µg/ml de antibiótico. Utiliza-se preferencialmente a estirpe BJ5183 quando a clonagem é efectuada por recombinação homóloga (Bubeck et al., 1993, Nucleic Acid Res. 21, 3601-3602).

A construção dos vírus da vacínia recombinantes é efectuada segundo a tecnologia clássica no domínio divulgado nos documentos já citados e em Mackett et al., (1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7415-7419) e Mackett et al. (1984), J. Virol 49, 857-864).

EXEMPLO 1 Construção do vírus da vacínia Copenhagen VVTG5021&5066 expressando os genes E6, E7, L1 e L2 do HPV-16 e o gene IL-2

A. *isolamento dos genes L1 e L2 de HPV16*

Os fragmentos codificantes para as proteínas L1 e L2 são isolados por PCR a partir de ADN genómico de células Caski (ATCC 1550) segundo as técnicas gerais da técnica. O fragmento de amplificação transportando as sequências L1 é sub-clonado no vector M13TG130 (Kieny et al., 1983, Gene 26, 91-99), para dar a construção M13TG8171. A sequência do gene L1 clonado revela diversas mutações em relação à sequência contida em Genbank (acesso K02718): C no lugar de um A na posição 248, C no lugar de um A na posição 253, C no lugar de um A na posição 537, G no lugar de um C na posição 682, G no lugar de um A na posição 874, inserção de um triplete ACT na posição 1393, deleção de um triplete GAT na posição 1390. A inserção de um fragmento PCR transportando as sequências L2 no vector M13TG6131 conduz a M13TG9126. Contam-se 5 mutações pontuais em relação à sequência divulgada em Genbank: C no lugar de um T na posição 378, A no lugar de um G na posição 691, A no lugar de um G na posição 702, G no lugar de um A na posição 990 e C no lugar de um A na posição 1092. A título indicativo, o vector M13TG6131 deriva de M13TG131 (Kieny et al., 1983, *supra*) por mutação do local *Bgl*II interno situado fora dos locais múltiplos de clonagem.

B. *Construção do vector pTG5021 para a transferência dos genes L1 e L2 no locus TK do genoma do vírus da vacínia*

O gene codificante para a proteína L1 é modificado por criação de um local *Bgl*II a montante do ATG iniciador. O gene mutado é excisado do vector precedente (M13TG8185) por digestão *Bgl*II-*Sac*I e inserido entre os locais *Bam*HI e *Sac*I do pTG186-poli. A construção resultante é denominada pTG4019. O vector de transferência pTG186-poli está descrito em detalhe na patente francesa 2 583 429. Ele comporta 10 locais de restrição por inserção do gene a transferir e o promotor p7,5K para o controlo da sua expressão. O gene codificante para a proteína L2 é isolado de M13TG9126 por digestão *Bgl*II-*Hind*III, depois clonado entre os locais *Bam*HI e *Hind*III em 3' do promotor 7,5K. Obtém-se M13TG9127 no qual se introduz por mutagenese localizada um local *Sal*I a montante do promotor. O bloco de expressão "p7,5K-gene L2" é isolado do vector mutado M13TG9129 e clonado no local *Sac*I do vector de transferência pTG4019 de tal maneira que as duas cassetes p7,5K-L1 e p7,5K-L2 estejam em orientação inversa. A construção assim obtida pTG5021 está representada na Figura 1. Os blocos de expressão são

transferidos no genoma do vírus da vacínia estirpe Copenhaga por recombinação homóloga. O vírus recombinante designado VVTG5021 é isolado por selecção com 5-bromodesoxiuridina (5BUDR).

C. Isolamento dos genes E6 e E7 de HPV16

Os genes E6 e E7 são isolados a partir da linhagem celular Caski como descrito nos exemplos 2 e 3 da patente europeia EP 0 462 187. Duas construções foram derivadas do clone M13E7/E6 contendo os genes E6 e E7 do HPV-16 afim de facilitar as etapas ulteriores de clonagem. A primeira designada M13TG8188 resulta da introdução por mutagenese dirigida de locais *Pst*I e *Bam*HI, respectivamente a montante e a jusante do gene E7, e a segunda, designada M13TG8189 comporta um local *Pst*I a jusante do gene E6. A introdução de mutações pontuais a montante de um ATG iniciador e a jusante de um codão de paragem estão ao alcance do perito.

A associação da proteína E7 de HPV-16 com o produto do gene de retinoblastoma foi demonstrada por diversos autores (ver por exemplo Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105) e correlacionada com o seu poder de transformação. Por razões de segurança evidentes, gera-se um mutante não oncogeneo delectado das sequências codificantes para os aminoácidos 21 a 26 da proteína E7 nativa implicados na função de transformação ou mutagenese dirigida do vector M13TG8188 com o auxílio do oligonucleótido oTG5118 (SEQ ID Nº 1). Obtém-se M13TG9104. O gene E7 mutado é designado a seguir E7*.

Do mesmo modo, foi demonstrado que a proteína E6 de HPV-16 podia interagir com o produto da expressão do gene supressor de tumor p53 (Crook et al., 1991, Cell 67, 547-556). O domínio implicado nesta interacção foi claramente definido e situa-se entre os resíduos 111 a 115 da proteína nativa. O vector M13TG9125 é gerado por mutagenese de M13TG8189 com o auxílio do oligonucleótido oTG5377 (SEQ ID Nº 2). O gene E6 mutado é designado a seguir E6*.

D. Construção do vector de transferência pTG5065 portador dos genes E6 e E7 de HPV-16 e do gene do IL-2 humano integrados nos locus K1L

O fragmento *EcoRI* K de 5,2 kb da extremidade esquerda do genoma do vírus vacínia Copenhaga (Guillard et al., 1985, J. Virol. 53, 316-318) é clonado no plasmídeo pUC8 (Gibco BRL) linearizado por *EcoRI*. O vector assim obtido é em seguida submetido a uma digestão realizada por *BglII* seguida de uma ligação afim de delectar um fragmento de 855 pb codificante para o gene de restrição do hospedeiro K1L (Guillard et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83, 5573-5577). O fragmento *BglII* de 3,4 kb é isolado desta construção intermediária designada pUC8Khr, depois clonado no local *BamHI* do plasmídeo pUC7 (Gibco BRL). Gera-se pBACI no qual se introduz um adaptador *XhoI* à esquerda do local *BglII* único. Após digestão por *XhoI* e *BglII*, insere-se um fragmento *SaI-BglII* transportando o promotor vacínia p7,5K. Os dois locais *EcoRI* são eliminados por digestão *EcoRI* seguida de um tratamento pela Klenow e de uma religação. O vector pTG2147 é obtido por introdução no local único *BglII* de um local múltiplo de clonagem isolado do vector p poli II (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201) isolado sob forma de um fragmento *BglII-BamHI*. Ele compreende portanto os braços de recombinação permitindo a inserção no *locus K1L*, enquadrando o promotor p7,5K seguido dos locais de transcrição.

Os genes E6* e E7* são clonados a jusante do promotor vacínia pH5R contido no vector M13TG9132, para dar respectivamente M13TG9138 e M13TG9139. A título indicativo, o vector M13TG9132 provem da inserção do promotor do gene H5R isolado por PCR do genoma viral no fago M13TG6131.

Além disso, o ADNc codificante para a interleucina-2 humana é isolado do plasmídeo pTG36 (patente francesa 2 583 770), introduzido num vector intermediário e retirado por digestão *SaI-BamHI* para ser inserido no vector de transferência pTG2147 tendo como alvo o *locus K1L*. A inserção faz-se ao nível dos locais *PstI* e *XbaI*, situados a jusante do promotor p7,5K, com o auxílio de adaptadores de clonagem. Obtém-se pTG5056.

Isola-se o bloco de expressão pH5R-E6* do vector M13TG9139 sob forma de um fragmento *BglII-BamHI* que é introduzido no local *BamHI* do vector pTG5056. Gera-se o vector pTG5060. Purifica-se o bloco de expressão pH5R-E6* de M13TG9138 e insere-se no local *BamHI* do vector pTG5060, para dar pTG5962. Indica-se que a inserção no *locus K1L* conduz a vírus recombinantes tendo uma capacidade de replicação reduzida, ou mesmo destruída em certos tipos de células. Por estas razões, introduz-se um marcador de selecção positiva para facilitar a identificação dos vírus recombinantes. O vector

pTG5065 resulta da clonagem no local *Bam*HI do vector pTG5062 de uma cassette de expressão "pK1L-gene *LacZ*" isolada do plasmídeo pIV75 (Chen et al., 1993, *Virology* 196, 682-693) por clivagem *Bgl*II-*Bam*HI. Como se visualiza na Figura 2, ele permite transferi-lo dos blocos E6*, E7* e IL-2 no seio do *locus* K1L do vírus da vacínia.

O vírus da vacínia recombinante, denominado VVTG5065, é gerado por recombinação homóloga após transfecção do vector pTG5965 nas células embrionárias de galinha infectadas pela vacínia Copenhaga selvagem e assinalados por coloração sob gelose em X-Gal. Os vírus da vacínia VVTG5021 e VVTG5065 são utilizados nos ensaios de infecções duplas. Seleccionam-se os duplos recombinantes segundo os dois marcadores – formação de colónias azuis na presença de X-Gal e deleção do marcador TK. Estes, denominados VVTG5021&5065, expressam os blocos p7,5K-IL-2, pH5R-E6* e pH5R-E7* integrados no *locus* K1L e os blocos p7,5K-L-1 e p7,5-L2 integrados no *locus* TK.

A expressão dos genes HPV pode ser verificada por análise em Western Blot com o auxílio de anti-corpos monoclonais ou policlonais apropriados ou por PCR reversa. A produção de IL-2 pode ser avaliada por teste ELISA ou teste CTL, como descrito na literatura. A título indicativo, o nível de expressão in vitro é da ordem de 60 ng/ml/10⁶ células infectadas a 1 pfu/célula e 24 h.

EXEMPLO 2 Construção de um vírus vacínia Copenhaga expressando os genes E6, E7e o gene IL-2 humano

Isola-se o ADNc codificante para a interleucina-2 humana do plasmídeo pTG36 por digestão *Pst*I e insere-se no local *Pst*I do plasmídeo pTG86, dando lugar a pTG88. O vírus obtido por recombinação homóloga denomina-se VVTG188.

Isola-se o gene E6* de M13TG9125 sob forma de um fragmento *Pst*I-*Bam*HI e insere-se a jusante do promotor 7,5K entre os locais *Pst*I e *Xba*I de pTG2147, na presença de um adaptador *Bam*HI-*Xba*I dando lugar a pTG5057. Coloca-se o gene E7* sob o controle do promotor vacínia H5R produzindo M13TG9138 e a cassette ladeada pelos locais *Bam*HI-*Bgl*II é sub-clonada no local *Bam*HI de pTG5057. Obtém-se pTG5059, no local *Bam*HI no qual se insere o marcador de selecção *LacZ* sob a dependência do promotor do gene vacínia K1L isolado por digestão *Bgl*II-*Bam*HI do vector pIV75. A construção resultante é

designada pTG5061 e o vírus gerado por recombinação homóloga com o genoma vacínia VVTG5061.

Obtém-se um vírus da vacínia recombinante expressando os genes E6* e E7* integrados no *locus K1L* e o gene do IL-2-humano integrado no locus TK por co-infecção de células embrionárias de galinha pelos vírus VVTG5061 e VVTG188. A título indicativo, este último produz aproximadamente uma quantidade de IL-2 superior a 400 ng por 10⁶ células infectadas a 1 pfu por célula durante 24 h. O vírus obtido duplamente recombinante é designado VVTG5061&188.

EXEMPLO 3 Construção de um vírus vacínia Copenhaga expressando os genes E6, E7 e o gene codificante para o co-factor de adesão B7.1 humano

Isola-se o ADNc codificante para B7.1 de uma preparação de ARNm obtida da linhagem celular Daudi (ATCC CCL-213) por PCR reversa utilizando os iniciadores (oTG6353 e oTG6352 (SEQ ID Nº: 3 e 4). Indica-se que a sequência do gene está divulgada em Genebank sob o número de acesso M27533. O fragmento amplificado é clonado entre os locais *Bgl*II e *Eco*RI do M13TG6131, conduzindo ao M13TG9149, depois entre os locais *Bam*HI e *Eco*RI do pTG186. A construção é denominada pTG5090 e o vírus obtido por recombinação homóloga VVTG5090. Obtém-se um vírus da vacínia expressando os genes E6* e E7* de HPV-16 integrados no *locus K1L* e o gene B7.1 humano, integrado no *locus* TK, pode ser obtido por co-infecção de células embrionárias de galinha pelos vírus VVTG5061 e VVTG5090. O vírus recombinante é designado VVTG5061&5090.

EXEMPLO 4 Construção de um vírus vacínia estirpe MVA expressando os genes E6, E7 e o gene B7.1 integrados no seio da zona de excisão III

O vírus MVA deriva da estirpe do vírus da vacínia Ankara. Ele não é capaz de gerar partículas infecciosas sobre as células de mamíferos mas desenvolve-se correctamente sobre fibroblastos embrionários de galinha. A sua adaptação a estas células provocou a excisão de 6 regiões não essenciais para o seu desenvolvimento e o seu ciclo infeccioso sobre este tipo de células (desaparecimento de cerca de 15% do genoma viral; Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038). A integração de material genético exógeno pode realizar-se ao nível de qualquer uma das zonas de excisão. No quadro da presente

invenção, utilizam-se as excisões II e III localizadas ao nível dos fragmentos de restrição *HindIII* N e A, respectivamente, (Altenburger et al., 1989, Arch. Virol. 105, 15-27).

Num primeiro momento, constrói-se o vector pTG6019 permitindo a inserção na zona de excisão III do vírus MVA. Os braços de recombinação homólogo de um lado e do outro da zona de excisão III são isolados por PCR a partir do genoma viral (ver patente americana US 5.185.146) e iniciadores oTG7637 e oTG7638 (SEQ ID Nº: 5 e 6) para o braço esquerdo e oTG7635 e oTG7636 (SEQ ID Nº: 7 e 8) para o braço direito. Os fragmentos amplificados são clonados no local *EcoRI* do vector pTG1E para dar pTG6019. O material genético a transferir é inserido entre os dois braços de recombinação. O vector pTG1E é similar ao pTG1H (patente francesa 2 583 429) excluindo a presença de um adaptador *EcoRI* em vez de locais múltiplos de clonagem.

Insere-se em primeiro lugar uma cassete de expressão do gene marcador *gus A*. O promotor 7,5K é clonado primeiro no local *BamHI* de pTG6019. Obtém-se pTG6021 no local *BamHI* do qual se insere o gene *gus A* sob forma de um fragmento *BglII-BamHI*. Este pode ser obtido a partir da sequência divulgada na literatura. A construção é denominada pTG6022. A presença do marcador vai permitir discriminar os vírus selvagens dos vírus recombinantes por detecção da actividade enzimática GUS pelo substrato XglcA. Uma coloração vermelha revela a actividade β -glucuronidase. Entretanto, na óptica de uma aplicação clínica, pode ser útil ser capaz de eliminar este marcador bacteriano do produto final após a selecção dos vírus recombinantes. Para isso, aproveita-se a capacidade da vacínia delectar as sequências compreendidas entre dois locais homólogos. É por isso que se insere um segundo promotor p7,5K a jusante do gene *gus A* numa orientação sens em relação ao que dirige a expressão deste último. O vector pTG6022 é modificado por inserção entre os locais *BamHI* e *SacI* de um fragmento p7,5K munido de extremidade coesivas, para dar pTG6025.

Este é completado por inserção das cassetes de expressão dos genes E6* e E7* mutados. Começa por introduzir-se uma nova sequência promotora p7,5K desta vez em orientação anti-sens em relação às precedentes. Esta construção denominada pTG6039 compreende portanto a cassete GUS lábil "p7,5K→ *gus A*-p7,5K→" seguida de p7,5K na orientação oposta. Em paralelo, os genes E6* e E7* são isolados respectivamente dos vectores M13TG9104 e M13TG9125 por digestão *BamHI* e *PstI* e reunidos em orientação oposta um do outro no local *PstI* de M13TG6131. O conjunto é retirado sob forma de um

fragmento *Pst*I que é inserido em pTG6039 linearizado por esta mesma enzima. Obtém-se o vector pTG6056 que contém as sequências seguintes p7,5K→ *gus A*-p7,5K →E7*-E6*←p7,5K".

O gene imuno-estimulador B7.1 é inserido nesta última construção. Para fazer isto, o vector pTG6056 é clivado por *Hind*III e *Kpn*I antes de ser colocado em ligação na presença dos oligonucleótidos oTG10451 e oTG10450 (SEQ ID Nº: 9 e 10), para gerar pTG6070. Estes últimos vão permitir a clonagem da cassette de expressão "pH5R-B7.1" por recombinação homóloga. Para este efeito, as sequências B7.1 isoladas de M13TG9149 são clonadas a jusante do promotor vacínia pH5R, para formar M13TG9184. O fragmento *Bgl*III-*Eco*RI transportando a cassette é integrado no vector pTG6070 linearizado por *Xho*I por recombinação homóloga em *E. coli*. Obtém-se o vector pTG6079 que no total comporta o gene marcador *gus A* sob uma forma "lábil" e as cassetes de expressão precoces de HPV-16 bem como uma cassette do gene de co-estimulação B7.1. O vírus gerado por recombinação homóloga com o genoma MVA é designado MVATG6079.

Os blocos de expressão dos genes tardios do HPV-16 podem ser inseridos no seio da zona de excisão II com o auxílio do vector de transferência pTG6018. Este é construído por inserção no local *Eco*RI de pTG1E dos braços de recombinação esquerdo e direito que ladeiam a excisão II, gerados por PCR utilizando os iniciadores oTG7665 e oTG7584 (SEQ ID Nº: 11 e 12) e oTG7639 e oTG7640 (SEQ ID Nº: 13 e 14). Como anteriormente, integra-se entre os dois braços uma cassette de expressão de um marcador positivo para facilitar a detecção dos vírus recombinantes, podendo este ser eliminado após a etapa de selecção (Spehner et al., 1990, J. Virol. 64, 527-533) o vector pTG6020 resulta da clonagem do gene *LacZ* colocado a jusante do promotor p7,5K no vector pTG6018 linearizado por *Bam*HI. O pTG6020 é modificado por inserção de uma sequência p7,5K entre os seus locais *Bam*HI e *Sac*I situados a jusante do gene *LacZ*. Obtém-se pTG6024. As cassetes L1 e L2 podem ser em seguida ser introduzidas segundo uma estratégia tal como se mostra na Figura 3.

EXEMPLO 5 Construção de um vírus vacínia estirpe MVA expressando os genes E6, E7 e o gene IL-2 integrados no seio da zona de excisão III

Utiliza-se a mesma estratégia que anteriormente para introduzir o gene IL-2 no vector pTG6056. Após clonagem dos oligonucleótidos de recombinação oTG10503 e oTG10502

(SEQ ID Nº: 15 e 16) para produzir pTG6076, este último é clivado por *XhoI* e o fragmento *BglII-EcoRI* preparado a partir de M13TG9185 (pH5R-IL-2) inserido por recombinação homóloga. O vector pTG6090 assim obtido compreende o gene marcador *gus A* sob uma forma "lábil", as cassetes de expressão dos genes precoces de HPV-16 bem como uma cassette do gene IL-2 humano. O vírus recombinante obtido por recombinação homóloga com o genoma MVA é designado MVATG6090. Os genes tardios podem ser integrados na zona de excisão II utilizando o pTG6018, como indicado acima.

EXEMPLO 6: Validação do vector VVTG5021&5065 em modelo animal

A. *Estudos de toxicidade*

Ratos desprotegidos receberam 10^7 pfu de VVTG5021&5065 ou 10^7 pfu de vírus vacínia selvagem por via intravenosa, intramuscular, subcutânea ou intracranial. Constituem-se lotes de 5 ratos segundo o tipo de vírus injectado e a via de administração e avalia-se, 26 dias após a injeção, o número de animais que apresentam lesões ligadas à vacínia. Os ratos que receberam o vírus recombinante não mostram nenhuma lesão qualquer que seja a via de administração utilizada enquanto que a maioria dos animais tratados com a vacínia selvagem apresenta lesões com uma frequência e uma gravidade função da via de administração. Além disso, registaram-se mortes no caso de uma injeção intravenosa e intracranial. Estes dados mostram que o VVTG5021&5065 é atenuado em relação ao vírus selvagem e que não conduz a lesões mesmo após injeção intracranial.

B. *Experiências de imunoprevenção com o VVTG5021&5065*

Vacinaram-se ratos C57BL6 em três vezes por via subcutânea com 10^7 pfu de VVTG5021&5065. Três dias após a última imunização, estes animais são ensaiados com 10^3 células E7W1 implantadas subcutaneamente. A título indicativo, as células E7W1 provêm de uma linhagem de linfoma murino transfectado por um vector expressando o gene E7 oncogénico de HPV-16. A percentagem de sobrevivência dos animais em função do tempo é comparada à obtida com ratos testemunha tratados com 10^7 pfu de um vírus da vacínia não recombinante VVTG186 (derivado do vector TG186 descrito acima). O seguimento da mortalidade mostra que há uma diferença entre os dois grupos. No grupo testemunha, 100% dos animais estão mortos no D36 enquanto que 40% dos animais vacinados por VVTG5021&5065 estão ainda vivos no D36 e mais de 30% no D51.

Assim, os vírus recombinantes expressando os antígenos de HPV e um gene imunoestimulador apresentam uma actividade anti-tumoral contra as células tumorais expressando o oncogene E7 de HPV-16.

C. Experiências de imunoterapia

Inocularam-se ratos C57 BL6 com 10^3 células E7 W1 implantadas subcutaneamente (D0). Em seguida administraram-se 10^7 pfu de vírus recombinantes igualmente de sob forma subcutânea no D3 depois no D6 e por fim no D9 e determinou-se a percentagem de sobrevivência dos animais controlos tendo recebido um vírus não recombinante. Enquanto que 100% dos animais controlos estão mortos, observa-se um aumento notável da sobrevivência dos animais injectados com uma mistura de VVTG5061&5021 e de VVTG188. Obtiveram-se resultados similares após administração de VVTG5065&5021 e VVTG188.

Estas experiências de imunoterapia foram reproduzidas utilizando um modelo tumoral diferente, células BMK16 myc substituindo as células E7wl. As células BMK16 myc são células de rim de ratos recém-nascidos transfectadas pelo genoma de HPV-16 e o gene c myc murino. Os animais são tratados por 10^7 vírus MVA TG6090 expressando os genes E6*, E7* de HPV-16 e a IL-2 humana. Em relação aos controlos, os ratos tratados apresentam um atraso do crescimento tumoral até ao D15.

LISTA DAS SEQÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) DEPOSITANTE:

- (A) NOME: Transgene S.A.
- (B) RUA: 11 rue de Molsheim
- (C) CIDADE: Estrasburgo
- (D) PAÍS: França
- (E) CÓDIGO POSTAL: 67082
- (F) TELEFONE: (33) 88 27 91 00
- (G) TELECÓPIA: (33) 88 27 91 11

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Composição farmacêutica contra os tumores e infecções de papilomavírus

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 16

(iv) FORMA LEGÍVEL POR COMPUTADOR:

(A) TIPO DE SUPORTE: Fita

(B) COMPUTADOR: IBM PC compatível

(C) SISTEMA DE EXPLORAÇÃO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SUPORTE LÓGICO: PatentIn Release # 1,0, Versão # 1,25 (OEB)

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 1

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genômico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: NÃO

(iv) ORIGEM:

(A) ORGANISMO: papilomavírus humano

(B) ESTIRPE: HPV-16

(C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese oTG5118
(E7 delecta 21 a 26)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 1:

TCTGAGCTGT CATTAAATTG AGTTGTCTCT GGTTCG

36

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 2

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO:** 32 pares de bases
- (B) TIPO:** ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES:** simples
- (D) CONFIGURAÇÃO:** linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: NÃO

(iv) ORIGEM:

- (A) ORGANISMO:** papilomavírus humano
- (B) ESTIRPE:** HPV-16
- (C) INDIVIDUAL ISOLADO:** oligonucleótido de síntese oTG5377
(E7 delecta 111 a 115)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 2:

TGTCCAGATG TCTTTGCAGT GGTTTTGAC AG

32

INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 3

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO:** 35 pares de bases
- (B) TIPO:** ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES:** simples
- (D) CONFIGURAÇÃO:** linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: NÃO

(iv) ORIGEM:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

(C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese oTG6353
(PCR gene B7.1)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 3:

TCAGCCCCTG AATTCTGCGG AACTGTTAT ACAGG

35

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 4

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: SIM

(iv) ORIGEM:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

(C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese oTG6352
(PCR gene B7.1)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 4:

TTGACCCTAA AGATCTGAAG CCATGGGCCA CAC

33

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 5

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 32 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: NÃO

(iv) ORIGEM:

- (A) ORGANISMO: vírus Vacínia
- (B) ESTIRPE: Ankara modificada
- (C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese oTG7637
(PCR zona III)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 5:

GGGGGGGAAT TCAGTAAACT TGACTAAATC TT

32

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 39 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: SIM

(iv) ORIGEM:

(A) ORGANISMO: vírus Vacínia

(B) ESTIRPE: Ankara modificada

(C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese oTG7638
(PCR zona III)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 6:

GGGGGGGGGAT CCGAGCTCAC CAGCCACCGA AAGAGCAAT

39

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 32 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genômico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: NÃO

(iv) ORIGEM:

(A) ORGANISMO: vírus Vacínia

(B) ESTIRPE: Ankara modificada

(C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese oTG7635
(PCR zona III)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 7:

GGGGGGGGGAT CCGGAAAGTT TTATAGGTAG TT

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: SIM

(iv) ORIGEM:

- (A) ORGANISMO: vírus Vacínia
- (B) ESTIRPE: Ankara modificada
- (C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese oTG7636
(PCR zona III)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 8:

GGGGGGGAAT TCTTTGTATT TACGTGAACG

30

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 78 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: NÃO

(iv) ORIGEM:

(C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese oTG10451

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 9:

CTTATACAGG GCGTACACTT TCCCTTCTCA ATCTCTCTCG AGTTGATATTT 52

ATTTTCATTT TTAAGTATA GAATAAAA

78

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 86 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genômico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: SIM

(iv) ORIGEM:

(C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese oTG10450

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 10:

AGCTTTTTAT TCTATACTTA AAAAATGAAA ATAAATACAA

40

CTCGAGAGAG ATTGAGAAGG GAAGTGTAC GCCCTGTATA AGGTAC

86

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 39 pares de bases

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: NÃO

(iv) ORIGEM:

- (A) ORGANISMO: vírus Vacínia
- (B) ESTIRPE: Ankara modificada
- (C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese oTG7665
(PCR zona II)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 11:

ATGGTACCGA ATTCCATCTA CCAATTCATC CAACAACAT

39

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 41 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: SIM

(iv) ORIGEM:

- (A) ORGANISMO: vírus Vacínia
- (B) ESTIRPE: Ankara modificada
- (C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese oTG7584
(PCR zona II)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 12:

GGCTGCAGGA TCCGACTCA TCATGACGTC CTCTGCAATG G

41

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 32 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: NÃO

(iv) ORIGEM:

- (A) ORGANISMO: vírus Vacínia
- (B) ESTIRPE: Ankara modificada
- (C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese oTG7639
(PCR zona II)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 13:

GGGGGGGGAT CCTGTGAATC ATCCATTCCA CT

32

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 33 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: SIM

(iv) ORIGEM:

- (A) ORGANISMO: vírus Vacínia
- (B) ESTIRPE: Ankara modificada
- (C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese oTG7640
(PCR zona II)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 14:

GGGGGGAAT TCGTTACTAA ATTGCAAGGA AAT

33

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 69 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: NÃO

(iv) ORIGEM:

(C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese oTG10503

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 15:

CTCAAGTCAG TGTTGAGATG ATGCTTTGAC AACTCGAGTT	40
TATTTTCATT TTTTAAGTAT AGAATAAAA	69

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 77 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genômico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: SIM

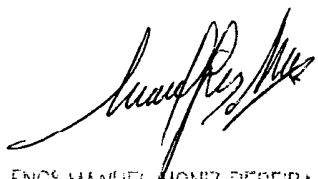
(iv) ORIGEM:

(C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese oTG10502

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 16:

AGCTTTTTAT TCTATACTTA AAAAATGAAA ATAACTCGA	41
GTTGTCAAAG CATCATCTA AACTGACTT GAGGTAC	77

Lisboa, 18 DEZ. 2001
Por TRANSGENE S.A.



ENG. MANUEL MONIZ PEREIRA

Agente Oficial da Propriedade Industrial

Arco da Conceição, 3, 1.º - 1100 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica destinada ao tratamento ou à prevenção de uma infecção ou tumor de papilomavírus que compreende a título de agentes terapêuticos:
 - (1) pelo menos um polipéptido originário da região precoce de um papilomavírus e pelo menos um polipéptido originário da região tardia de um papilomavírus, ou
 - (2) pelo menos um polipéptido originário da região precoce de um papilomavírus, pelo menos um polipéptido originário da região tardia de um papilomavírus e pelo menos um polipéptido tendo uma actividade imuno-estimuladora,
 - com excepção da combinação constituída por um polipéptido originário da região precoce E7 de um papilomavírus e por um polipéptido originário da região tardia L2 de um papilomavírus, e
 - e sendo entendido que o referido polipéptido tendo uma actividade imuno-estimuladora e/ou o referido polipéptido originário da região precoce não seja(m) fundido(s) ao referido polipéptido originário da região tardia.
2. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por o polipéptido originário da região precoce de um papilomavírus derivar da proteína E6, da proteína E7 ou das proteínas E6 e E7 de um papilomavírus.
3. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por o polipéptido originário da região precoce de um papilomavírus ser uma variante não oncogénica da proteína E6 e/ou E7 de um papilomavírus.
4. Composição farmacêutica de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada por o polipéptido originário da região tardia de um papilomavírus derivar da proteína L1, da proteína L2 e das proteínas L1 e L2.
5. Composição farmacêutica de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada por o polipéptido tendo uma actividade imuno-estimuladora ser seleccionado entre o grupo constituído pela interleucina-2, a interleucina-7, a interleucina-12 e as moléculas de co-adesão B7.1 e B7.2.
6. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 5, caracterizada por o polipéptido tendo uma actividade imuno-estimuladora derivar da interleucina-2.

7. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizada por o polipéptido tendo uma actividade imuno-estimuladora derivar da molécula B7.1.

8. Composição farmacêutica de acordo com uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada por compreender:

- (1) um polipéptido originário da região E6, um polipéptido originário da região E7, um polipéptido originário da região L1 e um polipéptido originário da região L2 de um papilomavírus,
- (2) um polipéptido originário da região E6, um polipéptido originário da região E7, um polipéptido originário da região L1, um polipéptido originário da região L2 de um papilomavírus e um polipéptido derivado de interleucina-2,
- (3) um polipéptido originário da região E6, um polipéptido originário da região E7, um polipéptido originário da região L1, um polipéptido originário da região L2 de um papilomavírus e um polipéptido derivado da moléculas B7.1, ou
- (4) um polipéptido originário da região E6, um polipéptido originário da região E7, um polipéptido originário da região L1, um polipéptido originário da região L2 de um papilomavírus, um polipéptido derivado da moléculas B7.1 e um polipéptido derivado de interleucina-2.

9. Composição farmacêutica de acordo com uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada por o papilomavírus ser seleccionado entre os tipo HPV-16, HPV, 18, HPV-31, HPV-33 e/ou HPV-45.

10. Composição farmacêutica destinada ao tratamento ou à prevenção de uma infecção ou tumor de papilomavírus que compreende a título de agente(s) terapêutico(s) um ou vários vector(es) recombinante(s) no(s) quais são inseridos fragmentos de ADN codificante para:

- (1) pelo menos um polipéptido originário da região precoce de um papilomavírus e pelo menos um polipéptido originário da região tardia de um papilomavírus, ou
- (2) pelo menos um polipéptido originário da região precoce de um papilomavírus, pelo menos um polipéptido originário da região tardia de um papilomavírus e pelo menos um polipéptido tendo uma actividade imuno-estimuladora;

sendo os referidos fragmentos de ADN colocados sob o controle de elementos necessários à sua expressão numa célula ou num organismo hospedeiro.

11. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 10, caracterizada por os referidos polipéptidos terem as características definidas nas reivindicações 2 a 9.
12. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizada por o vector recombinante ser um vector viral.
13. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 12, caracterizada por o vector recombinante derivar de um poxvírus.
14. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 13, caracterizada por o poxvírus ser seleccionado entre o grupo constituído pelo vírus da vacínia, o canaripox e o fowlpox.
15. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 12 ou 13, caracterizada por o vector recombinante derivar de um vírus da vacínia seleccionado entre as estirpes Copenhaga, Wyeth e Ankara modificada (MVA).
16. Composição farmacêutica de acordo com uma das reivindicações 13 a 15, caracterizada por os elementos essenciais à expressão dos fragmentos de ADN codificante para os referidos polipéptidos compreenderem um promotor de um gene de um vírus da vacínia seleccionado entre os promotores dos genes timidina quinase (TK), 7,5K, H5R K1L.
17. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 15 ou 16, caracterizada por o vector recombinante derivar de um vírus da vacínia da estirpe Copenhaga e por os fragmentos de ADN codificante para os referidos polipéptidos serem inseridos no locus TK e/ou no locus K1L do referido vírus da vacínia.
18. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 15 ou 16, caracterizada por o vector recombinante derivar de um vírus da vacínia da estirpe MVA e por os fragmentos de ADN codificante para os referidos polipéptidos serem inseridos ao nível de qualquer uma das zonas de excisão seleccionadas entre as excisões I, II, III, IV, V ou VI do referido vírus da vacínia.

19. Composição farmacêutica de acordo com uma das reivindicações 10 a 18, destinada ao tratamento ou à prevenção de uma infecção ou tumor de papilomavírus caracterizada por compreender um ou vários vector(es) recombinante(s) derivado(s) de um vírus da vacínia nos quais são inseridos:

- (1) pelo menos um fragmento de ADN codificante para pelo menos um polipéptido da região tardia de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a proteína E6 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína E7 de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a molécula B7.1,
- (2) pelo menos um fragmento de ADN codificante para pelo menos um polipéptido da região tardia de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a proteína E6 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína E7 de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a interleucina-2,
- (3) pelo menos um fragmento de ADN codificante para pelo menos um polipéptido da região tardia de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a proteína E6 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína E7 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a molécula B7.1 e um fragmento de ADN codificante para a interleucina-2
- (4) um fragmento de ADN codificante para a proteína E6 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína E7 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína L1 de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a proteína L2 de um papilomavírus,
- (5) um fragmento de ADN codificante para a proteína E6 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína E7 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína L1 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína L2 de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a molécula B7.1,
- (6) um fragmento de ADN codificante para a proteína E6 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína E7 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína L1 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína L2 de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a interleucina-2, ou
- (7) um fragmento de ADN codificante para a proteína E6 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína E7 de um papilomavírus, um

fragmento de ADN codificante para a proteína L1 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína L2 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a molécula B7.1 e um fragmento de ADN codificante para a interleucina-2.

20. Composição farmacêutica de acordo com uma das reivindicações 10 a 18 destinada à prevenção de uma infecção ou tumor de papilomavírus, caracterizada por compreender um ou vários vectore(s) recombinante(s) derivado(s) de um vírus da vacínia no(s) quais são inseridos pelo menos um fragmento de ADN codificante para pelo menos um polipéptido originário da região precoce de um papilomavírus e:

- (1) um fragmento de ADN codificante para a proteína L1 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína L2 de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a molécula B7.1,
- (2) um fragmento de ADN codificante para a proteína L1 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína L2 de um papilomavírus e um fragmento de ADN codificante para a interleucina-2, ou
- (3) um fragmento de ADN codificante para a proteína L1 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a proteína L2 de um papilomavírus, um fragmento de ADN codificante para a interleucina-2 e um fragmento de ADN codificante para a molécula B7.1.

21. Composição farmacêutica de acordo com uma das reivindicações 10 a 20, caracterizada por os referidos fragmentos de ADN serem colocados sob o controlo de elementos independentes ou comuns.

22. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 10, caracterizada por compreender, a título de agentes terapêuticos, um primeiro vector recombinante no qual é(são) inserido(s) um ou vários fragmentos de ADN codificante para pelo menos um polipéptido originário da região precoce de um papilomavírus e um ou vários fragmentos de ADN codificante para pelo menos um polipéptido originário da região tardia de um papilomavírus e um segundo vector recombinante no qual é(são) inserido(s) um ou vários fragmentos de ADN codificante para pelo menos um polipéptido tendo uma actividade imuno-estimuladora.

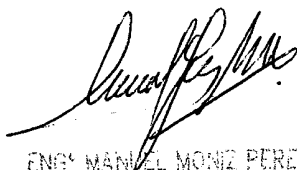
23. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 22, caracterizada por os fragmentos de ADN inseridos no primeiro vector codificarem para E6, E7, L1 e L2 e por o fragmento de ADN inserido no segundo vector codificar para IL-2.

24. Composição farmacêutica de acordo com uma das reivindicações 1 a 23, caracterizada por comportar um suporte aceitável de um ponto de vista farmacêutico.

25. Composição farmacêutica de acordo com uma das reivindicações 1 a 24, a título de medicamento para o tratamento ou a prevenção do cancro do colo do útero, de uma displasia do colo do útero de baixo grau e de uma infecção de papilomavírus.

Lisboa, 18 DEZ. 2001

Por TRANSGENE S.A.



ENG. MANUEL MONIZ PEREIRA
Agente Oficial de Propriedade Industrial
Arco da Conceição, 3, 1.º - 1100 LISBOA

RESUMO

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTRA OS TUMORES E INFECÇÕES DE PAPILOMAVÍRUS

A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica destinada ao tratamento ou à prevenção de uma infecção ou tumor de papilomavírus que compreende a título de agentes terapêuticos um polipéptido originário de uma região precoce e um polipéptido originário de uma região tardia de um papilomavírus, eventualmente associados a um polipéptido tendo uma actividade imuno-estimuladora, ou um polipéptido originário de uma região precoce ou tardia de um papilomavírus e um polipéptido tendo uma actividade imuno-estimuladora ou, de modo alternativo, um vector recombinante no qual são inseridos os fragmentos de ADN codificante para as combinações de polipéptidos citadas acima.

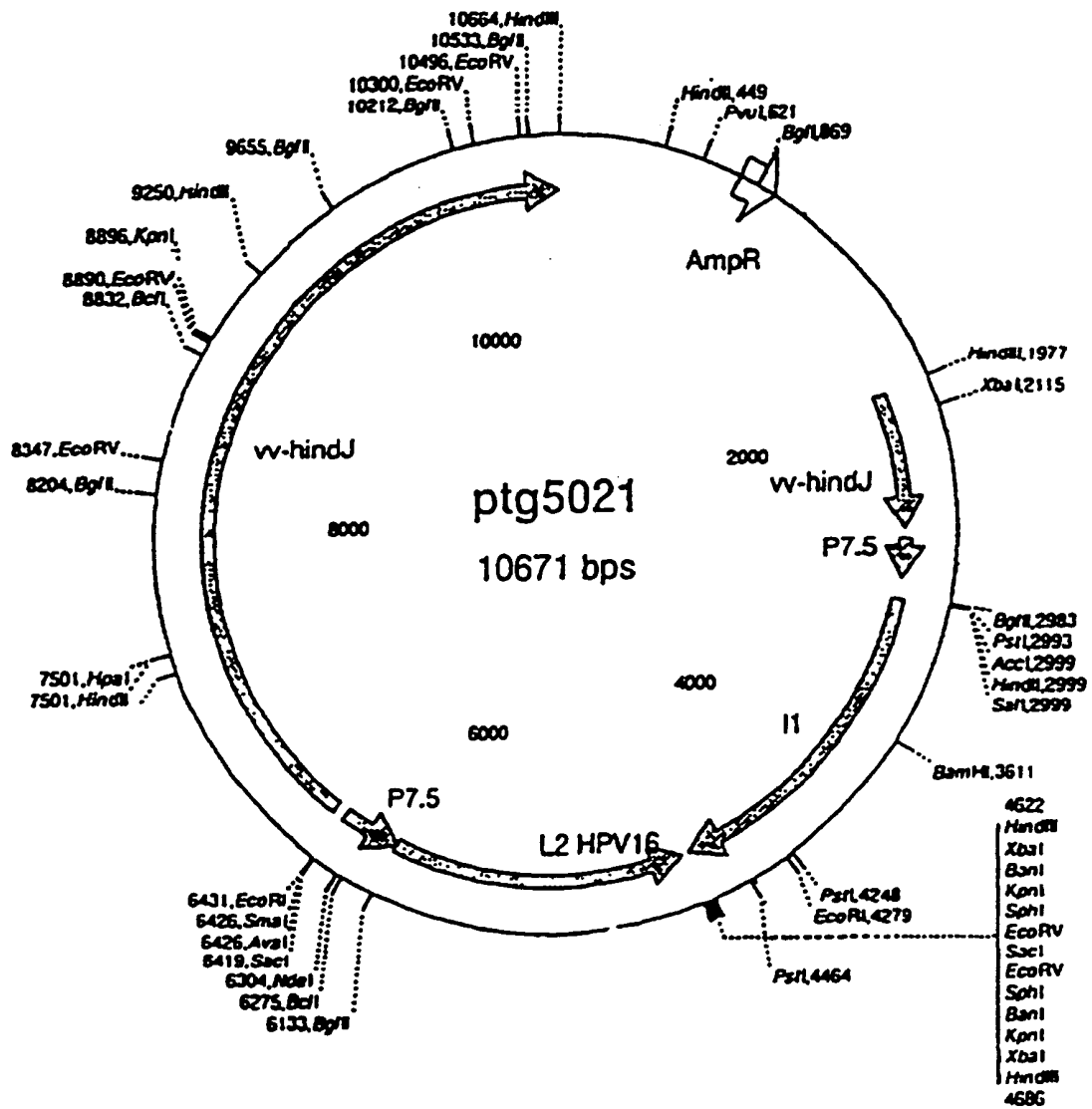


FIG. 1

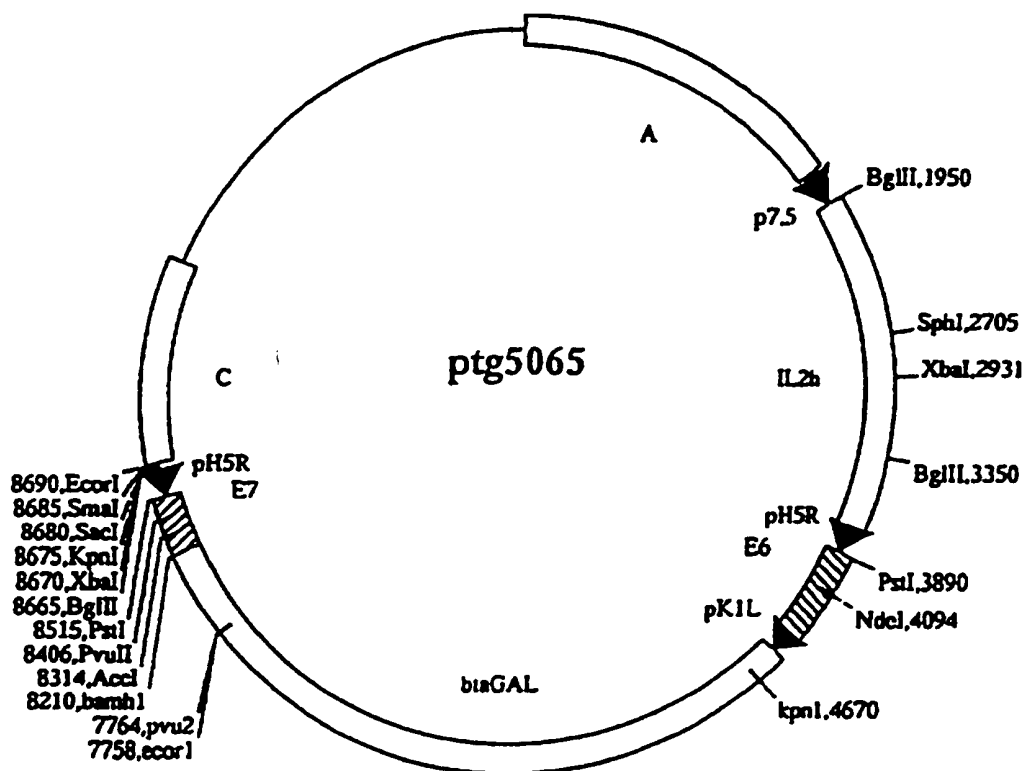


FIG. 2

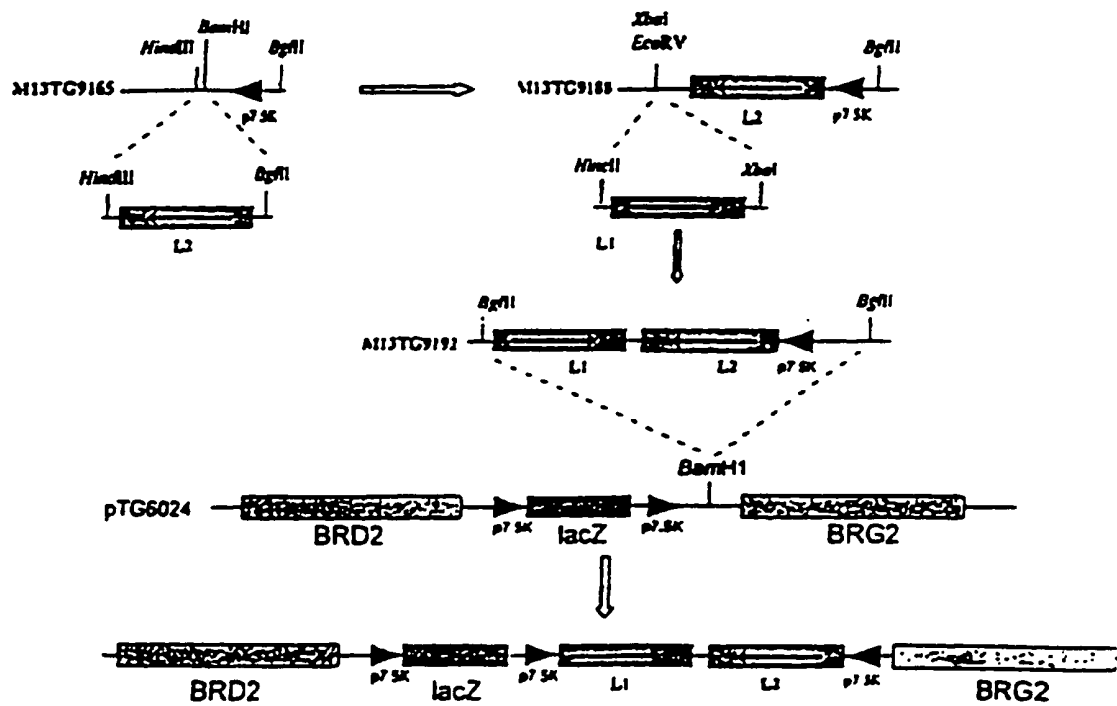


FIG.3