

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

(22) Data de pedido: 2005.06.15	(73) Titular(es): WYETH LLC FIVE GIRALDA FARMS, MADISON NEW JERSEY 07940 US
(30) Prioridade(s): 2004.06.17 US 580438 P 2004.11.03 US 624983 P 2005.03.16 US 662275 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.11.11	(72) Inventor(es): MANINDER K. SIDHU US JOHN H. ELDRIDGE US MICHAEL EGAN US ZIMRA ISRAEL US
(45) Data e BPI da concessão: 2012.06.06 141/2012	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PLASMÍDEO COM TRÊS UNIDADES DE TRANSCRIÇÃO COMPLETAS E COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNITÁRIA AO VIH**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO FORNECE UM PLASMÍDEO DE ADN QUE COMPREENDE: (A) UMA PRIMEIRA UNIDADE DE TRANSCRIÇÃO QUE COMPREENDE UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEÓTIDOS QUE CODIFICA UM PRIMEIRO POLIPÉPTIDO LIGADO DE MODO FUNCIONAL A ELEMENTOS REGULADORES INCLUINDO UM PRIMEIRO PROMOTOR E UM PRIMEIRO SINAL DE POLIADENILAÇÃO; (B) UMA SEGUNDA UNIDADE DE TRANSCRIÇÃO QUE COMPREENDE UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEÓTIDOS QUE CODIFICA UM SEGUNDO POLIPÉPTIDO LIGADO DE MODO FUNCIONAL A ELEMENTOS REGULADORES INCLUINDO UM SEGUNDO PROMOTOR E UM SEGUNDO SINAL DE POLIADENILAÇÃO; (C) UMA TERCEIRA UNIDADE DE TRANSCRIÇÃO QUE COMPREENDE UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEÓTIDOS QUE CODIFICA UM TERCEIRO POLIPÉPTIDO LIGADO DE MODO FUNCIONAL A ELEMENTOS REGULADORES INCLUINDO UM TERCEIRO PROMOTOR E UM TERCEIRO SINAL DE POLIADENILAÇÃO; EM QUE OS REFERIDOS PRIMEIRO, SEGUNDO E TERCEIRO PROMOTORES DERIVAM DE UNIDADES DE TRANSCRIÇÃO DIFERENTES; E EM QUE OS REFERIDOS PRIMEIRO, SEGUNDO E TERCEIRO SINAIS DE POLIADENILAÇÃO DERIVAM DE UNIDADES DE TRANSCRIÇÃO DIFERENTES. A INVENÇÃO REFERE-SE AINDA A COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNITÁRIA AO VIH COMPREENDENDO COMBINAÇÕES DE DOIS, TRÊS OU QUATRO PLASMÍDEOS, EM QUE CADA PLASMÍDEO EXPRESSA UM ANTIGÉNIO DEFINIDO, QUE PODE SER UM ÚNICO ANTIGÉNIO OU UMA FUSÃO DE DOIS OU TRÊS ANTIGÉNIOS.

RESUMO**"PLASMÍDEO COM TRÊS UNIDADES DE TRANSCRIÇÃO COMPLETAS E
COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS PARA INDUZIR UMA RESPOSTA
IMUNITÁRIA AO VIH"**

A invenção fornece um plasmídeo de ADN que compreende: (a) uma primeira unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um primeiro polipéptido ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um primeiro promotor e um primeiro sinal de poliadenilação; (b) uma segunda unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um segundo polipéptido ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um segundo promotor e um segundo sinal de poliadenilação; (c) uma terceira unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um terceiro polipéptido ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um terceiro promotor e um terceiro sinal de poliadenilação; em que os referidos primeiro, segundo e terceiro promotores derivam de unidades de transcrição diferentes; e em que os referidos primeiro, segundo e terceiro sinais de poliadenilação derivam de unidades de transcrição diferentes. A invenção refere-se ainda a composições imunogénicas para induzir uma resposta imunitária ao VIH compreendendo combinações de dois, três ou quatro plasmídeos, em que cada plasmídeo expressa um antigénio definido, que pode ser um único antigénio ou uma fusão de dois ou três antigénios.

DESCRIÇÃO

"PLASMÍDEO COM TRÊS UNIDADES DE TRANSCRIÇÃO COMPLETAS E COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNITÁRIA AO VIH"

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se a plasmídeos, composições imunogénicas e métodos para melhorar as respostas imunitárias profiláticas e terapêuticas aos antigénios.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A imunização que utiliza composições imunogénicas baseadas em ADN de plasmídeo é uma potente ferramenta útil para o desenvolvimento de abordagens para prevenir ou tratar doenças infecciosas ou no tratamento de processos de doença em curso. A imunização de ADN de plasmídeo foi testada extensivamente em modelos de animais, onde foi possível descobrir que a mesma é eficaz na indução de respostas imunitárias celulares e humorais contra uma grande variedade de agentes infecciosos e antigénios de tumor. Consulte Donnelly JJ, *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*; 15: 617-48 (1997); Iwasaki A, *et al.*, *J Immunol* 158 (10): 4591-601 (1997); Wayne, C.L e Bennett M., *Crit. Rev. Immunol.*, 18: 449-484 (1998).

Uma vantagem importante da imunização à base de ADN de plasmídeo é o facto de os genes poderem ser clonados, modificados e posicionados num vetor de expressão de ADN de plasmídeo potencial de modo a permitir modificações pós-transcricionais relevantes, níveis de expressão, tráfego intracelular apropriado e apresentação de antigénios. Os vetores de ADN de plasmídeo úteis para a imunização de ADN são semelhantes aos utilizados na ministração de genes repórteres ou terapêuticos. A imunização baseada em ADN de plasmídeo utiliza a maquinaria celular do paciente para gerar a proteína exógena, e estimula o sistema imunitário

do paciente para preparar uma resposta imunitária ao antígeno de proteína. Geralmente, os vetores de ADN de plasmídeo contêm elementos reguladores de transcrição eucarióticos que são elementos de promotores/intensificadores virais fortes para orientar níveis elevados de expressão de genes numa vasta gama de células hospedeiras e uma sequência de poliadenilação para assegurar uma terminação apropriada do ARNm expresso. Embora os elementos reguladores virais sejam vantajosos para a utilização nos vetores de ADN de plasmídeo, a utilização de vetores virais não modificados para expressar os genes relevantes pode originar problemas técnicos e de segurança que não ocorrem com ADN de plasmídeo.

Contudo, as concepções de ADN de plasmídeo atuais limitam a expressão de múltiplos genes a partir de uma estrutura principal do vetor numa única célula-alvo. Por conseguinte, para transferir e expressar múltiplos genes, é necessária a cotransfecção das células-alvo com plasmídeos separados. Quando as células têm de ser cotransfetadas com múltiplos plasmídeos, é difícil alcançar a expressão ideal de todos os genes codificados, especialmente quando o plasmídeo estiver a ser utilizado *in vivo*. As tentativas anteriores de superar estas limitações e expressar dois ou mais genes incluem a utilização de: vetores virais, múltiplas transcrições com splicing alternativo de ADN pró-viral, fusão de genes, vetores bicistrónicos que contêm sequências IRES (local de entrada de ribossoma interno) de vírus e plasmídeos de expressão dupla. Consulte Conry R.M. *et al.*, *Gene Therapy*. 3(1):67-74, (1996); Chen TT. *et al.*, *Journal of Immunology*. 153(10):4775-87, (1994); Ayyavoo V. *et al.*, *AIDS*. 14(1):1-9, (2000); Amara R.R. *et al.*, *Vaccine*. 20(15): 1949-55, (2002); Singh G, *et al.*, *Vaccine* 20: 1400-1411 (2002).

Nenhuma das concepções de plasmídeo existentes resolveu o problema do fornecimento de um plasmídeo de ADN adequado

para expressar mais de duas grelhas de leitura abertas independentes nas composições imunogénicas humanas. No caso dos vetores bicistrónicos, muitas vezes, apenas o primeiro gene transcrito a montante do IRES é expresso fortemente a partir de um plasmídeo ou um vetor retroviral. Consulte Sugimoto Y., *et al.*, *Hum. Gen. Ther.* 6: 905-915 (1995); Mizoguchi H, *et al.*, *Mol. Ther.* 1:376-382 (2000). Por outro lado, as cassetes de expressão dupla tiveram um desempenho melhor. Por exemplo, foi descoberto que a coministração de ADNc para antigénio carcinoembriónico (CEA) humano e B7-1 com um único plasmídeo contendo duas cassetes independentes resultou em respostas imunitárias bastante superiores, em comparação com os plasmídeos separados. Consulte Conry R.M. *et al.*, *Gene Therapy*. 3(1):67-74, (1996). Contudo, neste caso, as duas cassetes independentes envolvidas consistiam no promotor HCMV homólogo e em sequências de poliadenilação de hormona de crescimento bovino (BGH). A presença de sequências homólogas num plasmídeo torna esse plasmídeo inadequado para a utilização nas composições imunogénicas de ADN, uma vez que a presença de sequências homólogas na estrutura principal do plasmídeo aumenta a possibilidade de recombinação entre as sequências repetidas e resulta na instabilidade do vetor.

Outro constrangimento encontrado na conceção de um vetor de ADN de plasmídeo para a utilização numa composição imunogénica humana envolve o tamanho e a organização do plasmídeo. Uma vez que as unidades de transcrição são adicionadas a um plasmídeo, pode surgir interferência entre as unidades de transcrição, por exemplo na forma de impedimento estérico. O complexo de transcrição do ARN da célula tem de ser capaz de se ligar aos múltiplos locais num plasmídeo de unidade de politranscrição, desenrolar o ADN e transcrever eficazmente os genes. O simples aumento do plasmídeo não é necessariamente a melhor solução por diversas razões, incluindo a instabilidade do plasmídeo, a

dificuldade na produção do plasmídeo e, mais importante, as considerações de dosagem. Para conceber um vetor de unidade de transcrição múltipla de ADN de plasmídeo melhorado, é preciso considerar a colocação dos genes, o espaçamento e a direção de transcrição das grelhas de leitura abertas, o nível de expressão, a facilidade de produção, a segurança e a dose elementar do vetor necessária para imunizar o paciente.

Por conseguinte, continuam a ser necessárias conceções de vetores não virais de ADN de plasmídeo inovadoras para utilizar na expressão de múltiplas proteínas de agentes patogénicos complexos como o VIH, em que é necessária uma ampla resposta imunitária a várias proteínas. Além disso, são necessárias composições imunogénicas baseadas em ADN polivalente que possam orientar a expressão de níveis elevados de múltiplos genes de VIH numa única célula.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Numa forma de realização, a presente invenção fornece um plasmídeo de ADN que compreende: (a) uma primeira unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um primeiro polipéptido ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um primeiro promotor e um primeiro sinal de poliadenilação; (b) uma segunda unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um segundo polipéptido ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um segundo promotor e um segundo sinal de poliadenilação; (c) uma terceira unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um terceiro polipéptido ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um terceiro promotor e um terceiro sinal de poliadenilação; em que os referidos primeiro, segundo e terceiro promotores derivam de unidades de transcrição diferentes; e em que os referidos primeiro, segundo e terceiro sinais de poliadenilação derivam de

unidades de transcrição diferentes. Noutra forma de realização da invenção, o primeiro, segundo e terceiro polipéptidos são expressos numa célula eucariótica.

Noutra forma de realização, a presente invenção fornece uma composição imunogénica para induzir uma resposta imunitária aos antigénios selecionados num hospedeiro vertebrado, em que a composição imunogénica compreende: (a) um plasmídeo de ADN que compreende (i) uma primeira unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um primeiro polipéptido ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um primeiro promotor e um primeiro sinal de poliadenilação; (ii) uma segunda unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um segundo polipéptido ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um segundo promotor e um segundo sinal de poliadenilação; (iii) uma terceira unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um terceiro polipéptido ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um terceiro promotor e um terceiro sinal de poliadenilação; em que o primeiro, segundo e terceiro promotores derivam de unidades de transcrição diferentes; e em que os referidos primeiro, segundo e terceiro sinais de poliadenilação derivam de unidades de transcrição diferentes; e (b), pelo menos, um entre um agente facilitador de transfeção, portador, adjuvante ou diluente farmacêuticamente aceitável. Numa forma de realização particular da invenção, o agente facilitador de transfeção é bupivacaína. Noutra forma de realização da invenção, o primeiro, segundo e terceiro polipéptidos são expressos numa célula eucariótica.

Em determinadas formas de realização da invenção, a composição imunogénica é administrada num mamífero utilizando a eletroporação *in vivo*. Numa forma de realização particular, a eletroporação implica a

estimulação elétrica do músculo com uma corrente elétrica contendo uma intensidade de campo que varia entre cerca de 25 V/cm e cerca de 800 V/cm.

Ainda noutra forma de realização, a presente invenção fornece um método de imunização de um hospedeiro vertebrado contra os antigénios selecionados compreendendo a administração no hospedeiro vertebrado de uma composição imunogénica que compreende: (a) um plasmídeo de ADN que compreende (i) uma primeira unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um primeiro polipéptido ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um primeiro promotor e um primeiro sinal de poliadenilação; (ii) uma segunda unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um segundo polipéptido ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um segundo promotor e um segundo sinal de poliadenilação; (iii) uma terceira unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um terceiro polipéptido ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um terceiro promotor e um terceiro sinal de poliadenilação; em que os referidos primeiro, segundo e terceiro promotores derivam de unidades de transcrição diferentes; e em que o primeiro, segundo e terceiro sinais de poliadenilação derivam de unidades de transcrição diferentes; e (b), pelo menos, um entre um agente facilitador de transfeção, portador, adjuvante ou diluente farmacêuticamente aceitável. Noutra forma de realização da invenção, o primeiro, segundo e terceiro polipéptidos são expressos numa célula eucariótica.

Noutra forma de realização da invenção, os antigénios selecionados derivam do grupo que consiste numa bactéria, num vírus, num alergénio e num tumor. Numa forma de realização particular, os antigénios selecionados são antigénios virais derivados de um vírus selecionado a

partir do grupo que consiste no Vírus da imunodeficiência humana, Vírus da imunodeficiência simiana, Vírus sincicial respiratório, Vírus da parainfluenza tipo 1, Vírus da parainfluenza tipo 2, Vírus da parainfluenza tipo 3, Vírus da influenza, Vírus herpes simplex, Citomegalovírus humano, Vírus da hepatite A, Vírus da hepatite B, Vírus da hepatite C, Vírus do papiloma humano, Poliovírus, rotavírus e coronavírus (SARS).

Ainda noutra forma de realização da invenção, os antigénios seleccionados são antigénios bacterianos derivados de uma bactéria seleccionada a partir do grupo que consiste em *Haemophilus influenzae* (tipável e não tipável), *Haemophilus somnus*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Bordetella pertussis*, *Alloiococcus otiditis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare complex*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium tetani*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Mycoplasma gallisepticum*.

Numa forma de realização da invenção, o hospedeiro vertebrado é seleccionado a partir do grupo que consiste em mamíferos, aves e peixes. Numa determinada forma de realização da invenção, o hospedeiro vertebrado é um mamífero seleccionado a partir do grupo que consiste nas espécies humana, bovina, ovina, porcina, equina, canina e felina.

Numa forma de realização da invenção, o primeiro,

segundo e terceiro promotores são ativos nas células eucarióticas. Noutras formas de realização da invenção, o primeiro, segundo e terceiro promotores são selecionados a partir do grupo que consiste no promotor do gene *immediate early* do citomegalovírus humano (HCMV), promotor do citomegalovírus símio (SCMV), promotor do citomegalovírus murino (MCMV), promotor associado a latência (LAP1) do vírus herpes simplex (HSV), promotor do vírus símio 40, promotor do fator de alongamento 1 alfa humano e no promotor da desmina específica das células musculares humanas.

Em determinadas formas de realização da invenção, o primeiro, segundo e terceiro sinais de poliadenilação são selecionados a partir do grupo que consiste no sinal de poli(A) da beta-globina de coelho, na poliA sintética, poli A da timidina quinase do HSV, poli A da alfa-globina humana, poli A do SV40, poli A da beta-globina humana, poli A do poliomavírus e poli A da hormona de crescimento bovino.

Numa forma de realização particular da invenção, a primeira unidade de transcrição expressa uma proteína de fusão gag-pol a partir de uma fusão dos genes gag e pol de VIH. Numa forma de realização da invenção, a fusão dos genes gag e pol de VIH ou gene *gag-pol* deriva do isolado HXB2 de VIH.

Numa determinada forma de realização da invenção, a segunda unidade de transcrição expressa uma proteína envelope a partir do gene envelope de VIH. Numa forma de realização particular da invenção, o gene envelope deriva de um isolado primário 6101 de VIH.

Numa forma de realização específica da invenção, a terceira unidade de transcrição expressa uma proteína de fusão nef, tat e vif (NTV) a partir de uma fusão dos genes *nef*, *tat* e *vif* (ntv) de VIH. Numa forma de realização particular da invenção, a fusão dos genes *nef*, *tat* e *vif* de

VIH ou gene *ntv* deriva do isolado NL4-3 de VIH.

Numa forma de realização específica da invenção, num plasmídeo com três unidades de transcrição, a direção de transcrição para a primeira unidade de transcrição é na direção oposta da direção de transcrição da segunda unidade de transcrição. Noutra forma de realização da invenção, a direção de transcrição para a primeira unidade de transcrição é na direção oposta da direção de transcrição da terceira unidade de transcrição.

Numa determinada forma de realização da invenção, a invenção fornece um plasmídeo com três unidades de transcrição, que compreende ainda uma sequência de nucleótidos que codifica um marcador selecionável ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação. Numa forma de realização, o marcador selecionável é selecionado a partir do grupo que consiste no gene de resistência à canamicina, gene de resistência à ampicilina, gene de resistência à tetraciclina, gene de resistência à higromicina e gene de resistência ao cloranfenicol. Noutra forma de realização, a localização do marcador selecionável é selecionada a partir do grupo que consiste na região de separador 1, região de separador 2 e região de separador 3. Numa forma de realização específica, a localização do marcador selecionável é a região de separador 2.

Noutra forma de realização da invenção, a invenção fornece um plasmídeo com três unidades de transcrição, que compreende ainda uma origem bacteriana de replicação. Noutra forma de realização, a localização da origem de replicação é selecionada a partir do grupo que consiste na região de separador 1, região de separador 2 e região de separador 3. Numa forma de realização específica, a localização do marcador selecionável é a região de separador 3. Numa forma de realização particular, a origem de replicação é a origem pUC de replicação.

Numa forma de realização da invenção, a invenção fornece um plasmídeo com três unidades de transcrição, em que o plasmídeo tem menos de cerca 15 pares de quilobase no tamanho total. Noutra forma de realização da invenção, a região de separador 1 tem menos de cerca de 400 pares de bases, a região de separador 2 tem menos de 1100 pares de bases e a região de separador 3 tem menos de cerca de 1100 pares de bases.

Numa forma de realização, a invenção fornece uma composição imunogénica para induzir uma resposta imunitária ao vírus da imunodeficiência humana (VIH) num hospedeiro vertebrado, em que a referida composição imunogénica compreende: (a) um primeiro plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão gag-pol de VIH, em que a referida unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (b) um segundo plasmídeo de ADN que compreende (i) uma primeira unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão nef-tat-vif de VIH ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um primeiro promotor e um primeiro sinal de poliadenilação; (ii) uma segunda unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido envelope de VIH ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um segundo promotor e um segundo sinal de poliadenilação; em que os referidos primeiro e segundo promotores derivam de unidades de transcrição diferentes; em que os referidos primeiro e segundo sinais de poliadenilação derivam de unidades de transcrição diferentes; em que a direção de transcrição para a referida primeira unidade de transcrição é na direção oposta da direção de transcrição da referida segunda unidade de transcrição; ou em que a direção de

transcrição para a referida primeira unidade de transcrição é na mesma direção da direção de transcrição da referida segunda unidade de transcrição, e as referidas primeira e segunda unidades de transcrição são separadas por uma região de separador de, pelo menos, uma quilobase de pares; e (c), pelo menos, um entre um agente facilitador de transfeção, veículo ou diluente farmacologicamente aceitável. Numa forma de realização particular da invenção, o agente facilitador de transfeção é bupivacaína. Numa forma de realização particular, o promotor no primeiro plasmídeo é o promotor do gene *immediate early* do citomegalovírus humano (HCMV), o sinal de poliadenilação no primeiro plasmídeo é o sinal de poliadenilação poli A da hormona de crescimento bovino e o primeiro plasmídeo de ADN codifica um polipéptido de fusão gag-pol de VIH, em que a fusão dos genes gag e pol de VIH ou gene gag-pol deriva do isolado HXB2 de VIH. Numa determinada forma de realização, o primeiro promotor no segundo plasmídeo é o promotor do gene *immediate early* do citomegalovírus humano (HCMV) e o primeiro sinal de poliadenilação no segundo plasmídeo é o sinal de poliadenilação poli A do SV40, e o polipéptido é uma proteína de fusão nef, tat e vif (NTV) expressa a partir de uma fusão dos genes nef, tat e vif (ntv) derivados do isolado NL4-3 de VIH. Numa forma de realização particular, o segundo promotor no segundo plasmídeo é o promotor do citomegalovírus símio (SCMV), o segundo sinal de poliadenilação no segundo plasmídeo é o sinal de poliadenilação da hormona de crescimento bovino (BGH), em que o polipéptido envelope codificado deriva do isolado primário 6101 de VIH.

Ainda noutra forma de realização, a invenção fornece um método de imunização de um hospedeiro vertebrado contra antigénios selecionados compreendendo a administração no referido hospedeiro vertebrado de uma composição imunogénica que compreende: (a) um primeiro plasmídeo de

ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão gag-pol de VIH, em que a referida unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (b) um segundo plasmídeo de ADN que compreende (i) uma primeira unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão nef-tat-vif de VIH ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um primeiro promotor e um primeiro sinal de poliadenilação; (ii) uma segunda unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido envelope de VIH ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um segundo promotor e um segundo sinal de poliadenilação; em que os referidos primeiro e segundo promotores derivam de unidades de transcrição diferentes; em que os referidos primeiro e segundo sinais de poliadenilação derivam de unidades de transcrição diferentes; em que a direção de transcrição para a referida primeira unidade de transcrição é na direção oposta da direção de transcrição da referida segunda unidade de transcrição; ou em que a direção de transcrição para a referida primeira unidade de transcrição é na mesma direção da direção de transcrição da referida segunda unidade de transcrição, e as referidas primeira e segunda unidades de transcrição são separadas por uma região de separador de, pelo menos, uma quilobase de pares; e (c), pelo menos, um entre um agente facilitador de transfeção, veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável. Numa forma de realização particular da invenção, o agente facilitador de transfeção é bupivacaína. Numa forma de realização particular, o promotor no primeiro plasmídeo é o promotor do gene *immediate early* do citomegalovírus humano (HCMV), o sinal de poliadenilação no primeiro plasmídeo é o sinal de poliadenilação poli A da

hormona de crescimento bovino e o primeiro plasmídeo de ADN codifica um polipéptido de fusão gag-pol de VIH, em que a fusão dos genes gag e pol de VIH ou gene gag-pol deriva do isolado HXB2 de VIH. Numa determinada forma de realização, o primeiro promotor no segundo plasmídeo é o promotor do gene *immediate early* citomegalovírus humano (HCMV) e o primeiro sinal de poliadenilação no segundo plasmídeo é o sinal de poliadenilação poli A do SV40, e o polipéptido é uma proteína de fusão nef, tat e vif (NTV) expressa a partir de uma fusão dos genes nef, tat e vif (ntv) derivados do isolado NL4-3 de VIH. Numa forma de realização particular, o segundo promotor no segundo plasmídeo é o promotor do citomegalovírus símio (SCMV), o segundo sinal de poliadenilação no segundo plasmídeo é o sinal de poliadenilação da hormona de crescimento bovino (BGH), em que o polipéptido envelope codificado deriva do isolado primário 6101 de VIH. Numa forma de realização, a composição imunogénica é administrada num mamífero utilizando a eletroporação *in vivo*. Numa forma de realização particular, a eletroporação implica a estimulação elétrica do músculo com uma corrente elétrica contendo uma intensidade de campo que varia entre cerca de 25 V/cm e cerca de 800 V/cm. Numa forma de realização, o agente facilitador de transfeção é bupivacaína.

Numa forma de realização, a invenção fornece uma composição imunogénica para induzir uma resposta imunitária ao vírus da imunodeficiência humana (VIH) num hospedeiro vertebrado, em que a composição imunogénica compreende: (a) um primeiro plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido gag de VIH, em que a referida unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (b) um segundo plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que

compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido pol de VIH, em que a referida unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (c) um terceiro plasmídeo de ADN que compreende (i) uma primeira unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão nef-tat-vif de VIH ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um primeiro promotor e um primeiro sinal de poliadenilação; (ii) uma segunda unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido envelope de VIH ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um segundo promotor e um segundo sinal de poliadenilação; em que os referidos primeiro e segundo promotores derivam de unidades de transcrição diferentes; em que os referidos primeiro e segundo sinais de poliadenilação derivam de unidades de transcrição diferentes; em que a direção de transcrição para a referida primeira unidade de transcrição está na direção oposta da direção de transcrição da referida segunda unidade de transcrição; ou em que a direção de transcrição para a referida primeira unidade de transcrição está na mesma direção da direção de transcrição da referida segunda unidade de transcrição e as referidas primeira e segunda unidades de transcrição são separadas por uma região de separador de, pelo menos, uma quilobase de pares; e (d) um quarto plasmídeo de ADN que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido adjuvante, em que a referida sequência de nucleótidos é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; e (e), pelo menos, um entre um agente facilitador de transfeção, portador ou diluente farmacêuticamente aceitável.

Noutra forma de realização, a invenção fornece um método de imunização de um hospedeiro vertebrado contra

antígenos selecionados compreendendo a administração no referido hospedeiro vertebrado de uma composição imunogénica que compreende: (a) um primeiro plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido gag de VIH, em que a referida unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (b) um segundo plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido pol de VIH, em que a referida unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (c) um terceiro plasmídeo de ADN que compreende (i) uma primeira unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão nef-tat-vif de VIH ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um primeiro promotor e um primeiro sinal de poliadenilação; (ii) uma segunda unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido envelope de VIH ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um segundo promotor e um segundo sinal de poliadenilação; em que os referidos primeiro e segundo promotores derivam de unidades de transcrição diferentes; em que os referidos primeiro e segundo sinais de poliadenilação derivam de unidades de transcrição diferentes; em que a direção de transcrição para a referida primeira unidade de transcrição está na direção oposta da direção de transcrição da referida segunda unidade de transcrição; ou em que a direção de transcrição para a referida primeira unidade de transcrição está na mesma direção da direção de transcrição da referida segunda unidade de transcrição, e as referidas primeira e segunda unidades de transcrição são separadas por uma

região de separador de, pelo menos, uma quilobase de pares; e (d) um quarto plasmídeo de ADN que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido adjuvante, em que a referida sequência de nucleótidos é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; e (e), pelo menos, um entre um agente facilitador de transfeção, portador ou diluente farmacêuticamente aceitável. Numa forma de realização particular, a eletroporação implica a estimulação elétrica do músculo com uma corrente elétrica contendo uma intensidade de campo que varia entre cerca de 25 V/cm e cerca de 800 V/cm. Numa forma de realização, o agente facilitador de transfeção é bupivacaína.

Numa forma de realização, a presente invenção fornece uma composição imunogénica para induzir uma resposta imunitária ao VIH num hospedeiro vertebrado, em que a composição imunogénica compreende: a) um primeiro plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido envelope de VIH, em que a unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (b) um segundo plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão gag-pol de VIH, em que a unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (c) um terceiro plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão nef-tat-vif de VIH, em que a unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (d) um quarto plasmídeo de ADN que compreende uma sequência de

nucleótidos que codifica um polipéptido adjuvante, em que a sequência de nucleótidos é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; e (e), pelo menos, um entre um agente facilitador de transfeção, portador ou diluente farmacologicamente aceitável. Numa forma de realização particular, o agente facilitador de transfeção é bupivacaína. Noutra forma de realização, a composição imunogénica que contém bupivacaína é administrada em conjunto com a eletroporação. Numa forma de realização específica, os polipéptidos adjuvantes, nef-tat-vif, gag-pol e envelope de VIH são expressos numa célula eucariótica. Numa forma de realização, o primeiro, segundo, terceiro e quarto plasmídeos contêm promotores que são ativos nas células eucarióticas.

Numa forma de realização, a presente invenção fornece um método de imunização de um hospedeiro vertebrado contra antigénios selecionados compreendendo a administração no hospedeiro vertebrado de uma composição imunogénica, em que a composição imunogénica compreende: a) um primeiro plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido envelope de VIH, em que a unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (b) um segundo plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão gag-pol de VIH, em que a unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (c) um terceiro plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão nef-tat-vif de VIH, em que a unidade de transcrição única é ligada

de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (d) um quarto plasmídeo de ADN que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido adjuvante, em que a sequência de nucleótidos é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; e (e), pelo menos, um entre um agente facilitador de transfeção, portador ou diluente farmacologicamente aceitável. Numa forma de realização particular, o agente facilitador de transfeção é bupivacaína. Noutra forma de realização, a composição imunogénica que contém bupivacaína é administrada em conjunto com a eletroporação. Numa forma de realização específica, os polipéptidos adjuvantes, nef-tat-vif, gag-pol e envelope de VIH são expressos numa célula eucariótica. Numa forma de realização, o primeiro, segundo, terceiro e quarto plasmídeos contêm promotores que são ativos nas células eucarióticas.

Em determinadas formas de realização da invenção, o primeiro, segundo, terceiro e quarto plasmídeos contêm promotores selecionados a partir do grupo que consiste no promotor do citomegalovírus humano (HCMV) precoce imediato, promotor do citomegalovírus símio (SCMV), promotor do citomegalovírus murino (MCMV), promotor associado a latência 1 (LAP1) do vírus herpes simplex (HSV), promotor do vírus símio 40, promotor do fator de alongamento 1 alfa humano e no promotor da desmina específica das células musculares humanas. Em determinadas formas de realização da invenção, o primeiro, segundo, terceiro e quarto plasmídeos contêm sinais de poliadenilação selecionados a partir do grupo que consiste no sinal de poli(A) da beta-globina de coelho, na poliA sintética, poli A da timidina quinase do HSV, poli A da alfa-globina humana, poli A do SV40, poli A da beta-globina humana, poli A do poliomavírus e na poli A da hormona de crescimento bovino.

Numa forma de realização particular, a presente invenção fornece uma composição imunogénica para induzir uma resposta imunitária ao VIH num hospedeiro vertebrado, em que a composição imunogénica compreende quatro plasmídeos conforme descrito acima, e em que cada plasmídeo compreende ainda um marcador selecionável selecionado a partir do grupo que consiste no gene de resistência à canamicina, gene de resistência à ampicilina, gene de resistência à tetraciclina, gene de resistência à higromicina e gene de resistência ao cloranfenicol. Noutra forma de realização, cada plasmídeo compreende ainda uma origem bacteriana de replicação. Ainda noutra forma de realização, a origem de replicação é a origem pUC de replicação.

A invenção fornece igualmente uma composição imunogénica, em que o quarto plasmídeo de ADN compreende uma unidade de transcrição primária e uma unidade de transcrição secundária compreendendo duas sequências de nucleótidos que codificam dois polipéptidos adjuvantes ligados de modo funcional a elementos reguladores. Numa forma de realização, a unidade de transcrição primária compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido p35 IL-12 ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação. Noutra forma de realização, a unidade de transcrição secundária compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido p40 IL-12 ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação.

Noutra forma de realização, a presente invenção fornece uma composição imunogénica para induzir uma resposta imunitária ao VIH num hospedeiro vertebrado, em que a composição imunogénica compreende: a) um primeiro plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que

codifica um polipéptido envelope de VIH, em que a unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (b) um segundo plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido gag de VIH, em que a unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (c) um terceiro plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido pol de VIH, em que a unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (d) um quarto plasmídeo de ADN que compreende uma única unidade de transcrição que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão nef-tat-vif de VIH, em que a unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (e) um quinto plasmídeo de ADN que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido adjuvante, em que a referida sequência de nucleótidos é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; e (f), pelo menos, um entre um agente facilitador de transfeção, portador ou diluente farmacêuticamente aceitável. Numa forma de realização específica, o agente facilitador de transfeção é bupivacaína. Noutra forma de realização, a composição imunogénica que contém bupivacaína é administrada em conjunto com a eletroporação. Numa forma de realização, os polipéptidos adjuvantes, nef-tat-vif, pol, gag e envelope de VIH são expressos numa célula eucariótica.

Noutra forma de realização, a presente invenção fornece um método de imunização de um hospedeiro vertebrado

contra antígenos selecionados compreendendo a administração no referido hospedeiro vertebrado de uma composição imunogénica, em que a composição imunogénica compreende: a) um primeiro plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido envelope de VIH, em que a unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (b) um segundo plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido gag de VIH, em que a unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (c) um terceiro plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido pol de VIH, em que a unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (d) um quarto plasmídeo de ADN que compreende uma unidade de transcrição única que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão nef-tat-vif de VIH, em que a referida unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; (e) um quinto plasmídeo de ADN que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido adjuvante, em que a referida sequência de nucleótidos é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação; e (f), pelo menos, um entre um agente facilitador de transfeção, portador ou diluente farmacêuticamente aceitável. Numa forma de realização específica, o agente facilitador de transfeção é bupivacaína. Noutra forma de realização, a composição

imunogénica que contém bupivacaína é administrada em conjunto com a eletroporação.

Numa forma de realização da invenção, o primeiro, segundo, terceiro, quarto e quinto plasmídeos contêm promotores que são ativos nas células eucarióticas. Em determinadas formas de realização, o primeiro, segundo, terceiro, quarto e quinto plasmídeos contêm promotores selecionados a partir do grupo que consiste no promotor do citomegalovírus humano (HCMV) precoce imediato, promotor do citomegalovírus símio (SCMV), promotor do citomegalovírus murino (MCMV), promotor associado a latência (LAP1) do vírus herpes simplex (HSV), promotor do vírus símio 40, promotor do fator de alongamento 1 alfa humano e no promotor da desmina específica das células musculares humanas. Noutras formas de realização da invenção, o primeiro, segundo, terceiro e quarto plasmídeos contêm sinais de poliadenilação selecionados a partir do grupo que consiste no sinal de poli(A) da beta-globina de coelho, na poliA sintética, poli A da timidina quinase do HSV, poli A da alfa-globina humana, poli A do SV40, poli A da beta-globina humana, poli A do poliomavírus e na poli A da hormona de crescimento bovino.

Numa forma de realização particular, a presente invenção fornece uma composição imunogénica para induzir uma resposta imunitária ao VIH num hospedeiro vertebrado, em que a composição imunogénica compreende cinco plasmídeos conforme descrito acima, e em que cada plasmídeo compreende ainda um marcador selecionável selecionado a partir do grupo que consiste no gene de resistência à canamicina, gene de resistência à ampicilina, gene de resistência à tetraciclina, gene de resistência à higromicina e gene de resistência ao cloranfenicol. Noutra forma de realização, cada plasmídeo compreende ainda uma origem bacteriana de replicação, em que a origem de replicação é a origem pUC de replicação.

A invenção fornece igualmente uma composição imunogénica, em que o quinto plasmídeo de ADN compreende uma unidade de transcrição primária e uma unidade de transcrição secundária compreendendo duas sequências de nucleótidos que codificam dois polipéptidos adjuvantes ligados de modo funcional a elementos reguladores. Numa forma de realização, a unidade de transcrição primária compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido p35 IL-12 ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação. Noutra forma de realização, a unidade de transcrição secundária compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido p40 IL-12 ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação.

Outros aspetos e formas de realização da presente invenção são divulgados na seguinte descrição detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 ilustra um diagrama esquemático circular de um plasmídeo de ADN com unidade de transcrição tripla ilustrativo organizado para expressar seis genes de VIH ou uma construção de genes nas células eucarióticas de três grelhas de leitura abertas separadas. A Figura 1 ilustra um diagrama esquemático linear, mas mais detalhado, do mesmo plasmídeo. São utilizadas as seguintes abreviaturas: SCMV: promotor do citomegalovírus símio, HCMV: promotor do citomegalovírus humano, poliA da BGH - sinal de poliadenilação da hormona de crescimento bovino, kan: gene marcador de canamicina para resistência, HSVIap1: promotor associado a latência 1 do vírus herpes simplex, poliA do SV40: sinal de poliadenilação do vírus símio 40, SV40sd/sa: aceitador e dador de splice do vírus símio 40, gag-pol: fusão gag-pol de VIH, ntv: fusão nef-tat-vif de VIH, env: envelope de VIH.

A Figura 2 ilustra a expressão de gag de VIH nas

células 293. As células 293 foram transfectadas com 2 µg do vetor de expressão de ADN de plasmídeo indicado. Quarenta e oito horas após a transfeção, as proteínas de VIH associadas às células foram visualizadas através de *Western blot*. Os promotores e as grelhas de leitura abertas para um plasmídeo específico são ilustrados abaixo:

Plasmídeos Transfetados

102: HCMV-gag
 201: HCMV-pol, SCMV-gag
 203: HCMV-gag/pot/nef/tat/vif, SCMV-env
 302: SCMV-gag/pol, HCMV-, Lap1-nef/tat/vif
 204: HCMV-gag/pol, SCMV-env
 303: SCMV-gag/pol, HCMV-env, Lap1-nef/tat/vif
 001: plasmídeo de controlo sem inserção

A Figura 3 ilustra a expressão de pol de VIH nas células 293. As células 293 foram transfectadas com 2 µg do vetor de expressão de ADN de plasmídeo indicado. Quarenta e oito horas após as transfeções, as proteínas de VIH associadas às células foram visualizadas através de *Western blot*. Os promotores e as grelhas de leitura abertas para um plasmídeo específico são ilustrados abaixo:

Plasmídeos Transfetados

103: HCMV-pol
 201: HCMV-pol, SCMV-gag
 302: SCMV-gag/pol, HCMV-, Lap1-nef/taf/vif
 203: HCMV-gag/pol/nef/tat/vif, SCMV-env
 204: HCMV-gag/pol, SCMV-env
 303: SCMV-gag/pol, HCMV-env, Lap1-nef/tat/vif
 001: plasmídeo de controlo sem inserção

A Figura 4 ilustra a expressão de nef/tat/vif (ntv) de VIH nas células 293. As células 293 foram transfectadas com

2 µg do vetor de expressão de ADN de plasmídeo indicado. Quarenta e oito horas após as transfeções, as proteínas de VIH associadas às células foram visualizadas através de *Western blot*. Os promotores e as grelhas de leitura abertas para um plasmídeo específico são ilustrados abaixo:

Plasmídeos Transfetados

104: HCMV-ntv
 105: Lap1-ntv
 202: HCMV-ntv, SCMV-env
 203: HCMV-gag/pol/nef/tat/vif, SCMV-env
 302: SCMV-gag/pol, HCMV-, Lap1-nef/tat/vif
 303: SCMV-gag/pol, HCMV-env, Lap1-nef/tat/vif
 001: plasmídeo de controlo sem inserção

A Figura 5 ilustra a expressão de env de VIH nas células 293. As células 293 foram transfetadas com 2 µg do vetor de expressão de ADN de plasmídeo indicado. Quarenta e oito horas após as transfeções, as proteínas de VIH associadas às células foram visualizadas através de *Western blot*. Os promotores e as grelhas de leitura abertas para um plasmídeo específico são ilustrados abaixo:

Plasmídeos Transfetados

101: HCMV-env
 202: HCMV-ntv, SCMV-env
 203: HCMV-gag/pol/nef/tat/vif, SCMV-env
 204: HCMV-gag/pol, SCMV-env
 303: SCMV-gag/pol, HCMV-env, Lap1-nef/tat/vif
 001: plasmídeo de controlo sem inserção

A Figura 6 ilustra a expressão de gag de VIH nas células 293. As células 293 foram transfetadas com 1 µg da combinação de ADN de plasmídeo indicada. Quarenta e oito horas após as transfeções, as proteínas de VIH associadas

às células foram visualizadas através de *Western blot*. Os promotores e as grelhas de leitura abertas para um plasmídeo específico são ilustrados abaixo:

Fila	Combinações de Plasmídeos Transfetadas
1	301 (gag/pol) + 101 (env) + 104(ntv)
2	201 (gag, pol) + 202 (env, ntv)
3	203 (gag/pol/ntv, env)
4	303 (gag/pol, env, ntv)
5	101 (env) + 102(gag) + 103(pol) + 104(ntv)
6	001 (controlo)

A Figura 7 ilustra a expressão de env de VIH nas células 293. As células 293 foram transfetadas com 1 µg da combinação de ADN de plasmídeo indicada. Quarenta e oito horas após as transfeções, as proteínas de VIH associadas às células foram visualizadas através de *Western blot*. Os promotores e as grelhas de leitura abertas para um plasmídeo específico são ilustrados abaixo:

Fila	Combinações de Plasmídeos Transfetadas
1	152 (gag/pol) + 101 (env) + 104(ntv)
2	201 (gag, pol) + 202(env, ntv)
3	203 (gag/pol/ntv, env)
4	303 (gag/pol, env, env)
5	101 (env) + 102(gag) + 103(pol) + 104(ntv)
6	001 (controlo)

A Figura 8 ilustra a expressão de ntv de VIH nas células 293. As células 293 foram transfetadas com 1 µg da combinação de ADN de plasmídeo indicada. Quarenta e oito horas após as transfeções, as proteínas de VIH associadas às células foram visualizadas através de *Western blot*. Os promotores e as grelhas de leitura abertas para um plasmídeo específico são ilustrados abaixo:

Fila	Combinações de Plasmídeos Transfetadas
1	152 (gag/pol) + 101 (env) + 104(ntv)
2	201 (gag,pol) + 202(env, ntv)
3	203 (gag/pol/ntv, env)
4	303 (gag/pol, env, env)
5	101 (env) + 102(gag) + 103(pol) + 104(ntv)
6	001 (controlo)

A Figura 9 ilustra a expressão de pol de VIH nas células 293. As células 293 foram transfetadas com a combinação e concentração de ADN de plasmídeo indicadas. Quarenta e oito horas após as transfeções, as proteínas de VIH associadas às células foram visualizadas através de *Western blot*. Os promotores e as grelhas de leitura abertas para um plasmídeo específico são ilustrados abaixo:

Fila	Combinações de Plasmídeos Transfetadas	Concentração de plasmídeos Transfetada (microgramas)
1	001 (controlo)	2
2	201 (gag, pol) + 202(ntv, env)	1+1
3	204 (gag/pol, env) + 104(ntv)	1+1
4	203 (gag/pol/ntv, env)	2
5	302 (gag/pol, ntv) + 101 (env)	1+1
6	303 (gag/pol, env, ntv)	2

A Figura 10 ilustra a expressão de gag de VIH nas células 293. As células 293 foram transfetadas com a combinação e concentração de ADN de plasmídeo indicadas. Quarenta e oito horas após as transfeções, as proteínas de VIH associadas às células foram visualizadas através de *Western blot*. Os promotores e as grelhas de leitura abertas para um plasmídeo específico são ilustrados abaixo:

Fila	Combinações de Plasmídeos	Concentração de plasmídeos
	Transfetadas	Transfetada (microgramas)
1	001 (controlo)	2
2	201 (gag, pol) + 202(ntv, env)	1+1
3	204 (gag/pol, env) + 104(ntv)	1+1
4	203 (gag/pol/ntv, env)	2
5	302 (gag/pol, ntv) + 101 (env)	1+1
6	303 (gag/pol, env, ntv)	2

A Figura 11 ilustra a expressão de env de VIH nas células 293. As células 293 foram transfetadas com a combinação e concentração de ADN de plasmídeo indicadas. Quarenta e oito horas após as transfeções, as proteínas de VIH associadas às células foram visualizadas através de *Western blot*. Os promotores e as grelhas de leitura abertas para um plasmídeo específico são ilustrados abaixo:

Fila	Combinações de Plasmídeos	Concentração de plasmídeos
	Transfetadas	Transfetada (microgramas)
1	001 (controlo)	2
2	201 (gag, pol) + 202(ntv, env)	1+1
3	204 (gag/pol, env) + 104(ntv)	1+1
4	203 (gag/pol/ntv, env)	2
5	302 (gag/pol, ntv) + 101 (env)	1+1
6	303 (gag/pol, env, ntv)	2

A Figura 12 ilustra a expressão de ntv de VIH nas células 293. As células 293 foram transfetadas com a combinação e concentração de ADN de plasmídeo indicadas. Quarenta e oito horas após as transfeções, as proteínas de VIH associadas às células foram visualizadas através de *Western blot*. Os promotores e as grelhas de leitura abertas para um plasmídeo específico são ilustrados abaixo:

Fila	Combinações de Plasmídeos	Concentração de plasmídeos
	Transfetadas	Transfetada (microgramas)
1	001 (controle)	2
2	201 (gag, pol) + 202(ntv, env)	1+1
3	204 (gag/pol, env) + 104(ntv)	1+1
4	203 (gag/pol/ntv, env)	2
5	302 (gag/pol, ntv) + 101 (env)	1+1
6	303 (gag/pol, env, ntv)	2

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

As composições imunogénicas baseadas em ADN fornecem uma alternativa às composições imunogénicas tradicionais que compreendem a administração de antígenos de proteína e de um adjuvante. Em vez disso, as composições imunogénicas baseadas em ADN envolvem a introdução de ADN, o que codifica o antígeno, ou antígenos, nos tecidos de um paciente, em que os antígenos são expressos através das células do tecido do paciente. Conforme aqui utilizado, essas composições imunogénicas são designadas por “composições imunogénicas baseadas em ADN” ou “composições imunogénicas baseadas em ácido nucleico”. Um problema é o facto de, quando são necessários múltiplos genes para a geração de uma resposta imunitária protetora, terem de ser utilizados múltiplos plasmídeos para expressar individualmente os genes. Isto impõe responsabilidades de produção e regulação. As formas de realização da presente invenção fornecem soluções para este problema com uma conceção de plasmídeo capaz de expressar três grelhas de leitura abertas independentes na mesma célula. Em determinadas formas de realização da invenção, os genes fundem-se para produzir poliproteínas e, deste modo, podem ser expressas muitas mais proteínas a partir de um único plasmídeo. Numa forma de realização, são expressas seis proteínas a partir do plasmídeo único.

Diversos fatores podem influenciar a expressão de

genes de antígeno e/ou a imunogenicidade das composições imunogênicas baseadas em ADN. Os exemplos desses fatores incluem a construção do vetor de plasmídeo, o tamanho do vetor de plasmídeo, a escolha do promotor utilizado para ativar a expressão de genes de antígeno, o número e o tamanho das unidades de transcrição no plasmídeo, a estabilidade das transcrições de ARN, a orientação das unidades de transcrição no plasmídeo, a reprodutibilidade de imunização e a estabilidade do gene inserido no plasmídeo. As formas de realização da presente invenção fornecem concepções de plasmídeo que otimizam muitos destes parâmetros essenciais.

A concepção e a otimização de vetores de ADN de plasmídeo com múltiplas unidades de transcrição são cruciais. Para melhorar a dose efetiva de antígeno recebida por um paciente imunizado, o tamanho do plasmídeo tem de ser minimizado, enquanto o número de produtos de proteína e a quantidade de proteína produzida devem ser maximizados. Para equilibrar estas considerações, é preciso considerar a colocação dos genes; o espaçamento das unidades de transcrição; a direção de transcrição das grelhas de leitura abertas; os níveis de expressão; o tamanho do promotor, a orientação e a força; o tamanho do intensificador, a colocação, a orientação e a força; a organização e o tamanho da grelha de leitura aberta; a facilidade de produção; a estabilidade do plasmídeo; a segurança; e a dose elementar do vetor necessária para imunizar o paciente.

Uma consideração importante com a utilização de plasmídeos de ADN para a imunização é a produção do plasmídeo. Devido a potenciais preocupações de segurança, o processo de produção e os produtos finais têm de passar por uma análise intensa e ser submetidos a um profundo controle de qualidade. O resultado reflete-se nos elevados custos destes procedimentos. Por consequência, qualquer imunização

de ADN que necessite de múltiplos plasmídeos será proporcionalmente mais dispendiosa e menos provável de ser eficaz. Por conseguinte, em determinadas formas de realização da presente invenção, quando os custos de produção necessitam de ser controlados, são fornecidas composições imunogénicas com um único plasmídeo por aplicação adequadas para induzir respostas imunitárias praticamente em qualquer processo de doença.

Em algumas situações, apesar dos custos de produção mais elevados, a utilização de combinações de plasmídeos, cada um contendo uma única unidade de transcrição ou duas unidades de transcrição, pode originar uma composição imunogénica mais eficaz. Nesses casos, é importante conceber a composição imunogénica de modo a ter o número ideal de plasmídeos que codificam todos os genes necessários para induzir uma resposta imunitária eficaz. A utilização de um plasmídeo com três unidades de transcrição que expressam todos os genes necessários em vez de múltiplos plasmídeos, cada um com uma unidade de transcrição única, tem de ser equilibrada com a imunogenicidade de determinados antigénios. Uma vantagem da combinação da abordagem de plasmídeos com unidade de transcrição única é o facto de cada um dos genes individuais poder ser ativado pelo mesmo promotor forte. Por exemplo, o promotor HCMV pode ser utilizado em cada plasmídeo, em vez de apenas uma vez por plasmídeo, tal como acontece num plasmídeo com três unidades de transcrição. Em contraste, ao utilizar um plasmídeo com três unidades de transcrição, o promotor HCMV só pode ser utilizado uma vez para impedir a possibilidade de recombinação homóloga interna e a instabilidade do plasmídeo. Por exemplo, numa composição com dois plasmídeos de expressão de antigénios, em que um plasmídeo tem uma unidade de transcrição e o segundo tem duas unidades de transcrição. Nessa composição, o promotor HCMV pode ser utilizado para ativar a expressão

do único antígeno ou da proteína de fusão no plasmídeo com uma unidade de transcrição, e pode ser igualmente utilizado para ativar a expressão de uma das proteínas ou proteínas de fusão no plasmídeo que tem duas unidades de transcrição.

No caso em que o agente patogénico é o vírus da imunodeficiência humana (VIH), as composições imunogénicas são descritas com quatro plasmídeos com unidade de transcrição única que contêm sequências de nucleótidos que codificam, respetivamente, um polipéptido envelope de VIH, um polipéptido de fusão gag-pol de VIH, um polipéptido de fusão nef-tat-vif de VIH e um polipéptido adjuvante. Se desejado, podem ser utilizados dois plasmídeos com unidade de transcrição única, que contêm sequências de nucleótidos que codificam, respetivamente, um polipéptido gag de VIH e um polipéptido de fusão pol de VIH, em vez do plasmídeo com uma unidade de transcrição única que contém uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão gag-pol de VIH (assim, neste aspeto, são utilizados cinco plasmídeos).

Em geral, dependendo da sua origem, os promotores diferem na eficácia e especificidade do tecido ao iniciar a síntese de ARNm [Xiang *et al.*, *Virology*, 209:564-579 (1994); Chapman *et al.*, *Nucle. Acids. Res.*, 19:3979-3986 (1991)]. Até à data, a maioria das composições imunogénicas baseadas em ADN nos sistemas mamíferos dependeram dos promotores virais derivados do citomegalovírus (CMV). O CMV pode ter uma origem humana ou simiana. Estas foram eficazes na imunização do músculo e da pele em diversas espécies mamíferas. Outro fator conhecido por afetar a resposta imunitária provocada pela imunização de ADN é o método de ministração de ADN; as vias parentéricas podem produzir taxas baixas de transferência de genes, bem como uma variabilidade considerável de expressão de genes. Consulte Montgomery *et al.*, *DNA Cell Bio.*, 12:777-783 (1993). A inoculação de alta velocidade de plasmídeos, utilizando um

bombardeamento de genes, melhorou as respostas imunitárias dos ratinhos, presumivelmente devido a uma maior eficácia da transfeção de ADN e a uma apresentação de antigénios mais eficaz através das células dendríticas. Consulte Fynan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:11478-11482 (1993B); Eisenbraun *et al.*, *DNA Cell Biol.*, 12: 791-797 (1993). Os vetores que contêm a composição imunogénica baseada em ácido nucleico da invenção também podem ser introduzidos no hospedeiro desejado através de outros métodos conhecidos na técnica, por ex., transfeção, eletroporação, microinjeção, transdução, fusão de células, DEAE-dextrano, precipitação de fosfato de cálcio, lipofecção (fusão de lisossomas) ou um transportador de vetor de ADN. Consulte, por ex., Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:963-967 (1992); Wu e Wu, *J. Biol. Chem.* 263:14621-14624 (1988); Hartmut *et al.*, Pedido de Patente canadiana n.º 2.012.311, apresentado a 15 de março de 1990.

Por conseguinte, a presente invenção refere-se a plasmídeos, composições imunogénicas e métodos para a imunização genética de vertebrados, tais como mamíferos, aves e peixes. Os plasmídeos, as composições imunogénicas e os métodos da presente invenção podem ser particularmente úteis para pacientes mamíferos, incluindo as espécies humana, bovina, ovina, porcina, equina, canina e felina. Os plasmídeos, as composições imunogénicas e os métodos são descritos detalhadamente abaixo e com respeito aos documentos citados, que são incorporados por motivos de consulta para fornecer pormenores conhecidos de um perito na técnica.

A. Plasmídeos de ADN, Vetores, Construções, Composições Imunogénicas

Os termos plasmídeo, construção e vetor são utilizados em toda a especificação. Conforme aqui utilizado, o termo "plasmídeo" refere-se a uma molécula de ADN superespiralado circular, na qual várias moléculas de ácido nucleico que

codificam sequências reguladoras, grelhas de leitura abertas, locais de clonagem, codões de terminação, regiões de separador ou outras sequências selecionadas para regiões estruturais ou funcionais são montadas e utilizadas como um vetor para expressar genes num hospedeiro vertebrado. Além disso, conforme aqui utilizado, os “plasmídeos” são capazes de se replicar numa estirpe bacteriana. Conforme aqui utilizado, o termo “construção” refere-se a um determinado vetor ou plasmídeo com uma disposição especificada de genes e elementos reguladores. Uma sequência de ácidos nucleicos pode ser “exógena”, o que significa que é estranha para a célula na qual o vetor está a ser introduzido, “heteróloga”, o que significa que deriva de uma fonte genética diferente, ou “homóloga”, o que significa que a sequência é estruturalmente relacionada com uma sequência na célula, mas numa posição no ácido nucleico da célula hospedeira na qual a sequência não se encontra habitualmente. Um perito na técnica terá o equipamento adequado para construir um vetor ou modificar um plasmídeo da invenção através das técnicas recombinantes padrão, que são descritas em, por ex., Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque, (1989) e nas referências aí citadas, por exemplo, nas páginas 3.18 a 3.26 e 16.17 a 16.27, e em Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, Nova Iorque (1995), ambos aqui incorporados por motivos de consulta.

O termo “vetor” é utilizado para referir uma molécula de ácido nucleico de portador, na qual possa ser inserida uma molécula de ácido nucleico designada que codifica um antígeno, ou antígenos, para a introdução numa célula onde possa ser expressa. Os vetores incluem plasmídeos, cosmídeos, vírus (bacteriófagos, vírus de animais e vírus de plantas) e cromossomas artificiais (por ex., YACs). O termo “vetor de expressão” refere-se a um vetor que contém

uma sequência de ácidos nucleicos que codifica, pelo menos, parte de um produto de gene capaz de ser transcrito. Em alguns casos, as moléculas de ARN são depois traduzidas numa proteína, num polipéptido ou num péptido. Noutros casos, estas sequências não são traduzidas, por exemplo, na produção de ARN de interferência expresso (eiARN), pequeno ARN de interferência (siARN), moléculas antisense ou ribozimas. Os vetores de expressão podem conter uma variedade de “sequências de controlo”, que se referem a sequências de ácidos nucleicos necessárias para a transcrição e, possivelmente, tradução de uma sequência de codificação ligada de modo funcional num determinado organismo hospedeiro. Além das sequências de controlo que regulam a transcrição e a tradução, os vetores e os vetores de expressão podem conter sequências de ácidos nucleicos que servem igualmente outras funções e são descritas abaixo.

Os termos “ácido nucleico” e “oligonucleótido” são utilizados alternadamente para se referirem a múltiplos nucleótidos (ou seja, moléculas que compreendem um açúcar (por ex. ribose ou desoxirribose) ligados a um grupo fosfato e a uma base orgânica permutável, que é uma pirimidina substituída (por ex. citosina (C), timina (T) ou uracila (U)) ou uma purina substituída (por ex. adenina (A) ou guanina (G)). Conforme aqui utilizado, os termos referem-se a oligorribonucleótidos, bem como a oligodesoxirribonucleótidos. Os termos também devem incluir polinucleósidos (ou seja, um polinucleótido menos o fosfato) e qualquer outra base orgânica que contenha o polímero. As moléculas de ácido nucleico podem ser obtidas a partir de fontes existentes de ácido nucleico (por ex. genómicas ou ADNc), mas podem ser produzidas sinteticamente (por ex. produzidas através de síntese de oligonucleótidos).

A expressão “derivam de unidades de transcrição

diferentes", conforme aqui utilizada, significa que cada um dos elementos reguladores de uma função semelhante, tal como os promotores, tem uma origem diferente e não é homólogo em relação aos outros de modo a poder ser originada uma instabilidade genética na recombinação no plasmídeo. Consulte Herrera *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 279:548-551 (2000).

As composições imunogénicas desta invenção incluem um plasmídeo de ADN com unidade de transcrição tripla que compreende uma sequência de ADN que codifica, pelo menos, três antigénios selecionados para os quais é pretendida uma resposta imunitária. No plasmídeo, os antigénios selecionados estão sob o controlo de sequências reguladoras que orientam a expressão dos mesmos numa célula de mamífero ou vertebrado. As composições imunogénicas desta invenção incluem igualmente combinações de plasmídeos que codificam os antigénios selecionados. Essas combinações podem ser constituídas por dois, três ou quatro plasmídeos que codificam os antigénios selecionados adicionais. Podem existir uma, duas ou três unidades de transcrição em qualquer plasmídeo específico da combinação. Além disso, os plasmídeos adicionais que codificam os polipéptidos adjuvantes podem ser incluídos nas composições imunogénicas da invenção.

Os vetores de plasmídeo não virais úteis nesta invenção contêm sequências de ADN isoladas e purificadas que compreendem sequências de ADN que codificam os antigénios e imunogénios selecionados. A molécula de ADN que codifica os antigénios-alvo pode derivar de fontes virais ou não virais, tais como espécies bacterianas ou antigénios de tumor que foram designados para codificar uma sequência de ácidos nucleicos exógena ou heteróloga. Esses plasmídeos ou vetores podem incluir sequências de vírus ou fagos. Diversos vetores não virais são conhecidos na técnica e podem incluir, sem limitação, plasmídeos, vetores

bacterianos, vetores de bacteriófago, ADN "nu", ADN condensado com polímeros ou lípidos catiónicos, bem como ADN formulado com outros agentes facilitadores de transfeção, por exemplo a anestesia local, tal como a bupivacaína, descrita abaixo.

Os componentes dos plasmídeos desta invenção podem ser obtidos a partir de vetores existentes. Os exemplos de vetores bacterianos incluem, mas não se limitam a, sequências derivadas de *bacille Calmette Guérin* (BCG), *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* e *Listeria*, entre outras. Os vetores de plasmídeo adequados para obter componentes incluem, por exemplo, pBR322, pBR325, pACYC177, pACYC184, pUC8, pUC9, pUC18, pUC19, pLG339, pR290, pK37, pKC101, pAC105, pVA51, pKH47, pUB110, pMB9, pBR325, Col E1, pSC101, pBR313, pML21, RSF2124, pCR1, RP4, pBAD18 e pBR328.

É possível obter outros componentes a partir de vetores de expressão induzidos. Os exemplos de vetores de expressão de *Escherichia coli* induzidos adequados incluem pTrc (Amann *et al.*, *Gene*, 69:301-315 (1988)), os vetores de expressão de arabinose (por ex., pBAD18, Guzman *et al.*, *J. Bacteriol.*, 177:4121-4130 (1995)) e pETIIId (Studier *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185:60-89 (1990)). A expressão de genes-alvo a partir do vetor pTrc depende da transcrição da polimerase de ARN do hospedeiro de um promotor de fusão trp-lac híbrido. A expressão de genes-alvo a partir do vetor pETIIId depende da transcrição de um promotor de fusão T7 gn10-lac mediado por uma polimerase T7 gn I de ARN viral coexpressa. Esta polimerase viral é constituída por estirpes hospedeiras BL21 (DE3) ou HMS 174(DE3) de um profago residente que protege um gene *T7 gn1* sob o controlo de transcrição do promotor *lacUV5*. O sistema pBAD depende do promotor de arabinose induzido que é regulado pelo gene *araC*. O promotor é induzido na presença de arabinose.

Os componentes reguladores podem ser obtidos a partir de promotores induzidos que são regulados por compostos

fornechos exogenamente, incluindo, o promotor de metalotioneína (MT) de ovelha induzido por zinco, o promotor do vírus de tumor mamário de ratinho (MMTV) induzido por dexametasona (Dex), o sistema induzido por tetraciclina (Gossen *et al.*, *Science* 268:1766-1769 (1995) e o sistema induzido por rapamicina (Magari *et al.*, *J clin Invest*, 100:2865-2872 (1997)).

Os sinais de controlo de transcrição nos eucariotas são compostos por elementos de promotores e intensificadores. Conforme aqui utilizado, "promotores" e "intensificadores" referem-se a sequências de ADN que interagem especificamente com proteínas envolvidas na transcrição. Consulte Maniatis, T., *et al.*, *Science* 236:1237 (1987). Conforme descrito acima, é possível combinar regiões 5' não traduzidas com promotores e intensificadores para melhorar a expressão dos antígenos selecionados. Os promotores, os intensificadores e outras sequências reguladoras que ativam a expressão do antígeno no paciente mamífero ou vertebrado desejado podem ser selecionados de forma semelhante a partir de uma vasta lista de promotores conhecidos por serem úteis para esse fim. São descritos abaixo diversos desses promotores. Numa forma de realização da composição imunogénica de plasmídeo de ADN descrita abaixo, os promotores úteis são o promotor/intensificador do citomegalovírus humano (HCMV) (descrito, por ex., nas Patentes US n.ºs 5.158.062 e 5.385.839, aqui incorporadas por motivos de consulta), os promotores 1 e 2 associados a latência do vírus herpes humano (HSV-Lap1 e HSV-Lap2: por vezes designados por "promotores 1 e 2 de latência ativa") e o promotor/intensificador do citomegalovírus símio (SCMV). Consulte Goins W.F. *et al.*, *J. Virology* 68:2239-2252 (1994); Soares, K. J. *et al.*, *Virology* 70:5384-5394; Goins W.F. *et al.*, *J. Virology* 73:519-532 (1999). O promotor do citomegalovírus murino (MCMV) também é adequado para

utilização.

Outros elementos de controlo de transcrição úteis incluem elementos de controlo pós-transcrição, tais como os intensificadores de transporte constitutivos (CTE), ou elementos tipo CTE, tais como os elementos de transporte de ARN (RTE), que ajudam no transporte do ARN não spliced ou parcialmente spliced até ao citoplasma. Consulte a Patente US n.º 5.585.263 de Hammarskjold *et al.*, e Zolotukhin *et al.*, *J. Virol.* 68:944-7952 (1994). O CTE ou RTE é conveniente, uma vez que provou melhorar a expressão e porque muitos genes necessitam da presença de elementos de controlo pós-transcrição. Existem vários tipos de CTE e elementos tipo CTE, que funcionam utilizando vias diferentes. Consulte Tabemero *et al.*, *J. Virol.* 71:95-101 (1997). Consulte igualmente o pedido de patente internacional WO 99/61596, que descreve um novo tipo de elemento de controlo pós-transcrição que é capaz de substituir o CTE.

A expressão de genes também pode ser melhorada através da inclusão de sequências de polinucleótidos que funcionam ao nível do suporte da acumulação de ARNm, aumento da estabilidade de ARNm ou através da facilitação da entrada de ribossoma, em que todos os mecanismos produzem níveis maiores de tradução. Nas formas de realização particulares da invenção, é possível combinar regiões 5' não traduzidas e intrões específicos com promotores e intensificadores para produzir promotores compósitos ou quiméricos capazes de ativar níveis mais elevados de expressão de genes.

Os exemplos de regiões 5 não traduzidas úteis para melhorar a expressão de genes incluem a sequência líder tripartida de adenovírus (Adtp) que pode ser inserida a jusante de um promotor para aumentar a expressão de um gene ou transgene melhorando a tradução, sem modificar a especificidade do promotor. Consulte W. Sheay *et al.*, *Biotechniques* 15(5):856-62 (1993). O 5'UTR de mARNs do

fator de alongamento 1 alfa (EF-1 α) de chimpanzé e ratinho contém um intrão conhecido por melhorar a expressão de genes através do aumento da transcrição de ARN e/ou estabilidade de ARN. Consulte S.Y. Kim et al., *J Biotechnol.* 14;93(2):183-7 (1993). O 5'-UTR do ARNm que codifica o fator de iniciação eucariótico 4g (eIF4g) é caracterizado pela presença de um local de entrada de ribossoma interno (IRES) putativo e apresenta uma atividade de promotor forte. Consulte B. Han B. & J.T. Zhang *Mol Cell Biol* 22(21):7372-84 (2002). Além disso, o 5'UTR de ARNm da proteína de choque térmico 70 (Hsp70) humana contém um elemento que aumenta a eficácia da tradução de ARNm em condições de cultura de células normais até uma ordem de magnitude. Consulte S. Vivinus et al., *Eur J Biochem.* 268(7):1908-17 (2001). O 5'UTR do fator de repressão NF-kappaB funciona como um IRES potente e também como um intensificador de tradução no contexto de mARNs monocistrônicos. Consulte A. Oumard et al., *Mol Cell Biol.* 20(8):2755-9 (2000). Quando associados e adicionados entre o CAP e o codão de iniciação, o 5'UTR do SV40 e a região R da Repetição Terminal Longa (SUR) de Tipo 1 do vírus da leucemia de células T (HTLV) humana aumentam a eficácia da tradução possivelmente através da estabilização de ARNm. Consulte Y. Takebe et al., *Mol Cell Biol.* 8(1):466-472 (1988).

Nas formas de realização particulares da invenção, as sequências reguladoras para inclusão numa molécula de ácido nucleico, num plasmídeo de ADN ou vetor desta invenção incluem, sem limitação, uma sequência de promotores, uma sequência de intensificadores, uma sequência de regiões 5' não traduzidas, intrão, CTE, RTE, uma sequência de poliadenilação, uma sequência de dadores de splice e uma sequência de aceitadores de splice, um local para terminação e iniciação de transcrição posicionado no início e no fim, respetivamente, do gene a ser traduzido, um local

de ligação de ribossoma para tradução na região transcrita, uma etiqueta de epítopo, uma sequência de localização nuclear, um elemento de local de entrada de ribossoma interno (IRES), um elemento "TATA" Goldberg-Hogness, um local de clivagem de enzima de restrição, um marcador selecionável e afins. As sequências de intensificadores incluem, por ex., a repetição em tandem 72 bp de ADN do SV40 ou as repetições terminais longas ou LTRs retrovirais, etc., e são utilizadas para aumentar a eficácia de transcrição. Consulte Wasylyk, *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 12:5589-5608 (1984).

Estes outros componentes úteis nos plasmídeos de ADN, incluindo, por ex., origens de replicação, sequências de poliadenilação (por ex., poliA da hormona de crescimento bovino (BGH), poliA do vírus símio 40 (SV40)), marcadores de resistência a fármacos (por ex., resistência à canamicina), e afins, também podem ser selecionados a partir de sequências muito conhecidas, incluindo as descritas nos exemplos e mencionadas especificamente abaixo.

A seleção de promotores individuais e outros elementos de plasmídeo comuns é convencional e estão disponíveis muitas sequências com as quais é possível conceber os plasmídeos úteis nesta invenção. Consulte, por ex., Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque, (1989) e as referências aí citadas, por exemplo, nas páginas 3.18 a 3.26 e 16.17 a 16.27 e Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1989). Todos os componentes dos plasmídeos úteis nesta invenção podem ser facilmente selecionados por um perito na técnica entre os materiais conhecidos na técnica e disponíveis na indústria farmacêutica.

Os exemplos de genes adequados, que expressam antigénios ou polipéptidos, são identificados na descrição

abaixo. Numa forma de realização dos plasmídeos e das composições imunogénicas aqui divulgados, os antigénios selecionados são antigénios de VIH-1, incluindo os expressos pelos genes *gag*, *pol*, *env*, *nef*, *vpr*, *vpu*, *vif* e *tat*. Numa forma de realização, as sequências de codificação e não codificação e outros componentes do plasmídeo de ADN são otimizados, por exemplo, através da seleção de códons apropriada ao hospedeiro pretendido e da remoção de quaisquer sequências inibitórias, igualmente descritas abaixo relativamente à preparação de antigénios.

De acordo com as formas de realização da presente invenção, uma composição contém um plasmídeo que expressa, pelo menos, três antigénios selecionados. Em alternativa, a composição de plasmídeo compreende igualmente um plasmídeo de ADN que compreende uma sequência de ADN que codifica, pelo menos, três cópias do mesmo antigénio ou polipéptido de interesse selecionado. Numa forma de realização da presente invenção, uma composição pode conter um plasmídeo que expressa múltiplos antigénios selecionados a partir de múltiplas grelhas de leitura abertas. Noutra forma de realização, a composição de plasmídeo compreende um plasmídeo de ADN que compreende uma sequência de ADN que codifica múltiplas cópias de grelhas de leitura abertas semelhantes que codificam múltiplos antigénios selecionados, por exemplo múltiplos genes *env* de espécies diferentes.

Numa forma de realização particular da invenção, a utilização de combinações de plasmídeos, cada um expressando um único antigénio, pode originar uma composição imunogénica mais eficaz. Por exemplo, numa forma de realização, a presente invenção fornece uma composição imunogénica em que a composição imunogénica contém quatro plasmídeos, cada um codificando um imunogénio de VIH ou um adjuvante. Uma composição imunogénica específica dessas contém a seguinte combinação de quatro plasmídeos: (a) um

primeiro plasmídeo de ADN que tem uma unidade de transcrição única com uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido envelope de VIH; (b) um segundo plasmídeo de ADN que tem uma unidade de transcrição única com uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão gag-pol de VIH; (c) um terceiro plasmídeo de ADN que tem uma unidade de transcrição única com uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão nef-tat-vif de VIH; (d) um quarto plasmídeo de ADN que tem uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido adjuvante; e (e), pelo menos, um entre um agente facilitador de transfeção, portador ou diluente farmacêuticamente aceitável. Numa forma de realização específica, o promotor que ativa a expressão de cada um dos genes de VIH é o promotor HCMV, e a sequência de poliA para cada um dos genes de VIH é a poliA da hormona de crescimento bovino.

Numa forma de realização específica da invenção, em que é desejada a utilização de combinações de plasmídeos, cada um expressando um único antigénio, pode ser vantajoso utilizar mais plasmídeos que contêm mais genes individuais que codificam polipéptidos individuais e menos genes de fusão que codificam polipéptidos de fusão. Por exemplo, numa forma de realização, a presente invenção fornece uma composição imunogénica, em que a composição imunogénica contém cinco plasmídeos, cada um codificando um imunogénio de VIH ou um adjuvante. Nesta forma de realização, a composição imunogénica compreende: (a) um primeiro plasmídeo de ADN que tem uma unidade de transcrição única com uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido envelope de VIH; (b) um segundo plasmídeo de ADN que tem uma unidade de transcrição única com uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido gag de VIH; (c) um terceiro plasmídeo de ADN que tem uma unidade de transcrição única com uma sequência de nucleótidos que

codifica um polipéptido pol de VIH; (d) um quarto plasmídeo de ADN que tem uma unidade de transcrição única com uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão nef-tat-vif de VIH; (e) um quinto plasmídeo de ADN que tem uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido adjuvante. Numa forma de realização específica, o promotor que ativa a expressão de cada um dos genes de VIH é o promotor HCMV e a sequência de poliA para cada um dos genes de VIH é a poliA da hormona de crescimento bovino.

Ainda noutra forma de realização, os plasmídeos de ADN e as composições imunogénicas podem ainda conter, como um componente de plasmídeo de ADN individual ou parte do plasmídeo de ADN que contém o antigénio, uma sequência de nucleótidos que codifica uma citocina desejável, uma linfocina ou outro adjuvante genético. Abaixo, é fornecida uma descrição dos adjuvantes adequados para os quais estão disponíveis sequências de ácidos nucleicos. Nas formas de realização exemplificadas nesta invenção, uma citocina desejável para a administração com a composição de plasmídeo de ADN desta invenção é a interleucina-12.

A composição de plasmídeo de ADN pode ser administrada num portador, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável, tais como os descritos abaixo. Embora a composição possa ser administrada por qualquer via de administração selecionada, numa forma de realização, um método de administração aconselhável é a coadministração intramuscular de uma composição que compreende as moléculas de plasmídeo com bupivacaína como o agente facilitador de transfeção, descrito abaixo.

B. Disposição Física de Elementos no Plasmídeo

Uma consideração prática para conceber uma composição imunogénica de vertebrado é a quantidade de ADN que pode ser administrada eficazmente ao imunizar pacientes. Quando a dose é considerada, a limitação do tamanho total do

plasmídeo, enquanto é maximizado em simultâneo o número de unidades de transcrição completas no plasmídeo, fornece uma estratégia para criar conceções de ADN de plasmídeo. As vantagens de minimizar o tamanho do plasmídeo e maximizar o número de genes expressos traduzem-se no melhoramento da dose de proteína imunogénica ministrada por micrograma de ADN injetado. Além disso, é sabido que, à medida que o tamanho do vetor aumenta, também aumenta a possibilidade de instabilidade do vetor. Consulte Herrera *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279:548-551 (2000). Por conseguinte, para alcançar este objetivo, o tamanho dos elementos de controlo reguladores individuais, tais como os promotores, deve ser considerado e equilibrado com a força do promotor necessário para um determinado nível de expressão. Igualmente, o tamanho das grelhas de leitura abertas contribui para o tamanho global do plasmídeo. Conforme aqui utilizado, as regiões de ADN no meio das unidades de transcrição, que são ocupadas por ADN que não tem um papel de codificação de antigénio regulador ou selecionado, são aqui referidas como “regiões de separador”. O tamanho das regiões de separador é importante na determinação do nível de interferência de transcrição entre as unidades de transcrição, do nível de impedimento estérico e do tamanho total do plasmídeo. Por conseguinte, o tamanho de cada elemento, quer seja uma codificação de proteína, um controlo regulador ou uma região de separador, tem de ser considerado cuidadosamente e limitado para os menores números eficazes de pares de bases.

As formas de realização da presente invenção fornecem um plasmídeo de ADN com unidade de transcrição tripla que tem um comprimento total igual a cerca de 18 pares de quilobase (kb) ou menos de ADN. Numa forma de realização alternativa, a presente invenção fornece um plasmídeo de ADN com unidade de transcrição tripla que tem um comprimento total igual a cerca de 17 kb ou menos de ADN.

Outra forma de realização da presente invenção fornece um plasmídeo de ADN com unidade de transcrição tripla que tem um comprimento total igual a cerca de 16 kb ou menos de ADN. Uma determinada forma de realização da presente invenção fornece um plasmídeo de ADN com unidade de transcrição tripla que tem um comprimento total igual a cerca de 15 kb ou menos de ADN. Contudo, outra forma de realização da presente invenção fornece um plasmídeo de ADN com unidade de transcrição tripla que tem um comprimento total igual a cerca de 14 kb ou menos de ADN. Uma forma de realização específica da presente invenção fornece um plasmídeo de ADN com unidade de transcrição tripla que tem um comprimento total igual a cerca de 13 kb ou menos de ADN. Uma forma de realização particular da presente invenção fornece um plasmídeo de ADN com unidade de transcrição tripla que tem um comprimento total igual a cerca de 12 kb ou menos de ADN. Outra forma de realização da presente invenção fornece um plasmídeo de ADN com unidade de transcrição tripla que tem um comprimento total igual a cerca de 11 kb ou menos de ADN.

Conforme aqui utilizado, "cerca de" ou "aproximadamente" referem-se a geralmente 20 por cento de um determinado valor ou intervalo.

Conforme definido na Figura 1, a orientação da direção de transcrição entre as três unidades de transcrição é outra consideração para a concepção de plasmídeo de ADN. Um perito na técnica da biologia molecular irá perceber que num plasmídeo de ADN circular existem apenas duas direções de transcrição. Por conseguinte, num plasmídeo com três unidades de transcrição, pelo menos duas delas estarão na mesma direção. Numa determinada forma de realização da invenção, a direção de transcrição para a primeira unidade de transcrição está na direção oposta da direção de expressão da segunda unidade de transcrição. Noutra forma de realização da invenção, a direção de transcrição para a

primeira unidade de transcrição está na direção oposta da direção de expressão da segunda unidade de transcrição, e a direção de transcrição da terceira unidade de transcrição está na mesma direção da segunda unidade de transcrição. Ainda noutra forma de realização da invenção, a direção de transcrição para a primeira unidade de transcrição está na direção oposta da direção de expressão da segunda unidade de transcrição e a direção de transcrição da terceira unidade de transcrição está na mesma direção da primeira unidade de transcrição.

Um perito na técnica irá perceber que a numeração das unidades de transcrição como “primeira”, “segunda” e “terceira” é apenas por motivos de conveniência. As três unidades de transcrição podem ser dispostas por qualquer ordem em torno do plasmídeo.

Num plasmídeo com duas unidades de transcrição existem determinados constrangimentos relativamente à direção de transcrição para as duas unidades de transcrição. Se as direções da transcrição para as duas unidades de transcrição estiverem na direção oposta, as duas unidades de transcrição podem ser separadas uma da outra por uma região de separador tão pequena como 200 bp, por uma região de separador tão pequena como 300 bp, ou por uma região de separador tão pequena como 400 bp.

Num plasmídeo com duas unidades de transcrição, se as direções da transcrição para as duas unidades de transcrição estiverem na mesma direção, as duas unidades de transcrição devem ser separadas uma da outra por uma região de separador de, pelo menos, cerca de 500 bp. Noutra forma de realização, as duas unidades de transcrição devem ser separadas uma da outra por uma região de separador de, pelo menos, cerca de 600 bp. Ainda noutra forma de realização, as duas unidades de transcrição devem ser separadas uma da outra por uma região de separador de, pelo menos, cerca de 700 bp. Numa determinada forma de realização, as duas

unidades de transcrição devem ser separadas uma da outra por uma região de separador de, pelo menos, cerca de 800 bp. Noutra forma de realização, as duas unidades de transcrição devem ser separadas uma da outra por uma região de separador de, pelo menos, cerca de 900 bp. Ainda noutra forma de realização, as duas unidades de transcrição devem ser separadas uma da outra por uma região de separador de, pelo menos, cerca de 1000 bp.

Noutra forma de realização da invenção, a direção de transcrição para a primeira unidade de transcrição está na mesma direção da direção de expressão da segunda unidade de transcrição. Ainda noutra forma de realização da invenção, a direção de transcrição para a primeira unidade de transcrição está na mesma direção da direção de expressão da segunda unidade de transcrição, e a direção de transcrição da terceira unidade de transcrição está na mesma direção da segunda unidade de transcrição. Numa forma de realização particular da invenção, a direção de transcrição para a primeira unidade de transcrição está na mesma direção da direção de expressão da segunda unidade de transcrição e a direção de transcrição da terceira unidade de transcrição está na direção oposta da primeira unidade de transcrição.

O tamanho das regiões de separador é variável de modo a poder ser manipulado para aliviar a interferência de transcrição entre as unidades de transcrição, diminuir o impedimento estérico e controlar o tamanho global do plasmídeo. Na forma de realização ilustrada na Figura 1, existe uma região de separador a separar as unidades de transcrição 1 e 2 localizada no meio dos promotores SCMV e HCMV. Conforme aqui utilizado, a região de separador a separar as unidades de transcrição 1 e 2 é conhecida como "região de separador 1". Na forma de realização ilustrada na Figura 1, existe uma região de separador a separar as unidades de transcrição 2 e 3 localizada no meio de poli A

do SV 40 e o promotor Lap 1 HSV. Conforme aqui utilizado, a região de separador a separar as unidades de transcrição 2 e 3 é conhecida como "região de separador 2". Na forma de realização ilustrada na Figura 1, existe uma terceira região de separador a separar as unidades de transcrição 3 e 1 localizada no meio de poli A da BGH e poli A da beta-globina de coelho. Conforme aqui utilizado, a região de separador a separar as unidades de transcrição 3 e 1 é conhecida como "região de separador 3". Consulte a figura 1.

Outra característica da invenção é o facto de o tamanho global do plasmídeo poder ser minimizado utilizando as regiões de separador do plasmídeo eucariótico para realizar as funções do plasmídeo e/ou adjuvante. Por exemplo, na forma de realização ilustrada na figura 1, a região de separador 3 inclui igualmente a origem bacteriana de replicação. Além disso, na forma de realização ilustrada na figura 1, a região de separador 2 inclui o gene da canamicina para o crescimento nas bactérias. Noutras formas de realização, as regiões de separador incluem sequências de ilhas CpG para estimular a resposta imunitária. Noutra forma de realização, as regiões de separador incluem sequências CTE e/ou RTE para melhorar a expressão de antígenos. Ainda noutra forma de realização da invenção, a região de separador pode incluir sequências de intensificadores. Noutra forma de realização da invenção, a região de separador pode incluir sequências não traduzidas conhecidas por serem úteis no melhoramento da expressão.

Numa forma de realização da invenção, a região de separador 1 tem um tamanho inferior a cerca de 5 kb, ou inferior a cerca de 4 kb. Noutra forma de realização da invenção, a região de separador 1 tem um tamanho inferior a cerca de 3 kb, ou inferior a cerca de 2 kb. Numa determinada forma de realização da invenção, a região de separador 1 tem um tamanho inferior a cerca de 1 kb. Numa

forma de realização particular da invenção, a região de separador 1 tem um tamanho entre cerca de 800 pares de bases (bp) e cerca de 1000 bp. Numa forma de realização alternativa da invenção, a região de separador 1 tem um tamanho entre cerca de 600 bp e cerca de 800 bp. Numa determinada forma de realização da invenção, a região de separador 1 tem um tamanho entre cerca de 400 bp e cerca de 600 bp. Noutra forma de realização da invenção, a região de separador 1 tem um tamanho entre cerca de 300 bp e cerca de 400 bp. Noutra forma de realização da invenção, a região de separador 1 tem um tamanho inferior a cerca de 400 bp. Numa forma de realização específica da invenção, a região de separador 1 tem um tamanho entre cerca de 200 bp e cerca de 300 bp. Numa forma de realização particular da invenção, a região de separador 1 tem um tamanho entre cerca de 100 bp e cerca de 200 bp. Noutra forma de realização da invenção, a região de separador 1 tem um tamanho entre cerca de 10 bp e cerca de 100 bp.

Numa forma de realização da invenção, a região de separador 2 tem um tamanho inferior a cerca de 5 kb, ou inferior a cerca de 4 kb. Noutra forma de realização da invenção, a região de separador 2 tem um tamanho inferior a cerca de 3 kb, ou inferior a cerca de 2 kb. Numa determinada forma de realização da invenção, a região de separador 2 tem um tamanho inferior a cerca de 1 kb. Noutra forma de realização da invenção, a região de separador 2 tem um tamanho inferior a cerca de 1100 bp. Numa forma de realização particular da invenção, a região de separador 2 tem um tamanho entre cerca de 800 pares de bases (bp) e cerca de 1000 bp. Numa forma de realização alternativa da invenção, a região de separador 2 tem um tamanho entre cerca de 600 bp e cerca de 800 bp. Numa determinada forma de realização da invenção, a região de separador 2 tem um tamanho entre cerca de 400 bp e cerca de 600 bp. Noutra forma de realização da invenção, a região de separador 2

tem um tamanho entre cerca de 300 bp e cerca de 400 bp. Numa forma de realização específica da invenção, a região de separador 2 tem um tamanho entre cerca de 200 bp e cerca de 300 bp. Numa forma de realização particular da invenção, a região de separador 2 tem um tamanho entre cerca de 100 bp e cerca de 200 bp. Noutra forma de realização da invenção, a região de separador 2 tem um tamanho entre cerca de 10 bp e cerca de 100 bp.

Numa forma de realização da invenção, a região de separador 3 tem um tamanho inferior a cerca de 5 kb, ou inferior a cerca de 4 kb. Noutra forma de realização da invenção, a região de separador 3 tem um tamanho inferior a cerca de 3 kb, ou inferior a cerca de 2 kb. Numa determinada forma de realização da invenção, a região de separador 3 tem um tamanho inferior a cerca de 1 kb. Noutra forma de realização da invenção, a região de separador 3 tem um tamanho inferior a cerca de 1100 bp. Numa forma de realização particular da invenção, a região de separador 3 tem um tamanho entre cerca de 800 bp e cerca de 1000 bp. Numa forma de realização alternativa da invenção, a região de separador 3 tem um tamanho entre cerca de 600 bp e cerca de 800 bp. Numa determinada forma de realização da invenção, a região de separador 3 tem um tamanho entre cerca de 400 bp e cerca de 600 bp. Noutra forma de realização da invenção, a região de separador 3 tem um tamanho entre cerca de 300 bp e cerca de 400 bp. Numa forma de realização específica da invenção, a região de separador 3 tem um tamanho entre cerca de 200 bp e cerca de 300 bp. Numa forma de realização particular da invenção, a região de separador 3 tem um tamanho entre cerca de 100 bp e cerca de 200 bp. Noutra forma de realização da invenção, a região de separador 3 tem um tamanho entre cerca de 10 bp e cerca de 100 bp.

C. Antígenios Expressos por Composições Imunogénicas desta Invenção

Conforme aqui utilizado, “polipéptido” refere-se a proteína selecionada, glicoproteína, péptido ou outros antígenos de proteína modificados, que são codificados pelos plasmídeos e pelas composições imunogénicas desta invenção. As formas de realização da invenção fornecem plasmídeos e composições imunogénicas, que induzem uma resposta imunitária aos “polipéptidos” num hospedeiro vertebrado para um antígeno selecionado. Conforme aqui utilizado, o termo “antígeno selecionado” refere-se a três polipéptidos. Os antígenos selecionados, que compreendem os polipéptidos, quando expressos pelo ADN de plasmídeo, podem incluir uma proteína, poliproteína, polipéptido, péptido, fragmento ou uma fusão dos mesmos derivada de um vírus patogénico, bactéria, fungo, parasita, prião ou combinações dos mesmos. Em alternativa, os antígenos selecionados podem incluir uma proteína, poliproteína, polipéptido, péptido, fragmento ou fusão dos mesmos derivada de uma célula de cancro ou célula de tumor. Noutra forma de realização, os antígenos selecionados podem incluir uma proteína, poliproteína, polipéptido, péptido, fragmento ou fusão dos mesmos derivada de um alérgénio, para interferir com a produção de IgE de modo a moderar as respostas alérgicas ao alérgénio. Ainda noutra forma de realização, os antígenos selecionados podem incluir uma proteína, poliproteína, polipéptido, péptido, fragmento ou fusão dos mesmos derivada de uma molécula ou parte da mesma, que representa os que foram produzidos por um hospedeiro (uma molécula própria) de um modo, numa quantidade ou localização indesejados, tais como os da proteína precursora amiloide, para prevenir ou tratar a doença caracterizada pela deposição de amiloide num hospedeiro vertebrado. Numa forma de realização desta invenção, os antígenos selecionados podem incluir uma proteína, uma poliproteína, um polipéptido, um péptido ou um fragmento derivado de VIH-1.

As formas de realização da presente invenção referem-se igualmente a composições imunogénicas que compreendem um plasmídeo que codifica os antigénios selecionados (1) de um vírus patogénico, uma bactéria, um fungo ou um parasita para provocar a resposta imunitária num hospedeiro vertebrado, ou (2) de um antigénio de cancro ou antigénio associado a tumor de uma célula de cancro ou célula de tumor para provocar um efeito anticancerígeno terapêutico ou profilático num paciente mamífero, ou (3) de um alergénio para interferir com a produção de IgE de modo a moderar as respostas alérgicas ao alergénio, ou (4) de uma molécula ou parte da mesma, que representa os que foram produzidos por um hospedeiro (uma molécula própria) de um modo, numa quantidade ou numa localização indesejados, para reduzir esse efeito indesejado.

Noutra forma de realização, uma composição imunogénica aconselhável pode utilizar um plasmídeo com unidade de transcrição tripla desta invenção, o que codifica os antigénios selecionados para induzir uma resposta imunitária com o objetivo de prevenir ou tratar uma das seguintes doenças virais: Vírus da imunodeficiência humana, Vírus da imunodeficiência simiana, Vírus sincicial respiratório, Vírus da parainfluenza tipos 1 a 3, Vírus da influenza, Vírus herpes simplex, Citomegalovírus humano, Vírus da hepatite A, Vírus da hepatite B, Vírus da hepatite C, Vírus do papiloma humano, Poliovírus, rotavírus, calicivírus, Vírus do sarampo, Vírus da papeira, Vírus da rubéola, adenovírus, vírus da raiva, vírus da cinomose canina, vírus da peste bovina, Metapneumovírus humano, pneumovírus aviário (antigamente vírus da rinotraqueíte do peru), Vírus Hendra, Vírus Nipah, coronavírus, parvovírus, vírus da rinotraqueíte infecciosa, vírus da leucemia felina, vírus da peritonite infecciosa felina, vírus da doença infecciosa bursal aviária, vírus da doença de Newcastle, vírus da doença de Marek, vírus da síndrome

reprodutiva e respiratória dos suínos, vírus da arterite equina e vários Vírus da encefalite e Coronavírus, tais como vírus SARS.

Numa forma de realização particular, as composições imunogénicas que compreendem os plasmídeos com unidade de transcrição tripla desta invenção incluem os que codificam os antigénios selecionados de agentes patogénicos que provocam doenças emergentes, tais como o vírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS), vírus herpes humano 8 (HHV-8), vírus Hantaan, *Vibrio cholerae* 0139, *Helicobacter pylori* e *Borrelia burgdorferi*.

Noutra forma de realização, as composições imunogénicas que compreendem os plasmídeos desta invenção incluem os orientados para a prevenção e/ou tratamento de doenças bacterianas provocadas por, sem limitação, *Haemophilus influenzae* (tipável e não tipável), *Haemophilus somnus*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Bordetella pertussis*, *Alloiococcus otidius*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare complex*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium tetani*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Mycoplasma gallisepticum*.

As formas de realização da presente invenção referem-se igualmente a composições imunogénicas que compreendem um plasmídeo que codifica antigénios selecionados de, sem limitação, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*,

Cryptococcus e *Histoplasma*. Em determinadas formas de realização, essas composições imunogénicas que compreendem um plasmídeo que codifica antigénios selecionados de fungos são utilizadas para a prevenção e/ou tratamento de doença fúngica.

Noutra forma de realização, a presente invenção refere-se igualmente a composições imunogénicas que compreendem um plasmídeo que codifica antigénios selecionados de, sem limitação, *Leishmania major*, *Ascaris*, *Trichuris*, *Giardia*, *Schistosoma*, *Cryptosporidium*, *Trichomonas*, *Toxoplasma gondii* e *Pneumocystis carinii*. Em formas de realização particulares, essas composições imunogénicas que compreendem um plasmídeo que codifica antigénios selecionados de parasitas são utilizados para a prevenção e/ou tratamento de doença parasitária.

Numa forma de realização particular, esta invenção fornece composições imunogénicas para provocar um efeito anticancerígeno terapêutico ou profilático num hospedeiro vertebrado, que compreendem um plasmídeo que codifica um antigénio selecionado, tal como um antigénio de cancro ou antigénio associado a tumor, incluindo, sem limitação, antigénio específico da próstata, antigénio carcinoembrionário, MUC-1, Her2, CA-125 e MAGE-3. Em algumas formas de realização, o mesmo antigénio ou variantes do antigénio podem ser colocados em múltiplas unidades de transcrição para melhorar a transcrição e a dose elementar de um determinado antigénio-alvo.

As formas de realização da invenção fornecem igualmente composições imunogénicas que compreendem plasmídeos que codificam antigénios selecionados que são alergénios para a utilização na moderação de respostas a alergénios num hospedeiro vertebrado, incluindo os que contêm um alergénio ou fragmento do mesmo. Os exemplos desses alergénios são descritos na Patente US n.º 5.830.877 e na Publicação de Patente internacional n.º WO99/51259,

que são aqui incorporadas por motivos de consulta. Esses alergénios incluem, sem limitação, pólen, venenos de inseto, pelo de animais, esporos fúngicos e fármacos. As composições imunogénicas da invenção podem ser utilizadas para interferir com a produção de anticorpos IgE, uma causa conhecida de reações alérgicas.

As formas de realização da presente invenção referem-se igualmente a composições imunogénicas que compreendem um plasmídeo que codifica antigénios selecionados para moderar respostas a moléculas próprias num hospedeiro vertebrado. Os antigénios selecionados incluem os que contêm uma molécula própria ou um fragmento da mesma. Os exemplos dessas moléculas próprias incluem a β -cadeia de insulina envolvida na diabetes, a molécula G17 envolvida na doença do refluxo gastroesofágico e os antigénios que reduzem as respostas autoimunes nas doenças, tais como esclerose múltipla, lúpus e artrite reumatoide. Igualmente incluído está o péptido β -amiloide (também referido como péptido A β), que é um fragmento de aminoácido 39-43 interno da proteína precursora amiloide (PPA), que é gerada ao processar a PPA através das enzimas secretases β e γ . O péptido A β 1-42 tem a seguinte sequência: Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala (SEQ. ID N.º 1).

Na seleção e utilização das sequências que codificam os antigénios selecionados para a conceção dos plasmídeos de ADN desta invenção é igualmente aconselhável alterar a utilização de codões dos antigénios selecionados que codificam as sequências de genes, bem como os plasmídeos de ADN nos quais são inseridos, para aumentar a expressão dos antigénios e/ou remover as sequências inibitórias aí existentes. A remoção de sequências inibitórias pode ser realizada utilizando a tecnologia descrita detalhadamente nas Patentes US n.ºs 5.965.726; 5.972.596; 6.174.666;

6.291.664; e 6.414.132; e na Publicação de Patente internacional n.º WO01/46408, aqui incorporadas por motivos de consulta. Resumidamente descrita, esta tecnologia envolve a mutação de sequências de instabilidade/inibitórias identificadas no gene selecionado, de preferência com múltiplas mutações de ponto.

Tal como uma forma de realização específica exemplificada abaixo, o plasmídeo de ADN e as composições imunogénicas desta invenção utilizam preferencialmente uma ou mais sequências otimizadas para genes de VIH-1, tais como *gag*, *pol*, *env*, *nef*, *tat* e *vif*.

A utilização do plasmídeo com unidade de transcrição tripla desta invenção também é adequada para transfetar, transformar ou infetar uma célula hospedeira para expressar três ou mais proteínas de polipéptidos *in vitro*.

D. Promotores Úteis nas Unidades de Transcrição

Os plasmídeos de ADN da invenção compreendem uma, duas ou três unidades de transcrição. Cada unidade de transcrição compreende, pelo menos, um promotor. Por conseguinte, em determinadas formas de realização da invenção, o ácido nucleico que codifica um antigénio selecionado está sob o controlo de transcrição de um promotor. Um "promotor" refere-se a uma sequência de ADN reconhecida pela maquinaria sintética da célula, ou maquinaria sintética introduzida, necessária para iniciar a transcrição específica de um gene. A expressão "sob o controlo de transcrição" significa que o promotor está na localização e orientação corretas em relação ao ácido nucleico para controlar a transcrição e iniciação da polimerase de ARN do gene.

O termo promotor é aqui utilizado para referir um grupo de módulos de controlo de transcrição agrupados em torno do local de iniciação para a polimerase de ARN. Muitas das opiniões sobre como os promotores são

organizados derivam de análises de diversos promotores virais, incluindo as da timidina quinase (tk) do HSV e das unidades de transcrição precoce do SV40. Estes estudos, que aumentaram devido aos trabalhos mais recentes, mostraram que os promotores são compostos por módulos funcionais discretos, cada um consistindo em aproximadamente 7 a 20 bp de ADN, e contendo um ou mais locais de reconhecimento para proteínas ativadoras ou repressoras de transcrição.

Pelo menos um módulo em cada promotor funciona para posicionar o local de início para a síntese de ARN. O melhor exemplo conhecido disso é a caixa TATA, mas em alguns promotores que não têm uma caixa TATA, tais como o promotor para o gene de transferase deoxinucleotidil terminal mamífero e o promotor para os genes tardios do SV40, um elemento discreto a cobrir o próprio local de início ajuda a arranjar o local de iniciação.

Os promotores adequados para serem utilizados em qualquer uma das unidades de transcrição incluem todos os promotores ativos nas células eucarióticas. Os exemplos de promotores eucarióticos adequados incluem o promotor do citomegalovírus humano (HCMV) precoce imediato (opcionalmente com o intensificador HCMV) (consulte, por ex., Boshart et al., *Cell*, 41:521-530 (1985)), o promotor do citomegalovírus símio (SCMV), o promotor do citomegalovírus murino (MCMV), o promotor LAP1 do vírus herpes simplex (HSV), o promotor do vírus símio 40 (SV40), o promotor do fator de alongamento 1 alfa humano, as repetições terminais longas (LTRs) retrovirais, o promotor da desmina específica das células musculares ou qualquer outro promotor ativo numa célula de apresentação de antígeno.

Além disso, os promotores eucarióticos adequados podem ser caracterizados como sendo selecionados entre promotores constitutivos, promotores induzidos, promotores específicos do tecido e outros. Os exemplos de promotores constitutivos

que não são específicos na atividade e são utilizados nos plasmídeos de ADN que codificam os antigénios selecionados incluem, sem limitação, o promotor do vírus sarcoma Rous (RSV) retroviral, o promotor LTR retroviral (opcionalmente com o intensificador RSV), o promotor SV40, o promotor de diidrofolato redutase, o promotor β -actina, o promotor de fosfoglicerol quinase (PGK) e o promotor EF1 α (Invitrogen). Os promotores induzidos que são regulados por compostos fornecidos exogenamente incluem, sem limitação, o promotor de arabinose, o promotor de metalotioneína (MT) de ovelha induzido por zinco, o promotor do vírus de tumor mamário de ratinho (MMTV) induzido por dexametasona (Dex), o sistema do promotor de polimerase T7 (WO 98110088); o promotor de inseto de ecdisona (No et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 93:3346-3351(1996)), o sistema tetraciclina-reprimível (Gossen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 89:5547-5551 (1992)), o sistema induzido por tetraciclina (Gossen et al., *Science*, 268:1766-1769, (1995), consulte igualmente Harvey et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518, (1998)), o sistema induzido por RU486 (Wang et al., *Nat. Biotech.*, 15:239-243, (1997) e Wang et al., *Gene Ther.*, 4:432-441, (1997)) e o sistema induzido por rapamicina (Magari et al., *J. Clin. Invest.*, 100: 2865-2872, (1997)).

Outros tipos de promotores induzidos que podem ser úteis nos plasmídeos de ADN da invenção são os regulados por um estado fisiológico específico, por ex. temperatura ou fase aguda ou apenas nas células de replicação. Os promotores úteis específicos do tecido incluem os promotores dos genes que codificam β -actina esquelética, cadeia leve de miosina 2A, distrofina, creatina quinase muscular, bem como os promotores musculares sintéticos com atividades mais elevadas do que os promotores que ocorrem naturalmente (consulte Li et al., *Nat Biotech.*, 17:241-245, (1999)). Os exemplos de promotores que são específicos do tecido são conhecidos para o fígado (albumina, Miyatake et

al. J. Virol., 71:5124-32 (1997); promotor principal do vírus da hepatite B, Sandig *et al.*, *Gene Ther.*, 3: 1002-9, (1996); alfafetoproteína (AFP), Arbuthnot *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 7:1503-14, (1996)), osso (osteocalcina, Stein *et al.*, *Mol. Biol. Rep.*, 24:185-96, (1997); sialoproteína óssea, Chen *et al.*, *J. Bone Miner. Res.*, 11:654-64, (1996)), linfócitos (CD2, Hansal *et al.*, *J. Immunol.*, 161:1063-8, (1988); cadeia pesada de imunoglobulina; cadeia α do recetor de células T), promotor neuronal (enolase específica do neurónio (NSE)), Andersen *et al.* *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15, (1993); gene de cadeia leve de neurofilamento, Piccioli *et al.*, *Proc. Natl. Acad Sci. EUA*, 88:5611-5, (1991); o gene *ngf* específico do neurónio, Piccioli *et al.*, *Neuron*, 15:373-84; (1995)); entre outros. Consulte, por ex., a Publicação de Patente internacional n.º WO00/55335 para obter listas adicionais de promotores conhecidos neste contexto.

E. Sinais de Poliadenilação Úteis nas Unidades de Transcrição

Os plasmídeos de ADN da invenção compreendem três unidades de transcrição e cada unidade de transcrição compreende, pelo menos, um sinal de poliadenilação. Um "sinal de poliadenilação", conforme aqui definido, refere-se a uma sequência de terminação (ou local de terminação) que termina a transcrição de uma determinada unidade de transcrição e assegura que a sequência de ácidos nucleicos que codifica um polipéptido é transcrita e traduzida corretamente. O local de terminação pode ser sintético ou de origem natural. Os exemplos de locais de terminação incluem, mas não se limitam a, um sinal de poliadenilação e um local de terminação de transcrição bidirecional sintético. Normalmente, o sinal de poliadenilação detém a transcrição de sequências de ADN.

Os sinais de poliadenilação adequados para serem utilizados em qualquer uma das unidades de transcrição

incluem todos os sinais de poliadenilação ativos nas células eucarióticas. Os exemplos de sinais de poliadenilação eucarióticos incluem um sinal de poli(A) da beta-globina de coelho, um sinal que foi caracterizado na literatura como forte (Gil e Proudfoot, *Cell* 49: 399-406 (1987); Gil e Proudfoot, *Nature* 312: 473-474 (1984)). Uma das suas características essenciais é a estrutura do respetivo elemento a jusante, que contém ambos os domínios ricos em UG e U. Outros sinais de poli A incluem poliA sintética, poli A da timidina quinase do HSV, (consulte Cole, C. N. e T. P. Stacy, *Mol. Cell. Biol.* 5:2104-2113 (1985)); poli A da alfa-globina humana, poli A do SV40 (consulte Schek; N, Cooke, C. e J. C. Alwine, *Mol. Cell Biol.* 12:5386-5393 (1992)); poli A da beta-globina humana (consulte Gil, A. e N. J. Proudfoot, *Cell* 49:399-406 (1987)); poli A do poliomavírus (consulte Batt, D. B e G. G. Carmichael *Mol. Cell. Biol.* 15: 4783-4790 (1995); poli A da hormona de crescimento bovino, (Gimmi, E. R, Reff, M. E. e I. C. Deckman, *Nucleic Acid Res.* (1989)). Muitos outros sinais de poliadenilação são conhecidos na técnica, e serão igualmente úteis nas formas de realização da invenção.

Ambos os sinais de poliadenilação precoces e tardios de SV40 são úteis nas várias formas de realização da invenção. Consulte Schek, et al., *Mol. Cell Biol.* 12:5386-5393 (1992). Estas sequências são codificadas no fragmento do par de bases 237 entre o local BamHI no nucleótido 2533 e o local BcII no nucleótido 2770 do genoma do SV40 (Carswell e Alwine, *Mol. Cell. Biol.* 9:4248; 1989). Carswell e Alwine concluíram que, dos dois sinais de poliadenilação do SV40, o sinal tardio foi mais eficaz, mais provavelmente porque compreende os elementos de sequência a jusante e a montante que facilitam uma clivagem e poliadenilação eficazes.

Os locais de poliadenilação adicionais podem ser identificados ou construídos utilizando métodos conhecidos

na técnica. Um local de poliadenilação mínimo é composto por AAUAAA, e uma segunda sequência de reconhecimento, geralmente uma sequência rica em G/U, encontrou cerca de 30 nucleótidos a jusante. Conforme aqui utilizado, as sequências são apresentadas como ADN, em vez de ARN, para facilitar a preparação de ADNs adequados para a incorporação em vetores de expressão. Quando apresentado como ADN, o local de poliadenilação é composto por AATAAA com, por exemplo, uma região rica em G/T a jusante. Ambas as sequências têm de estar presentes para formar um local de poliadenilação eficaz. A finalidade destes locais é recrutar proteínas de ligação de ARN específicas para o ARN. O AAUAAA liga o fator de especificidade de poliadenilação de clivagem (CPSF; Murthy K. G. e Manley J. L. (1995), *Genes Dev* 9:2672-2683), e o segundo local, frequentemente uma sequência G/U, liga ao fator estimulante de clivagem (CstF; Takagaki Y. e Manley J. L. (1997) *Mol Cell Biol* 17:3907-3914). O CstF é composto por diversas proteínas, mas a proteína responsável para a ligação de ARN é CstF-64, um membro da família de domínio de ribonucleoproteína das proteínas (Takagaki et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci EUA* 89:1403-1407).

F. Portadores, Diluentes, Agentes Facilitadores, Adjuvantes e Formulações Úteis para as Composições Imunogénicas desta Invenção

Os plasmídeos de ADN e as composições imunogénicas úteis nesta invenção compreendem ainda um portador, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável. Numa forma de realização, o referido diluente farmacêuticamente aceitável é água esterilizada, salina isotónica esterilizada ou um tampão biológico. As composições antigénicas também podem ser misturadas com esses diluentes ou portadores de um modo convencional. Conforme aqui utilizado, o termo "portador farmacêuticamente aceitável" pretende incluir todos e quaisquer solventes, meios de

dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de adiamento de absorção e isotônicos, e afins, compatíveis com a administração em seres humanos ou outros hospedeiros vertebrados. O portador apropriado é evidente para os peritos na técnica e dependerá, em grande parte, da via de administração.

Contudo, os excipientes adicionais que podem estar presentes nas composições imunogénicas desta invenção são adjuvantes, agentes facilitadores, conservantes, agentes tensioativos e agentes de dispersão, de suspensão ou estabilizadores químicos. Normalmente, os estabilizadores, adjuvantes e conservantes são otimizados para determinar a melhor formulação para a eficácia nos pacientes humanos ou veterinários.

1. Adjuvantes

Um adjuvante é uma substância que melhora a resposta imunitária quando administrado em conjunto com um imunogénio ou antigénio. Diversas citocinas ou linfocinas mostraram ter atividade de modulação imunitária e, portanto, podem ser utilizadas como adjuvantes, incluindo, mas não se limitando a, interleucinas 1- α , 1- β , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (consulte, por ex., a Patente U.S. n.º 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 e 18 (e respectivas formas mutantes), interferões- α , β e γ , fator estimulador de colónias de macrófagos-granulócitos (consulte, por ex., a Patente U.S. n.º 5.078.996 e o Número de Acesso ATCC 39900), fator estimulador de colónias de macrófagos (MCSF), fator estimulador de colónias de granulócitos (GCSF) e fatores de necrose tumoral α e β (TNF). Todavia, outros adjuvantes úteis nesta invenção incluem uma quimocina, incluindo, sem limitação, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES. As moléculas de aderência, tais como uma seletina, por ex., L-seletina, P-seletina e E-seletina, também podem ser úteis como adjuvantes. Não obstante, outros adjuvantes úteis incluem, sem limitação, uma molécula tipo mucina, por ex.,

CD34, GlyCAM-1 e MadCAM-1, um membro da família de integrinas, tal como LFA-1, VLA-1, Mac-1 e p150.95, um membro da superfamília de imunoglobulinas, tal como PECAM, ICAMs, por ex., ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, CD2 e LFA-3, moléculas coestimulantes, tais como CD40 e CD40L, fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento vascular, fator de crescimento do nervo, fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento epidérmico, B7.1, B7.2, PDGF, BL-1 e fator de crescimento endotelial vascular, moléculas recetoras, incluindo Fas, recetor TNF, Fit, Apo-1. p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2 e DR6. Contudo, outra molécula adjuvante inclui Caspase (ICE). Consulte igualmente as Publicações de Patentes internacionais n.ºs. WO98/177 e WO99/43839, aqui incorporadas por motivos de consulta.

Numa forma de realização, o adjuvante desejado é a proteína IL-12, que é expressa a partir de um plasmídeo. Consulte, por ex., as Patentes US n.ºs 5.457.038; 5.648.467; 5.723.127 e 6.168.923, aqui incorporadas por motivos de consulta. Numa forma de realização, a citocina pode ser administrada como uma proteína. Numa determinada forma de realização, IL-12 é expressa a partir de uma ou duas das três unidades de transcrição do plasmídeo de ADN da invenção. Em alternativa, IL-12 é expressa independentemente a partir de um plasmídeo separado. Noutra forma de realização, é administrado um plasmídeo que codifica e expressa IL-15 em vez de um plasmídeo que codifica e expressa IL-12.

Os adjuvantes adequados utilizados para melhorar uma resposta imunitária incluem, sem limitação, MPL™ (monofosforil lípido A 3-O-desacilado; Corixa, Hamilton, MT), que é descrito na Patente U.S. n.º 4.912.094, aqui incorporada por motivos de consulta. Igualmente adequados para serem utilizados como adjuvantes são os análogos

sintéticos de lípido A ou os compostos de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP), ou derivados ou análogos dos mesmos, que estão disponíveis em Corixa (Hamilton, MT), e que são descritos na Patente US n.º 6.113.918, aqui incorporada por motivos de consulta. Um desses AGP é 2-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoylamino] etil 2-Deoxi-4-O-fosfono-3-O[(R)3-tetradecanoioxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoil-amino]-b-D-glucopiranosida, que é igualmente conhecido como 529 (antigamente conhecido como RC529). Este adjuvante 529 é formulado como uma forma aquosa ou como uma emulsão estável.

Todavia, outros adjuvantes incluem óleo mineral e emulsões de água, sais de alumínio (alum), tais como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, etc., anfigénio, avridina, L121/esqualeno, D-láctide-poliláctide/glicósido, polióis plurónicos, muramil dipéptido, *Bordetella* destruída, saponinas, tais como Stimulon™ QS-21 (Antigénicos, Framingham, MA.), descritos na Patente U.S. n.º 5.057.540, aqui incorporada por motivos de consulta, e partículas geradas daí, tais como ISCOMS (complexos imunoestimuladores), *Mycobacterium tuberculosis*, lipopolissacáridos bacterianos, polinucleótidos sintéticos, tais como oligonucleótidos que contêm um motivo CpG (Patente U.S. n.º 6.207.646, aqui incorporada por motivos de consulta), a toxina pertussis (PT) ou uma toxina lábil ao calor (LT) da *E. coli*, particularmente LT-K63, LT-R72, PT-K9/G129; consulte, por ex., as Publicações de Patentes internacionais n.ºs WO 93/13302 e WO 92/19265, aqui incorporadas por motivos de consulta.

Igualmente úteis como adjuvantes são as toxinas de cólera e mutantes das mesmas, incluindo as descritas no Pedido de Patente internacional publicado n.º WO 00/18434 (em que o ácido glutâmico na posição de aminoácido 29 é substituído por outro aminoácido (que não o ácido aspártico), preferencialmente uma histidina). As toxinas CT

semelhantes ou mutantes são descritos no Pedido de Patente internacional publicado n.º WO 02/098368 (em que a isoleucina na posição de aminoácido 16 é substituída por outro aminoácido, sozinha ou em conjunto com a substituição da serina na posição de aminoácido 68 por outro aminoácido; e/ou em que a valina na posição de aminoácido 72 é substituída por outro aminoácido). Outras toxinas CT são descritas no Pedido de Patente internacional publicado n.º WO 02/098369 (em que a arginina na posição de aminoácido 25 é substituída por outro aminoácido; e/ou um aminoácido é inserido na posição de aminoácido 49; e/ou dois aminoácidos são inseridos nas posições de aminoácido 35 e 36).

Em algumas formas de realização, o ADN de plasmídeo que codifica um adjuvante pode ser administrado numa composição imunogénica. Nesses casos, um adjuvante cujo ADN é inserido num plasmídeo para inclusão nas composições imunogénicas da invenção inclui, mas não se limita a, interleucina-1 (IL-1), IL-5, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- α , TNF- β e BL-1 (conforme descrito no Pedido de Patente internacional publicado WO 98/17799); B7.2 (conforme descrito no Pedido de Patente internacional publicado WO 00/51432); IL-8, RANTES, G-CSF, IL-4, IL-18 mutante, IL-7, TNF-R (conforme descrito no Pedido de Patente internacional publicado WO 99/43839); e CD80 mutante (conforme descrito no Pedido de Patente internacional publicado WO 00/66162). Conforme aqui utilizado, o termo "proteína IL-12" refere-se a uma ou ambas as subunidades IL-12 humanas, incluindo as proteínas IL-12 de cadeia única, nas quais as duas subunidades são codificadas por uma única sequência de codificação e expressas como uma única proteína contendo sequências de um ligante que ligam as duas subunidades.

Numa forma de realização particular, a citocina é administrada como uma composição de ácido nucleico que compreende uma sequência de ADN que codifica a citocina sob o controlo de sequências reguladoras que orientam a

expressão da mesma numa célula mamífera. Ainda noutra forma de realização, o plasmídeo de expressão da citocina é administrado com o plasmídeo de ADN que codifica os antigénios selecionados numa composição imunogénica. Ainda noutra forma de realização, a citocina é administrada entre as administrações de uma composição imunogénica de sensibilização e uma composição imunogénica de reforço. Noutra forma de realização ainda, a citocina é administrada com a etapa de reforço. Ainda noutra forma de realização, a citocina é administrada com ambas as composições de sensibilização e reforço.

Em determinadas formas de realização da invenção, o ADN CpG pode ser incluído no plasmídeo como um adjuvante. Conforme aqui utilizado, o ADN CpG refere-se a um oligonucleótido que contém, pelo menos, uma molécula de ácido nucleico de dinucleótidos CpG não metilados, que contém uma sequência de dinucleótidos de citosina-guanina não metilados (ou seja, "ADN CpG") ou ADN contendo uma 5' citosina seguida de 3' guanosina e ligada por uma ligação de fosfato), e ativa o sistema imunitário. Consulte a Patente U.S. 6.406.705 de Davis *et al.* e a Patente U.S. n.º 6.207.646 de Krieg *et al.*, aqui incorporadas totalmente por motivos de consulta. O ADN CpG de ADN bacteriano, mas não ADN vertebrado, tem efeitos imunoestimulantes diretos nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) *in vitro*. Esta ativação de linfócitos deve-se aos dinucleótidos CpG não metilados, que estão presentes na frequência esperada no ADN bacteriano (1/16), mas estão sub-representados (supressão CpG, 1/50 a 1/60) e metilados no ADN de vertebrado. Foi sugerido que a ativação imune rápida em resposta ao ADN CpG pode ter evoluído como um componente dos mecanismos de defesa imune inatos que reconhecem os padrões estruturais específicos das moléculas microbianas. Consulte a Patente U.S. 6.406.705 de Davis *et al.* e a Patente U.S. n.º 6.207.646 de Krieg *et al.*, aqui

incorporadas totalmente por motivos de consulta.

Em determinadas formas de realização, é administrada ao paciente uma combinação de adjuvantes, em que a combinação de adjuvantes inclui, pelo menos, um oligonucleótido que contém, pelo menos, um dinucleótido de ADN CpG não metilado e, pelo menos, um adjuvante de ácido não nucleico, tal como IL-12.

2. Agentes Facilitadores ou Coagentes

As composições imunogénicas compostas por moléculas de polinucleótidos contêm preferencialmente excipientes opcionais, tais como agentes facilitadores ou “coagentes” de transfeção de polinucleótidos, tais como uma anestesia local, um péptido, um lípido, incluindo lípidos catiónicos, um lipossoma ou partícula lipídica, uma policação, tal como polililisina, uma policação tridimensional ramificada, tal como um dendrímero, um hidrato de carbono, um anfifilo catiónico, um detergente, um tensioativo de benzilamónio, ou outro composto que facilite a transferência de polinucleótidos para as células. Um agente facilitador inclui a anestesia local bupivacaína ou tetracaína (consulte as Patentes U.S. n.ºs. 5.593.972; 5.817.637; 5.380.876; 5.981.505 e 6.383.512 e a Publicação de Patente internacional n.º W098/17799, aqui incorporadas por motivos de consulta). Outros exemplos não exclusivos desses agentes facilitadores ou coagentes úteis nesta invenção são descritos nas Patentes U.S. n.ºs 5.703.055; 5.739.118; 5.837.533; Publicação de Patente internacional n.º W096/10038, publicada a 4 de abril de 1996; e Publicação de Patente internacional n.º W094/1673, publicada a 8 de agosto de 1994, aqui incorporadas por motivos de consulta.

Mais preferencialmente, o agente facilitador de transfeção está presente numa quantidade que forma um ou mais complexos com as moléculas de ácido nucleico. Quando o agente facilitador de transfeção é misturado com moléculas de ácido nucleico ou plasmídeos desta invenção, o mesmo

forma uma variedade de pequenos complexos ou partículas que juntam o ADN e são homogêneos. Por conseguinte, numa forma de realização das composições imunogénicas desta invenção, os complexos são formados misturando o agente facilitador de transfeção e, pelo menos, um plasmídeo desta invenção.

Numa forma de realização particular, uma composição imunogénica da invenção pode ser composta por mais de um tipo de plasmídeo. Em alternativa, noutra forma de realização das composições da invenção, o agente facilitador de transfeção pode ser pré-misturado com cada plasmídeo separadamente. Em seguida, as misturas separadas são combinadas numa única composição para assegurar que a proporção desejada dos plasmídeos está presente numa única composição imunogénica, se for pretendido administrar todos os plasmídeos numa única administração em bolo. Em alternativa, o agente facilitador de transfeção e cada plasmídeo podem ser misturados e administrados separadamente para obter a proporção desejada.

Doravante, o termo "complexo" ou "um ou mais complexos" ou "complexos" é utilizado para definir esta forma de realização da composição imunogénica, e parte-se do princípio de que o termo abrange um ou mais complexos. Cada complexo contém um plasmídeo. Preferencialmente, os complexos têm um diâmetro entre cerca de 50 e cerca de 150 nm. Quando o agente facilitador utilizado for uma anestesia local, de preferência bupivacaína, é preferida uma quantidade entre cerca de 0,1 por cento em peso e cerca de 1,0 por cento em peso com base no peso total da composição de polinucleótidos. Consulte igualmente a Publicação de Patente internacional n.º W099/21591, aqui incorporada por motivos de consulta e que explica a incorporação de tensioativos de benzilamónio como coagentes, preferencialmente administrados numa quantidade entre cerca de 0,001 a 0,03% em peso. De acordo com a presente invenção, a quantidade de anestesia local está presente

numa proporção com as referidas moléculas de ácido nucleico de cerca de 0,01 a 2,5% de volume de peso de anestesia local e cerca de 1 a 10 µg/ml de ácido nucleico. Outro intervalo é entre cerca de 0,05 a 1,25% de volume de peso de anestesia local e cerca de 100 µg/ml a 1 mg/ml de ácido nucleico.

3. Outros Aditivos para as Composições Imunogénicas

É possível incluir outros excipientes nas composições imunogénicas desta invenção, incluindo conservantes, ingredientes estabilizadores, agentes tensioativos, e afins.

Os conservantes exemplares adequados incluem clorobutanol, sorbato de potássio, ácido sórbico, dióxido de enxofre, galato de propilo, os parabenos, vanilina de etilo, glicerina, fenol e paraclorofenol.

Os ingredientes estabilizadores adequados que podem ser utilizados incluem, por exemplo, ácidos casamino, sacarose, gelatina, fenol vermelho, amina N-Z, difosfato de monopotássio, lactose, hidrolisado de lactalbumina e leite em pó.

As substâncias tensioativas adequadas incluem, sem limitação, adjuvante incompleto de Freund, análogos de quinona, hexadecilamina, octadecilamina, ésteres de aminoácido de octadecilo, lisolecitina, brometo de dimetildioctadecilamónio, metoxihexadecilglicerol e polióis plurónicos; poliaminas, por ex., pirano, dextransulfato, poli IC, carbopol; péptidos; por ex., muramil péptido e dipéptido, dimetilglicina, tuftsina; emulsões de óleo; e geles minerais, por ex., fosfato de alumínio, etc. e complexos estimuladores imunes (ISCOMS). Os plasmídeos também podem ser incorporados nos lipossomas para serem utilizados como uma composição imunogénica. As composições imunogénicas podem conter igualmente outros aditivos adequados para o modo de administração selecionado da composição imunogénica. A composição imunogénica da

invenção também pode envolver polinucleótidos liofilizados, que podem ser utilizados com outros excipientes farmacologicamente aceitáveis para desenvolver formas de dosagem em pó, líquidas ou de suspensão. Consulte, por ex., Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Vol. 2, 19ª edição (1995), por ex., Capítulo 95 Aerossóis; e a Publicação de Patente internacional n.º WO99/45966, cujas explicações são aqui incorporadas por motivos de consulta.

Essas composições imunogénicas podem conter aditivos adequados para a administração através de qualquer via convencional de administração. Em algumas formas de realização, a composição imunogénica da invenção é preparada para a administração em pacientes humanos na forma de, por exemplo, líquidos, pós, aerossóis, pastilhas, cápsulas, pastilhas ou cápsulas de revestimento entérico ou supositórios. Por conseguinte, as composições imunogénicas também podem incluir, mas não se limitam a, suspensões, soluções, emulsões em veículos oleosos ou aquosos, pastas e formulações biodegradáveis ou de libertação prolongada implantável. Numa forma de realização da invenção, as composições imunogénicas são preparadas como uma formulação para administração parentérica, o ingrediente ativo é fornecido na forma seca (ou seja, em pó ou granular) para a reconstituição com um veículo adequado (por ex., água esterilizada isenta de pirogénio) antes da administração parentérica da composição reconstituída. Outras formulações de administração parentérica úteis incluem as que compreendem o ingrediente ativo na forma microcristalina, numa preparação lipossomal, ou como um componente de um sistema de polímero biodegradável. As composições para a implantação ou libertação prolongada podem compreender materiais hidrofóbicos ou poliméricos farmacologicamente aceitáveis, tais como uma emulsão, uma resina de troca de iões, um polímero moderadamente solúvel ou um sal moderadamente solúvel.

As composições imunogénicas da presente invenção não são limitadas pela seleção dos excipientes, diluentes e portadores convencionais fisiologicamente aceitáveis, tais como solventes, tampões, adjuvantes, agentes facilitadores ou outros ingredientes úteis nas preparações farmacêuticas dos tipos descritos acima. A preparação destas composições farmacêuticamente aceitáveis, a partir dos componentes descritos acima, com isotonicidade de pH apropriada, estabilidade e outras características convencionais faz parte do âmbito da técnica.

F. Dosagens e Vias de Administração, Eletroporação para Composições Imunogénicas

Em geral, a seleção da dosagem ou "quantidade eficaz" apropriada para os componentes das composições imunogénicas da presente invenção basear-se-á igualmente na identidade dos antígenos selecionados nas composições imunogénicas utilizadas, bem como na condição física do paciente, mais especialmente incluindo a saúde geral, a idade e o peso do paciente imunizado. O método, as vias de administração e a presença de componentes adicionais nas composições imunogénicas também podem afetar as dosagens e quantidades das composições de plasmídeo de ADN. Essa seleção e o ajuste ascendente ou descendente da dose eficaz faz parte do âmbito da técnica. A quantidade de plasmídeo necessária para induzir uma resposta imunitária, preferencialmente uma resposta protetora, ou produzir um efeito exógeno no paciente sem efeitos secundários adversos significativos varia consoante estes fatores. As doses adequadas são facilmente determinadas pelos peritos na técnica.

As composições imunogénicas desta invenção são administradas num vertebrado humano ou não humano através de diversas vias, incluindo, mas não se limitando a, intranasal, oral, vaginal, retal, parentérica, intradérmica, transdérmica (consulte, por ex., a Publicação de patente internacional n.º WO 98/20734, aqui incorporada

por motivos de consulta), intramuscular, intraperitoneal, subcutânea, intravenosa e intra-arterial. A via apropriada é selecionada dependendo da natureza da composição imunogénica utilizada, e de uma avaliação da idade, do peso, do sexo e da saúde geral do paciente e dos antígenos presentes na composição imunogénica, bem como dos fatores semelhantes, efetuada por um médico assistente.

A ordem da administração da composição imunogénica e os períodos de tempo entre as administrações individuais podem ser selecionados pelo médico assistente ou um perito na técnica com base nas características físicas e respostas precisas do hospedeiro à aplicação do método. Essa otimização é considerada conveniente no âmbito da técnica.

Noutra forma de realização, é fornecido um método para coexpressar numa única célula, *in vivo*, uma, duas ou três grelhas de leitura abertas de produtos de gene diferenciados, que compreende a introdução de cerca de 0,1 µg a cerca de 100 mg de um polinucleótido no tecido do mamífero.

As composições imunogénicas podem ser administradas e a absorção dos plasmídeos melhorou através da utilização da eletroporação no momento da administração. Para efetuar a eletroporação, os elétrodos são colocados cerca de 1 a 4 mm afastados, junto da área onde o polinucleótido é injetado. A conceção ou posição exata dos elétrodos pode variar desde que a corrente possa passar através das fibras musculares na perpendicular à respetiva direção na área do polinucleótido injetado. Consulte a Patente US n.º 5.273.525 de G. A. Hofmann; a Patente US n.º 5.869.326 de G. A. Hofmann; a Patente US n.º 5.993.434 de S. B. Dev, *et al.*; a Patente US n.º 6.014.584 de G. A. Hofmann, *et al.*; a Patente US n.º 6.068.650 de G. A. Hofmann, *et al.*; a Patente US n.º 6.096.020 de G.A. Hofmann; a Patente US n.º 6.233.482 de G.A. Hofmann, *et al.*; a Patente US n.º 6.241.701 de G.A. Hofmann; a Patente US n.º 6.418.341 de

G.A. Hofmann, *et al.*; a Patente US n.º 6.451.002 de S.B. Dev, *et al.*; a Patente US n.º 6.516.323 de G.A. Hofmann; a Patente US n.º 6.763.264 de G.A. Hofmann; a Patente US n.º 6.110.161 de I. Mathiesen, *et al.*; todas incorporadas totalmente por motivos de consulta.

Assim que os elétrodos estiverem na devida posição, o músculo é eletroporado ou estimulado eletricamente. A estimulação é fornecida como um impulso com uma amplitude e duração predeterminadas. Para otimizar a eficácia de transfeção, os parâmetros de duração de impulso, tensão, capacitância, intensidade do campo, número, tipo de onda podem variar e a eficácia de transfeção pode ser comparada. Os impulsos elétricos são campos elétricos pulsados aplicados através de eletroporação. O impulso pode ser unipolar, bipolar, exponencial ou em forma de onda quadrada. As tensões variam entre aproximadamente 0 e 1000 volts; as durações de impulso variam entre 5 microssegundos e 5 milissegundos; o número de impulsos varia entre um único impulso e 30.000 impulsos; e a frequência de impulsos nas séries varia entre 0,5 Hz e 1000 Hz. Os intervalos úteis para a intensidade do campo variam entre cerca de 25 V/cm e cerca de 800 V/cm. Os impulsos elétricos considerados para serem utilizados na prática da presente invenção incluem os impulsos de duração e tensão suficientes para causar a eletroporação. Consulte Hofmann, G. A. *Cells in electric fields* em E. Neumann, A. E. Sowers, & C. A. Jordan (Eds.), *Electroporation and electrofusion in cell biology* (págs. 389 a 407) Plenum Publishing Corporation (1989).

G. Componentes do Kit

Ainda noutra forma de realização, a presente invenção fornece um kit farmacêutico para a fácil administração de um regime imunogénico, profilático ou terapêutico para o tratamento de qualquer uma das doenças ou condições referidas acima para as quais é aconselhável uma resposta

imunitária a um antígeno selecionado. Este kit foi concebido para ser utilizado num método de indução de um nível elevado de resposta imunitária específica do antígeno num paciente vertebrado ou mamífero. O kit contém, pelo menos, uma composição imunogénica que compreende um plasmídeo de ADN que compreende três unidades de transcrição que codificam um conjunto de antígenos ou péptidos selecionados. Podem ser fornecidas múltiplas dosagens pré-embaladas das composições imunogénicas no kit para múltiplas administrações.

Uma vez que as composições imunogénicas descritas acima que compreendem um plasmídeo de ADN não expressam igualmente uma citocina ou outro adjuvante, tal como IL-12, o kit também contém opcionalmente uma composição de citocina/adjuvante separada ou múltiplas dosagens pré-embaladas da composição de citocina/adjuvante para múltiplas administrações. Geralmente, estas composições de citocina são composições de ácido nucleico que compreendem uma sequência de ADN que codifica a citocina selecionada sob o controlo de sequências reguladoras que orientam a expressão da mesma numa célula de mamífero ou vertebrado. Outros adjuvantes podem ser opcionalmente fornecidos num frasco pré-embalado como uma solução, líquido ou sólido.

O kit contém igualmente instruções para utilizar as composições imunogénicas num método de sensibilização/reforço. Os kits também podem incluir instruções para efetuar determinados ensaios, vários portadores, excipientes, diluentes, adjuvantes e afins acima mencionados, bem como aparelhos para as administrações das composições, tais como seringas, dispositivos de pulverização, etc. Outros componentes podem incluir luvas descartáveis, instruções de descontaminação, varetas de aplicador ou recipientes, entre outras composições.

Para esta invenção ser melhor compreendida, são

apresentados os seguintes exemplos. Os exemplos têm apenas fins ilustrativos e não devem ser interpretados como sendo limitativos do âmbito da invenção. Todos os documentos, publicações e patentes citados nos exemplos seguintes são aqui incorporados por motivos de consulta.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Seleção e Modificação de genes de VIH

Um perito na técnica irá perceber que as informações de sequência de muitos vírus e bactérias estão disponíveis na técnica. Mais particularmente, as informações de sequência podem ser utilizadas para clonar genes para utilizar na expressão de polipéptidos nos plasmídeos da invenção. As informações sobre muitas sequências de VIH e outros agentes patogénicos estão disponíveis na base de dados de sequências de VIH no Laboratório Nacional de Los Alamos e no Centro Nacional de Informação Biotecnológica na Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos, (8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894).

Numa forma de realização da invenção, os seguintes genes de VIH foram selecionados para inclusão num único plasmídeo de ADN exemplar que expressa a maior parte do genoma de VIH: gene gag do isolado HXB2 e o gene pol do isolado HXB2. A sequência HXB2 completa é listada na base de dados do computador do GenBank com o número de acesso K03455. Os genes nef, tat e vif derivam do isolado NL4-3. A sequência NL4-3 completa é listada na base de dados do computador do GenBank com o número de acesso M19921. O gene envelope de VIH deriva de um isolado primário 6101 obtido pelo Dr. David Montefiore. A sequência envelope de VIH completa é listada na base de dados do computador do GenBank com os números de acesso AY612855 e bankit625244.

Para permitir a inclusão da maior parte do genoma de VIH num único plasmídeo de expressão, as fusões de gene foram preparadas utilizando genes gag-pol completos e genes nef-tat-vif quase completos. Além disso, foi removido o

local de clivagem de protéase entre os genes gag e pol. Todos os genes de VIH utilizados nas formas de realização desta invenção foram otimizados relativamente ao ARN (sequência modificada) para obter uma expressão de proteínas de nível elevado. Consulte as Patentes US n.ºs 5.965.726; 5.972.596; 6.174.666; 6.291.664; e 6.414.132.

Em alternativa, os genes de VIH podem ser otimizados de acordo com os métodos fornecidos no Pedido de Patente US n.º 60/576.819, apresentado a 4 de junho de 2004. De acordo com este método, a expressão de genes é melhorada através da substituição de determinados codões de tipo selvagem por codões "suplentes". A sequência melhorada do polinucleótido é determinada através da seleção de codões suplentes adequados. Os codões suplentes são selecionados para alterar o conteúdo A e T (ou A e U no caso de ARN) do gene que ocorre naturalmente (tipo selvagem). Os codões suplentes são os que codificam os aminoácidos alanina, arginina, ácido glutâmico, glicina, isoleucina, leucina, prolina, serina, treonina e valina. Por conseguinte, a sequência de ácidos nucleicos modificada tem codões suplentes para cada um destes aminoácidos em toda a sequência. Para os restantes 11 aminoácidos, não são efetuadas nenhuma alteração, deixando assim os codões correspondentes que ocorrem naturalmente no devido lugar.

As técnicas padrão foram utilizadas para modificar os genes de VIH acima de modo a melhorar a respetiva segurança e otimizar a respetiva expressão. Consulte Sambrook J, Fritsch EF e Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY. (1989). Por exemplo, as seguintes modificações genéticas foram utilizadas para melhorar a segurança (ou seja, através da inativação das enzimas virais) e maximizar a largura dos genes de VIH incluídos num vetor subsequente:

- 1) Foram criadas poliproteínas de fusão de gag-pol de

VIH-1 numa única grelha de leitura aberta através da remoção do terminador gag e do iniciador pol dos respectivos genes, e as mutações foram introduzidas na região *frameshift* (de deslocação da grelha) de tipo selvagem para eliminar a formação de duas proteínas individuais. Neste exemplo de uma construção de fusão, a sequência TTTTTT "duvidosa" *frameshift* (SEQ. ID N.º 2) no gag-pol de tipo selvagem foi alterada para cTTcTg (SEQ. ID N.º 3). Para obter informações sobre como construir um gene de fusão gag-pol, consulte Megede, J. Z. et al. *J. Virology* 77:6197-6207 (2003), cuja divulgação é aqui incorporada totalmente por motivos de consulta. A proteína de fusão gag-pol de tipo selvagem contém um polipéptido de grelha de leitura aberta de aminoácido 56 sem qualquer função, o que separa os genes gag e pol. Para minimizar o tamanho global da presente construção, a poliproteína gag, que tem os últimos quatro resíduos (Lys-Gly-Arg-Pro) (SEQ. ID N.º 4), foi modificada de modo a ser seguida por uma região intergénica de dez aminoácidos reduzida (Asp-Arg-Gln-Gly-Thr-Val-Ser-Phe-Asn-Phe) (SEQ. ID N.º 5). Os primeiros quatro resíduos da poliproteína pol mantêm-se (Pro-Gln-Ile-Thr) (SEQ. ID N.º 6). Não foram efetuados quaisquer desvios das regiões de codificação de tipo selvagem dos genes gag e pol para facilitar a expressão no plasmídeo com unidade de transcrição tripla.

2) Toda a atividade proteolítica da protéase de VIH-1 foi tornada inativa através da eliminação dos nucleótidos que codificam três aminoácidos do local ativo (Asp-Thr-Gly de 25-27). Consulte Loeb et al. *Nature*, 340:397 (1989); Wu et al. *J Virol*, 70: 3378 (1996).

3) A transcriptase reversa (RT) foi tornada inativa através da eliminação dos nucleótidos que codificam os seguintes quatro aminoácidos: Tyr 183, Met 184, Asp 185, Asp 186. Consulte Larder et al., *Nature*, 327: 716-717 (1987); Larder et al. *PNAS*, 86: 4803-4807 (1989).

4) A atividade do RNase foi abolida através da eliminação dos nucleótidos que codificam um único aminoácido: glu 478. Consulte Davies *et al.*, *Science*, 252:88-95 (1991); Schatz *et al.* 1989, *FEBS lett.* 257:311-314 (1989).

5) A função integrase foi abolida através da eliminação dos nucleótidos que codificam os seguintes três aminoácidos: Asp 626, Asp 678 e Glu 714. Consulte Wiskerchen *et al.* *J. Virol*, 69: 376-386 (1995); Leavitt *et al.* *J. Biol. Chem.*, 268: 2113-2119 (1993).

6) Foi criado uma única grelha de leitura aberta para os genes nef, tat e vif de VIH-1 através da fusão das seguintes regiões de codificação *in frame* (na grelha) (resíduos de aminoácido nef 4-206; resíduos de aminoácido tat 2-80; resíduos de aminoácido vif 2-192) para codificar uma única poliproteína. Esta poliproteína é referida como nef-tat-vif ou ntv.

7) Como uma precaução de segurança, as proteínas nef e tat foram tornadas inativas através da remoção do sinal de miristoilação (resíduos 1-3, MGG) de nef e a deleção de duas cisteínas (C30 e C34) de tat.

Exemplo 2. Construção de Plasmídeos com Unidade de Transcrição Única, Dupla e Tripla

Os plasmídeos descritos nestes exemplos são apresentados nos Quadros 1 e 2.

Uma cassette de expressão de unidade de transcrição tripla foi construída através da utilização de uma variedade de componentes num plasmídeo de ADN de cadeia dupla circular. Consulte a Figura 1. O primeiro componente é uma primeira unidade de transcrição para expressar polipéptidos nas células eucarióticas, composta pelo promotor do citomegalovírus símio (SCMV), um local de clonagem e um sinal de poli-A da hormona de crescimento bovino (BGH). O segundo componente é uma segunda unidade de transcrição para expressar polipéptidos nas células

eucarióticas, que consiste no promotor do citomegalovírus humano (HCMV) precoce imediato, num local de clonagem e no sinal de poliadenilação (poliA) do SV40. A separação da primeira e segunda unidades de transcrição é a região de separador 1. O terceiro componente é uma terceira unidade de transcrição para expressar polipéptidos nas células eucarióticas composta pelo promotor Lap 1 do vírus herpes simplex, o dador/aceitador de splice SV40, um local de clonagem e um sinal de poli-A da beta-globina de coelho. Consulte Goins W.F. et al., *J. Virology* 68:2239-2252 (1994); Soares, K. J. et al., *Virology* 70:5384-5394; Goins W.F. et al., *J. Virology* 73:519-532 (1999). A separação da segunda e terceira unidades de transcrição é a região de separador 2. Um gene de resistência à canamicina (km^r) bacteriano quimérico, transferase adenilil 4'-nucleotidil tipo 1a, é igualmente incluído com a região de separador 2. Consulte Shaw KJ, et al., *Microbiol. Reviews* 57: 138-163 (1993) e Sadale, Y, et al., *J. Bacteriol.* 141: 1178-1182 (1980). Este gene foi imaginado para conferir resistência para um número limitado de aminoglicósidos enquanto permite a seleção de bactérias que contêm o plasmídeo. A separação da terceira e primeira unidades de transcrição é a região de separador 3. A região de separador 3 inclui uma origem bacteriana de replicação pUC necessária para a propagação do plasmídeo nas bactérias.

Exemplo 3. Plasmídeo com Unidade de Transcrição Tripla Contendo Seis Genes de VIH

Como uma demonstração da utilização dos vetores de ADN de plasmídeo com três unidades de transcrição, foi criado um vetor de plasmídeo capaz de coexpressar três grelhas de leitura abertas eucarióticas. O vetor de ADN de plasmídeo com três unidades de transcrição foi criado através da inserção dos seguintes genes selecionados que codificam antígenos de VIH-1 na cassete de expressão de unidade de transcrição tripla descrita no Exemplo 2. Todas as técnicas

de clonagem foram efetuadas seguindo procedimentos convencionais (Sambrook *et al.* 1989).

Primeiro, um gene de fusão gag-pol de VIH-1 foi inserido no local de clonagem PmeI-XhoI entre o SCMV e os locais de poli-A da BGH da primeira unidade de transcrição. O gene gag deriva do isolado HXB2, bem como o gene pol. A sequência HXB2 completa é listada na base de dados do computador do GenBank com o número de acesso K03455. Um perito na técnica compreenderá que outros genes gag e pol de VIH-1 de outras espécies ou outros genes virais ou bacterianos podem ser inseridos de um modo semelhante. As informações de sequências sobre VIH e outros agentes patogénicos estão disponíveis na base de dados de sequências de VIH no Laboratório Nacional de Los Alamos e no Centro Nacional de Informação Biotecnológica na Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894.

Em seguida, um gene envelope completo (gp160) derivado de um isolado primário (6101) de VIH-1 foi inserido no local de clonagem MluI entre o HCMV e os locais de poli-A do SV40 da segunda unidade de transcrição eucariótica. A sequência envelope 6101 pode ser obtida na base de dados do computador do GenBank com os números de acesso AY612855 e bankit625244.

Finalmente, uma construção de genes que codifica uma proteína de fusão nef-tat-vif (NTV) de VIH, que incluía resíduos nef 4-206 fundidos com resíduos tat 2-80 e fundidos com resíduos vif 2-192, foi inserida no local de clonagem KpnI-EcoRV entre os sinais de poli-A da beta-globina de coelho e do promotor HSVLap1. Os genes nef, tat e vif derivam do isolado NL4-3 de VIH-1. A sequência NL4-3 de VIH-1 completa é listada na base de dados do computador do GenBank com o número de acesso M19921.

Por conseguinte, conforme construído, a grelha de leitura aberta gag-pol foi colocada sob o controlo do

promotor SCMV e dos locais de poli-A da BGH na primeira unidade de transcrição; a grelha de leitura aberta envelope foi colocada sob o controlo do promotor HCMV e dos sinais de poli-A do SV40 na segunda unidade de transcrição eucariótica; e a grelha de leitura aberta de fusão nef-tat-vif foi colocada sob o controlo do intrão Lap1/SV40 HSV e dos sinais de poli-A da beta-globina de coelho na terceira unidade de transcrição eucariótica.

Exemplo 4. Expressão de Genes de VIH de Plasmídeos com Unidade de Transcrição Única, Dupla e Tripla

Materiais e Métodos: Células e Transfeção

O plasmídeo que expressa seis genes de VIH descrito no Exemplo 3 foi avaliado *in vitro* relativamente à capacidade de expressar as proteínas codificadas. As células utilizadas para todos os estudos de expressão *in vitro* foram as células 293 e as células RD obtidas a partir da ATCC (Coleção Americana de Culturas Celulares). O procedimento para expressar proteínas de VIH nestas células foi o seguinte: as células foram colocadas em placas 24 horas antes da transfeção numa densidade de 2×10^5 células por poço de 35 mm de diâmetro e transfetadas com ADN de plasmídeo purificado. Para a transfeção, foram misturados 2 µg de plasmídeo com o reagente de transfeção Fugene (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) e dispostos em camadas sobre as células num volume total de 100 µl. Em seguida, as células foram incubadas com 2 ml de meios DMEM (BRL) com 10% de FBS durante 48 horas. Finalmente, os lisados de células foram colhidos para mais análise.

Deteção de Proteínas Expressas

A deteção específica de proteínas de VIH foi realizada utilizando um ensaio *Western blot*. Por exemplo, foi efetuado um ensaio *Western blot* para cada uma das proteínas gag, pol, envelope e vif através da separação da mistura de proteínas utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida SDS. Em seguida, as proteínas separadas foram transferidas

para membranas PVDF (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os marcadores de peso molecular pré-coloridos e as proteínas p24 (gag), p66 (pol), gp160 (env) e vif (Invitrogen) de VIG-1 recombinantes foram utilizados como padrões de tamanho e controlos positivos, respetivamente. A deteção da expressão de gag, pol, env e vif foi realizada através de imunocoloração. As membranas PVDF contendo a ligação e as proteínas separadas foram incubadas com anticorpos específicos das proteínas respetivas. Foram utilizados anticorpos secundários conjugados com fosfatase alcalina (Invitrogen), e a deteção de cor foi efetuada utilizando o kit de deteção cromogénica (Invitrogen).

Expressão de Genes de VIH de Plasmídeos com Unidade de Transcrição Única, Dupla e Tripla

A expressão de genes de VIH do plasmídeo com unidade de transcrição tripla foi avaliada e comparada com a expressão dos mesmos genes de cada plasmídeo com unidade de transcrição única e plasmídeo com unidade de transcrição dupla. O plasmídeo com unidade de transcrição única tinha uma unidade de transcrição eucariótica única que continha um promotor HCMV e um sinal de poli-A da BGH como elementos reguladores de expressão. Os plasmídeos com unidade de transcrição única são numerados de 101 a 105, mais 110 e 111 conforme ilustrado no Quadro 1. Por exemplo, o plasmídeo 101 continha o gene env de VIH como a grelha de leitura aberta na unidade de transcrição única. Igualmente, o plasmídeo 102 continha o gene gag de VIH como a grelha de leitura aberta na unidade de transcrição única. Além disso, o plasmídeo 103 continha o gene pol de VIH como a grelha de leitura aberta na unidade de transcrição única, e o plasmídeo 104 continha a fusão de genes nef-tat-vif (ntv) de VIH como a grelha de leitura aberta na unidade de transcrição única. O plasmídeo 101 continha igualmente a fusão de genes nef-tat-vif (ntv) de VIH como a grelha de leitura aberta na unidade de transcrição única, com a

exceção de ter sido ativado pelo promotor Lap1 em vez de pelo HCMV, tal como no plasmídeo 104. Finalmente, o plasmídeo 110 continha a fusão de genes gag-pol-nef-tat-vif de VIH como a grelha de leitura aberta na unidade de transcrição única, e o plasmídeo 111 continha a fusão de genes gag-pol de VIH como a grelha de leitura aberta na unidade de transcrição única.

Os plasmídeos com unidade de transcrição dupla tinham duas unidades de transcrição eucarióticas completas. Os plasmídeos com unidade de transcrição dupla foram numerados de 201 a 204 e 212 conforme ilustrado no Quadro 1. Os elementos reguladores de expressão para os plasmídeos com unidade de transcrição dupla eram compostos por um promotor HCMV associado a uma poliA do SV40 na primeira unidade de transcrição e um promotor SCMV associado a um sinal de poli-A da BGH na segunda unidade de transcrição. Nesta forma de realização, o plasmídeo 201 continha o gene pol de VIH na primeira unidade de transcrição e o gene gag de VIH na segunda unidade de transcrição. O plasmídeo 202 continha o gene de fusão de genes nef-tat-vif de VIH na primeira unidade de transcrição e o gene env de VIH na segunda unidade de transcrição. O plasmídeo 203 continha um gene de fusão de genes gag-pol-nef-tat-vif de VIH na primeira unidade de transcrição e o gene env de VIH na segunda unidade de transcrição. O plasmídeo 204 continha o gene de fusão de genes gag-pol de VIH na primeira unidade de transcrição e o gene env de VIH na segunda unidade de transcrição.

Em algumas formas de realização, é fornecido um adjuvante através da respetiva expressão a partir de um plasmídeo. Nesses casos, o plasmídeo tem de conter o número apropriado de unidades de transcrição. Por uma questão de ajuda, e para distinguir dos plasmídeos de antigénio, será utilizada a terminologia primária, secundária e terciária para referir os plasmídeos de adjuvante com uma, duas ou

três unidades de transcrição. Por exemplo, IL-12 é um adjuvante constituído por dois polipéptidos. Um plasmídeo apropriado é o plasmídeo 212, que continha a subunidade p35 IL-12 expressa sob o controlo do promotor do HCMV precoce imediato e do sinal de poliadenilação do SV40 na unidade de transcrição primária, e a subunidade p40 IL-12 é expressa sob o controlo do promotor do CMV símio CMV (SCMV) e do sinal de poliadenilação da BGH na unidade de transcrição secundária.

Os plasmídeos com unidade de transcrição tripla tinham três unidades de transcrição eucariótica completas e foram numerados como 301, 302 e 303. Consulte o Quadro 2. A diferença entre os três plasmídeos é o número de grelhas de leitura abertas de VIH inseridas. Os elementos reguladores de expressão para os plasmídeos com unidade de transcrição tripla eram compostos por um promotor SCMV associado a um sinal de poli-A da BGH na primeira unidade de transcrição, um promotor HCMV associado a uma poliA do SV40 na segunda unidade de transcrição e um promotor HSVLap1 associado a um sinal de poli-A da beta-globina de coelho na terceira unidade de transcrição. Conforme ilustrado no Quadro 2, o plasmídeo número 301 é um plasmídeo com unidade de transcrição tripla, mas com apenas uma unidade de transcrição contendo uma grelha de leitura aberta inserida. Especificamente, o plasmídeo 301 continha a grelha de leitura aberta do gene de fusão gag-pol na primeira unidade de transcrição. O plasmídeo número 302 é o plasmídeo com unidade de transcrição tripla contendo duas unidades de transcrição com grelhas de leitura abertas inseridas, o gag-pol na primeira unidade de transcrição e uma grelha de leitura aberta do gene de fusão nef-tat-vif de VIH na terceira unidade de transcrição (não foram inseridos nenhuns genes na segunda unidade de transcrição). Finalmente, o plasmídeo número 303 é o plasmídeo com unidade de transcrição tripla contendo todas as três

unidades de transcrição com grelhas de leitura abertas inseridas, a grelha de leitura aberta da fusão de genes gag-pol na primeira unidade de transcrição, a grelha de leitura aberta do gene env na segunda unidade de transcrição e a grelha de leitura aberta do gene de fusão nef-tat-vif na terceira unidade de transcrição.

Quadro 1. Plasmídeos* com Unidade de Transcrição Única e Dupla

N.º do Plasmídeo	Construção de VIH	Tipo
001	Controlo de vetor vazio	Controlo/Sem UTs
101	poliA de HCMV-env-BGH	Única
102	poliA de HCMV-gag-BGH	Única
103	poliA de HCMV-pol-BGH	Única
104	poliA de HCMV-ntv-BGH	Única
105	poliA da beta-globina de Lap1-ntv-Coelho	Única
110	poliA de HCMV-gag-pol-ntv-BGH	Única/fusão
111	poliA de HCMV-gag-pol-BGH	Única/fusão
201	poliA de HCMV-pol-SV40, poliA de SCMV-gag-BGH	Dupla
202	poliA de HCMV-ntv-SV40, poliA de SCMV-env-BGH	Dupla
203	poliA de HCMV-gag-pol-ntv-SV40, poliA de SCMV-env-BGH	Dupla
204	poliA de HCMV-gag-pol-SV40, poliA de SCMV-env-BGH	Dupla
212	**poliA de HCMV-m/L-12p35-SV40, poliA de SCMV-mIL-12 p40-BGH	Adjuvante

N.º do Plasmídeo	Construção de VIH	Tipo
*São utilizadas as seguintes abreviaturas: SCMV: promotor do citomegalovírus símio, HCMV: promotor do citomegalovírus humano, HSVlap1: promotor associado a latência 1 do vírus herpes simplex, gag-pol: fusão gag-pol de VIH, ntv: fusão nef-tat-vif de VIH, env: envelope de VIH, mIL-12: interleucina-12 murina.		

Quadro 2. Plasmídeos* com Unidade de Transcrição Tripla

N.º do Plasmídeo	Construção de VIH	N.º de GLAs
301	poliA de SCMV-gag-pol-BGH, HCMV-[nenhum], Lap1-[nenhum]	um
302	poliA de SCMV-gag-pol-BGH, HCMV-[nenhum], poliA da beta-globina de Lap1:ntv-Coelho	dois
303	poliA de SCMV:gag-pol-BGH, poliA de HCMV-env-SV40, poliA da beta-globina de Lap1:ntv-Coelho	três
*São utilizadas as seguintes abreviaturas: SCMV: promotor do citomegalovírus símio, HCMV: promotor do citomegalovírus humano, HSVlap1: promotor associado a latência 1 do vírus herpes simplex, gag-pol: fusão gag-pol de VIH, ntv: fusão nef-tat-vif de VIH, env: envelope de VIH, HCMV-[nenhum], Lap1-[nenhum] indica as unidades de transcrição, não contém uma grelha de leitura aberta (consulte o plasmídeo 301): **II-12 pode ser murino, macaco rhesus ou humano.		

Conforme descrito acima, foram construídos múltiplos plasmídeos com unidade de transcrição única e dupla para utilizar na comparação com a expressão dos plasmídeos com unidade de transcrição tripla. Consulte os Quadros 1 e 2. Os padrões de expressão destas construções que contêm gag, pol, env, nef-tat-vif, gag-pol e gag-poMef tat-vif foram avaliados através da transfeção transitória de células 293 e/ou RD com os plasmídeos com unidade de transcrição única,

dupla e tripla e da análise dos lisados de células através de *Western blot* utilizando anticorpos apropriados.

Foi efetuada a expressão *in vitro* de gag nos lisados de células de várias construções, e os resultados foram detetados utilizando *Western blot*. Consulte a Figura 2 e o Quadro 1. As proteínas gag e pol foram detetadas com soro monoclonal gag anti-ratinho e soro policlonal humano, respetivamente. Os marcadores de peso molecular e p24 VIH foram incluídos nas primeiras duas filas como padrões. O plasmídeo com unidade de transcrição única 102, que expressou gag, foi disposto na primeira fila de amostra. Os plasmídeos com duas unidades de transcrição e duas unidades de transcrição com uma grelha de leitura aberta inserida são os plasmídeos 201, 203 e 204 e todos produziram quantidades significativas de gag ou proteínas que contêm gag, tais como gag-pol-nef-tat-vif ou gag-pol. Nas construções de fusão gag-pol, as sequências *frameshift* entre gag e pol sofreram uma mutação para permitir a expressão de gag e pol a partir da mesma grelha de leitura. Os plasmídeos com duas unidades de transcrição 201, 203 e 204 produziram menos gag do que o plasmídeo com unidade de transcrição única 102. Os plasmídeos com unidade de transcrição dupla ou tripla, que codificaram fusões gag-pol, expressaram quantidades equivalentes da poliproteína gag-pol que migrou com um tamanho esperado de -180kd. A expressão de gag a partir do plasmídeo 203 que codifica uma poliproteína gag-pol-ntv grande também foi detetada nos lisados das células transfetadas, e a proteína migrou num tamanho esperado de -220kD. Contudo, a expressão a partir desta grande fusão (plasmídeo 203) foi inferior à dos plasmídeos 302 e 303 que codificam gag-pol. O plasmídeo com três unidades de transcrição 303 também produziu quantidades significativas de gag na forma de poliproteína gag-pol, mas produziu menos gag do que plasmídeo com unidade de transcrição única e quase o mesmo nível

produzido pelo plasmídeo com unidade de transcrição dupla. O plasmídeo com três unidades de transcrição 302, que tinha duas grelhas de leitura abertas inseridas e uma unidade de transcrição sem nenhuma grelha de leitura aberta, produziu gag aproximadamente no mesmo nível dos plasmídeos com duas unidades de transcrição. Consulte a Figura 2.

Foi efetuado o perfil de expressão *in vitro* de pol nos lisados de células de várias construções, e os resultados, conforme detetados utilizando *Western blot*, seguiram um padrão semelhante, conforme observado no caso de gag. Consulte a Figura 3 e o Quadro 1. Neste caso, as proteínas pol foram detetadas com soros policlonais humanos. Os marcadores de peso molecular e a transcriptase reversa de VIH foram incluídos nas primeiras duas filas como padrões. O plasmídeo com unidade de transcrição única 103, que expressou pol, foi disposto na primeira fila de amostra. Em seguida, todos os plasmídeos 201, 203 e 204 com duas unidades de transcrição e duas unidades de transcrição com uma grelha de leitura aberta inserida produziram quantidades significativas de pol ou poliproteínas que contêm pol, tais como gag-pol-nef-tat-vif ou gag-pol. Em oposição à situação com gag, os plasmídeos com duas unidades de transcrição 201, 203 e 204 produziram quase o mesmo nível de pol do plasmídeo com unidade de transcrição única 103. O pol e as fusões gag-pol expressaram a poliproteína pol que migrou com os tamanhos esperados de aproximadamente 110kd para pol, aproximadamente 180kd para gag-pol e aproximadamente 250kd para gag-pol-nef-tat-vif. O plasmídeo com três unidades de transcrição 303 também produziu pol na forma de poliproteína gag-pol, mas produziu menos pol do que os plasmídeos com unidade de transcrição única e dupla. Novamente, o plasmídeo com três unidades de transcrição 302, que tinha duas grelhas de leitura abertas inseridas e uma unidade de transcrição sem nenhuma grelha de leitura aberta, expressou pol na forma de uma

poliproteína gag-pol aproximadamente no mesmo nível dos plasmídeos com duas unidades de transcrição 201 e 203. Consulte a Figura 3. Neste exemplo, o plasmídeo 204 expressou níveis mais elevados de pol do que os outros plasmídeos com duas unidades de transcrição 201 e 203. Consulte a Figura 3.

Foi efetuada uma análise semelhante para a expressão *in vitro* nos lisados de células da fusão das proteínas reguladoras de VIH conhecidas como nef-tat-vif ou NTV. Consulte a Figura 4 e o Quadro 1. A proteína NTV foi detetada com anticorpo monoclonal anti-vif de ratinho. Os marcadores de peso molecular e p23 vif de VIH recombinante foram incluídos nas primeiras duas filas, respetivamente, como padrões. Dois plasmídeos com unidade de transcrição única 104 e 105, que expressaram NTV a partir do promotor HCMV ou Lap 1 respetivamente, foram dispostos nas primeiras duas filas de amostra. Consulte a Figura 4. O nível de expressão nef-tat-vif era quase o mesmo para ambos os plasmídeos. Em seguida, dois plasmídeos com duas unidades de transcrição completas com uma grelha de leitura aberta inserida (plasmídeos 202 e 203) produziram quantidades significativas de poliproteína nef-tat-vif. O nível de expressão da proteína nef-tat-vif manifestou-se menos para o plasmídeo 203, o que era esperado, uma vez que a poliproteína a ser expressa era muito grande (gag-pol-nef-tat-vif ~220kD). O plasmídeo com três unidades de transcrição 302, que tinha duas grelhas de leitura abertas inseridas e uma unidade de transcrição sem nenhuma grelha de leitura aberta, produziu nef-tat-vif aproximadamente no mesmo nível do plasmídeo com unidade de transcrição única. Consulte a Figura 4. O plasmídeo com três unidades de transcrição 303, que tinha três grelhas de leitura abertas inseridas, também produziu quantidades significativas de poliproteína nef-tat-vif. Especificamente, o plasmídeo com três unidades de transcrição 303 produziu menos nef-tat-vif

do que os plasmídeos com unidade de transcrição única (104 e 105) e quase o mesmo ou mais do que o nível de poliproteína nef-tat-vif produzida a partir dos plasmídeos com unidade de transcrição dupla (202 e 203). Consulte a Figura 4.

A capacidade de vários plasmídeos com unidade de transcrição única, dupla e tripla de expressar o gene envelope de VIH nos lisados de células foi avaliada. Consulte a Figura 5 e o Quadro 1. A proteína envelope foi detetada com anticorpo monoclonal anti-env de ratinho. Os marcadores de peso molecular e gp120 de VIH recombinante foram incluídos nas primeiras duas filas, respetivamente, como padrões. A primeira fila de amostra contém a proteína expressa a partir de um plasmídeo com unidade de transcrição única 101, que expressou env a partir do promotor HCMV. Consulte a Figura 5. Foram expressas quantidades significativas de glicoproteína envelope. Em seguida, três plasmídeos com duas unidades de transcrição completas com duas grelhas de leitura abertas inseridas (plasmídeos 202, 203 e 204) produziram quantidades significativas de glicoproteína envelope. Em cada caso, o gene envelope foi controlado pelo promotor SCMV. O plasmídeo com três unidades de transcrição 303 produziu igualmente quantidades significativas de glicoproteína env, mas o nível de expressão foi reduzido em 2 a 3 dobras quando comparado com os plasmídeos com unidade de transcrição única e dupla (101, 202, 203 e 204). Consulte a Figura 5.

Conclusão

Com base na análise de expressão *in vitro* semiquantitativa, os dados indicam que todos os genes de VIH inseridos, incluindo *gag-pol*, *env* e *ntv*, foram expressos em níveis significativos a partir do plasmídeo de promotor triplo que inclui três unidades de transcrição independentes.

Exemplo 5. Expressão de Múltiplos Genes Através de Múltiplos Plasmídeos ou Através de um Único Plasmídeo na Concentração de ADN Constante Por Plasmídeo

Em seguida, a expressão a partir de um único plasmídeo com unidade de transcrição tripla que codifica múltiplos genes foi comparada com múltiplos plasmídeos, cada um expressando um único gene a partir da mesma disposição de genes, em que o ADN por plasmídeo foi mantido constante em 1 µg. Em cada caso, a quantidade total de ADN também foi mantida constante em 4 µg ao complementar com ADN de plasmídeo sem uma inserção de grelha de leitura aberta. A expressão de gag de VIH foi avaliada utilizando células cultivadas que foram transfetadas transitoriamente com 1 µg de cada plasmídeo, e os lisados de células foram analisados através de *Western blot*. Conforme ilustrado na Figura 6, a expressão de gag de VIH foi facilmente detetada na fila 2 (dois plasmídeos), fila 3 (um plasmídeo), fila 4 (um plasmídeo) e fila 5 (4 plasmídeos). A expressão de gag de VIH era baixa na fila 1 (três plasmídeos). O plasmídeo com três unidades de transcrição 303 produziu novamente quantidades significativas de proteína gag, embora menos do que as combinações que contêm mais plasmídeos.

A expressão de env de VIH a partir de um único plasmídeo ou múltiplos plasmídeos foi avaliada e os resultados são ilustrados na Figura 7. Novamente, 1 µg de cada plasmídeo foi transfetado transitoriamente nas células cultivadas e os lisados de células foram analisados através de *Western blot*. Os resultados demonstram que a expressão de env de VIH foi facilmente detetada na fila 1 (3 plasmídeos), fila 2 (dois plasmídeos), fila 3 (um plasmídeo), fila 4 (um plasmídeo) e fila 5 (4 plasmídeos). Em cada caso, a quantidade total de ADN foi mantida constante em 4 µg ao complementar com ADN de plasmídeo sem uma inserção de grelha de leitura aberta para tornar a quantidade total de ADN igual a 4 µg. O plasmídeo com três

unidades de transcrição 303 produziu novamente quantidades significativas de glicoproteína env. Consulte a Figura 7. Neste caso, o único plasmídeo com três unidades de transcrição 303 produziu quantidades de glicoproteína env comparáveis às produzidas na fila 5 onde foram utilizados 4 plasmídeos.

Conforme ilustrado na Figura 8, a expressão de nef-tat-vif de VIH de um único plasmídeo ou múltiplos plasmídeos foi avaliada utilizando 1 µg de cada plasmídeo transfetado transitoriamente nas células cultivadas, e os lisados de células foram analisados através de *Western blot*. Consulte a Figura 8. Os resultados demonstram que a expressão de nef-tat-vif de VIH foi detetada na fila 1 (3 plasmídeos), fila 2 (2 plasmídeos), fila 3 (um plasmídeo), fila 4 (um plasmídeo com três unidades de transcrição) e fila 5 (4 plasmídeos). Consulte a Figura 8. A quantidade total de ADN foi mantida constante em 4 µg. O plasmídeo com três unidades de transcrição 303 produziu quantidades significativas de proteína nef-tat-vif, embora menos do que a combinação que contém dois plasmídeos.

Conclusão

Conforme ilustrado nas Figuras 6, 7 e 8, utilizando o plasmídeo com três unidades de transcrição (303), as três grelhas de leitura abertas que codificam as proteínas gag-pol, env e ntv foram expressas simultaneamente em níveis semelhantes, confirmando assim a funcionalidade deste plasmídeo.

Exemplo 6. Expressão de Múltiplos Genes Através de Dois Plasmídeos ou Através de um Único Plasmídeo na Concentração de ADN Total Constante

A expressão de genes gag, pol, env e nef-tat-vif de VIH foi comparada entre o plasmídeo com unidade de transcrição tripla na concentração de 2 µg e as combinações de dois plasmídeos, cada um com 1 µg de ADN. A concentração de ADN total foi mantida constante em 2 µg conforme

indicado nas Figuras 9, 10, 11 e 12.

A Figura 9 ilustra que a expressão da proteína pol foi semelhante a partir das duas combinações de plasmídeos ou do plasmídeo com unidade de transcrição tripla. A fila 2 ilustra *Western blot* da proteína pol expressa a partir da combinação dos plasmídeos 201 e 202, dois plasmídeos com unidade de transcrição dupla construídos para expressar toda a disposição de genes gag, pol, nef-tat-vif e env de VIH. Em seguida, a expressão da proteína pol a partir de duas combinações de um plasmídeo com unidade de transcrição dupla e um plasmídeo com unidade de transcrição única, que expressaram gag, pol, env e nef-tat-vif em várias configurações, foi avaliada utilizando *Western blot* da proteína pol. Consulte a Figura 9, fila 3 (plasmídeos 204 e 104) e fila 5 (plasmídeos 302 e 101). Em cada caso, existe uma expressão de pol detetável. A fila 4 contém *Western blot* da proteína pol expressa a partir do plasmídeo 203, que é um plasmídeo com unidade de transcrição dupla que expressa toda a disposição de genes gag-pol-nef-tat-vif e env de VIH. Consulte a Figura 9. A fila 6 contém *Western blot* da proteína pol expressa a partir do plasmídeo 303, que é um exemplo de um plasmídeo com unidade de transcrição tripla que expressa toda a disposição de genes gag-pol env e nef-tat-vif de VIH, conforme descrito nos Exemplos 2 e 3. Consulte a Figura 9.

As Figuras 10 e 11 comparam a expressão de proteínas gag e envelope a partir das duas combinações de plasmídeos com a expressão de proteínas a partir do plasmídeo com unidade de transcrição tripla. A fila 2 ilustra *Western blot* das proteínas gag e env expressas a partir da combinação dos plasmídeos 201 e 202, que correspondem a dois plasmídeos com unidade de transcrição dupla construídos para expressar toda a disposição de genes gag, pol, nef-tat-vif e env de VIH. Em seguida, a expressão de proteínas gag e env a partir das combinações de um

plasmídeo com unidade de transcrição dupla e de um plasmídeo com unidade de transcrição única foi avaliada utilizando *Western blot*. Consulte as Figuras 10 e 11: fila 3 (plasmídeos 204 e 104) e fila 5 (plasmídeos 302 e 101). O plasmídeo 302 é um plasmídeo com três unidades de transcrição que funciona como um plasmídeo com duas unidades de transcrição, uma vez que tem apenas duas grelhas de leitura abertas inseridas. Consulte o Quadro 2. Existiu uma expressão de gag e env detetável em cada caso. Consulte a Figura 10. A fila 4 exemplifica *Western blot* das proteínas gag e env expressas a partir do plasmídeo 203, que era um plasmídeo com unidade de transcrição dupla que expressa toda a disposição de genes gag-pol-nef-tat-vif e env de VIH. Consulte as Figuras 10 e 11. A fila 6 contém *Western blot* das proteínas gag e env expressas a partir do plasmídeo com unidade de transcrição tripla 303 descrito nos Exemplos 2 e 3. Consulte as Figuras 10 e 11. A expressão de proteínas gag e env a partir do plasmídeo com unidade de transcrição tripla 303 foi comparável à das combinações de plasmídeos.

A Figura 12 compara a expressão da poliproteína nef-tat-vif a partir de várias combinações de plasmídeos com a expressão de proteínas a partir do plasmídeo com unidade de transcrição tripla utilizando a deteção *Western blot*. A fila 2 ilustra *Western blot* da poliproteína nef-tat-vif expressa a partir da combinação dos plasmídeos 201 e 202, dois plasmídeos com unidade de transcrição dupla concebidos para expressar os genes gag, pol, nef-tat-vif e env de VIH. As filas 3 e 5 ilustram a expressão, conforme detetado utilizando *Western blot*, da poliproteína nef-tat-vif a partir de duas combinações diferentes de plasmídeos com unidade de transcrição dupla e um plasmídeo com unidade de transcrição única. Consulte a Figura 12: fila 3 (plasmídeos 204 e 104) e fila 5 (plasmídeos 302 e 101). Conforme descrito acima, o plasmídeo 302 é um plasmídeo com três

unidades de transcrição que funciona como um plasmídeo com duas unidades de transcrição, uma vez que tem apenas duas grelhas de leitura abertas inseridas. Consulte o Quadro 2. Neste caso, a expressão da proteína nef-tat-vif a partir do plasmídeo 302 observada na fila 5 é de um nível inferior em relação às combinações de plasmídeos de 201 e 202 (fila 2) ou 204 e 104 (fila 3). Consulte a Figura 12. A fila 4 representa a poliproteína nef-tat-vif expressa a partir do plasmídeo 203, que era um plasmídeo com unidade de transcrição dupla que expressa toda a disposição de proteínas gag-pol-nef-tat-vif e env de VIH. Consulte a Figura 12. A fila 6 representa a poliproteína nef-tat-vif expressa a partir do plasmídeo com unidade de transcrição tripla 303. Consulte a Figura 12. A expressão a partir de 303 de nef-tat-vif foi significativamente superior em relação à do plasmídeo 302. Visivelmente, a expressão a partir de um plasmídeo com duas unidades de transcrição (203) que expressa uma poliproteína gag-pol-nef-tat-vif grande a partir de um promotor e a proteína env a partir de outro foi substancialmente inferior à do plasmídeo 303 que codifica os mesmos genes a partir de três unidades de transcrição independentes.

Em resumo, mediante a utilização do plasmídeo com unidade de transcrição tripla, podem ser expressas três grelhas de leitura abertas em simultâneo em níveis aproximadamente equivalentes, e os níveis globais são comparáveis às construções de promotor único e duplo que codificam esses genes. Os dados da expressão de genes *in vitro* sugerem uma falta de interferência significativa de promotor quando são expressos múltiplos genes de VIH a partir de um plasmídeo com unidade de transcrição tripla. Por conseguinte, as unidades de transcrição individuais são colocadas de modo apropriado no vetor.

Exemplo 7. Expressão de Múltiplos Genes Através de Múltiplos Plasmídeos ou Através de um Único Plasmídeo sem

Manter a Concentração de ADN Total Constante

A expressão a partir de um único plasmídeo com unidade de transcrição tripla que codifica múltiplos genes foi comparada com múltiplos plasmídeos, expressando a mesma disposição de genes, em que o ADN por plasmídeo foi mantido constante em 1 µg. Em oposição ao Exemplo 5, a quantidade total de ADN não foi complementada com ADN de plasmídeo sem uma inserção de grelha de leitura aberta para compensar a quantidade total de ADN. Os dados não são ilustrados, mas são resumidos abaixo.

Neste exemplo, a expressão de gag, pol, env e ntv de VIH foi avaliada utilizando células 293 cultivadas que foram transfetadas transitoriamente com 1 µg de cada plasmídeo, e os lisados de células foram analisados através de *Western blot*. A expressão de gag de VIH foi detetada a partir de transfeções com combinações com três plasmídeos (101, 104, 301), dois plasmídeos (201 e 202), um plasmídeo (203), um plasmídeo (303) e quatro plasmídeos (101, 102, 103, 104). O plasmídeo com três unidades de transcrição 303 produziu quantidades significativas de proteína gag em comparação com combinações que necessitam de mais plasmídeos. Especificamente, o plasmídeo com três unidades de transcrição 303 produziu mais poliproteína gag do que o plasmídeo com duas unidades de transcrição 203, que tem todos os seis genes de VIH, e ligeiramente menos do que a combinação dos plasmídeos com duas unidades de transcrição 201 e 202, que têm todos os seis genes de VIH. A expressão de gag a partir da combinação de três plasmídeos (101, 104, 301) foi fraca quando gag foi expresse como uma fusão gag-pol ativada pelo promotor SCMV.

A expressão de env de VIH a partir de um único plasmídeo ou múltiplos plasmídeos também foi avaliada. Os resultados demonstraram que a expressão de env de VIH foi facilmente detetada a partir de combinações com três plasmídeos (301, 101 e 104), dois plasmídeos (201 e 202),

um plasmídeo (203), um plasmídeo (303) e quatro plasmídeos (101, 102, 103, 104). A quantidade total de ADN depende do número de plasmídeos que estão a ser utilizados, com 1 µg de ADN transfetado por plasmídeo. Neste caso, o plasmídeo com três unidades de transcrição 303 produziu mais glicoproteína env do que qualquer outro plasmídeo ou combinação de plasmídeos.

A expressão de nef-tat-vif de VIH de um único plasmídeo ou múltiplos plasmídeos foi avaliada utilizando 1 µg de cada plasmídeo transfetado transitoriamente nas células cultivadas, e os lisados de células foram analisados através de *Western blot*. A expressão de nef-tat-vif de VIH foi detetada a partir de combinações com três plasmídeos (301, 101 e 104), dois plasmídeos (201 e 202), um plasmídeo (203), um plasmídeo (303) e quatro plasmídeos (101, 102, 103, 104). O plasmídeo com três unidades de transcrição 303 produziu quantidades significativas de proteína nef-tat-vif.

Conclusão

Foi concebido e construído um plasmídeo com unidade de transcrição tripla que codifica múltiplos genes de VIH que expressam níveis elevados de proteínas específicas de um modo rev-independente, o que confirmou que uma construção de um único plasmídeo expressou três transcrições de forma independente e eficaz. Neste exemplo, a expressão de genes de VIH a partir do plasmídeo com três unidades de transcrição foi comparada com a expressão dos mesmos genes a partir de construções com unidade de transcrição única ou dupla. Os dados indicam que a expressão de genes a partir de um plasmídeo com unidade de transcrição tripla é inferior quando comparada com os expressos por cassetes de expressão única ou dupla. Contudo, no exemplo acima foi descoberto que a expressão de genes ativada pelo promotor HCMV é superior ao promotor SCMV, seguido pelo promotor HSV-lap1. Esta diferença da força dos promotores na

construção com unidade de transcrição tripla deve ser considerada ao posicionar genes para expressar antigénios de imunogenicidade superior contra inferior no plasmídeo.

Exemplo 8. Estudos de Imunização Murinos com Vetores de Plasmídeo com Uma, Duas ou Três Unidades de Transcrição Completas

Foram efetuados estudos murinos para estabelecer e comparar a funcionalidade imunogénica do vetor de plasmídeo com três unidades de transcrição que expressa proteínas de seis genes de VIH-1 incluindo *gag*, *pol*, *env*, *nef*, *tat* e *vif*. Especificamente, foi comparada a capacidade relativa de várias composições imunogénicas baseadas em ADN de plasmídeo único, duplo e triplo para provocar respostas imunitárias mediadas por células específicas de múltiplos antigénios em ratinhos Balb/c.

Os ratinhos Balb/c foram imunizados de modo intramuscular com um total de 100 doses µg de ADN conforme descrito no Quadro 3. Em todos os casos, as composições imunogénicas foram formuladas com 0,25% de bupivacaína e injetadas nos músculos quadricíptes num volume de 100 µl. Dez dias após a segunda imunização, os animais foram sacrificados e o soro e os baços foram isolados para ensaios imunes. Os soros de ratinhos imunizados foram analisados relativamente a titulações de anticorpos específicas anti-*gag* e anti-*env*. Os baços foram utilizados para medir células que secretam IFN-gama específicas de antigénio utilizando ensaios ELISPOT conforme descrito abaixo.

Animais

Para estes estudos, foram utilizadas fêmeas de ratinhos Balb/c com 4 a 6 semanas de idade. Os ratinhos foram mantidos de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, National Academic Press, Washington, DC, 1996). Além disso, os procedimentos para a utilização e tratamento dos ratinhos

foram aprovados pelo Institutional Animal Care and Use Committee de Wyeth Research.

Composições Imunogénicas e Imunização

Vários vetores de expressão de ADN de plasmídeo que codificam gp160 env de VIH, p55 gag, pol ou uma proteína de fusão nef-tat-vif foram utilizados como composições imunogénicas experimentais, e a estrutura principal do vetor de expressão vazio foi utilizada como um vetor de composição imunogénica de controlo. Para ver o estudo, consulte o Quadro 3 abaixo. A expressão de genes de VIH pelos vários vetores de expressão foi confirmada através de *Western blot* após a transfeção transitória das células de rabdomiossarcoma (RD) humano. Consulte os Exemplos 4 a 7.

O adjuvante utilizado para estes estudos foi igualmente ministrado através de um plasmídeo de ADN. Neste exemplo, todos os animais foram coinjetados com 25 µg de plasmídeo n.º 212 que expressa IL-12. Este plasmídeo de adjuvante é um plasmídeo de expressão com duas unidades de transcrição (plasmídeo n.º 212 no Quadro 1) que codifica genes p35 e p40 IL-12 murinos. Consulte o Quadro 1. A subunidade p35 IL-12 foi expressa sob o controlo do promotor do gene *immediate early* HCMV e do sinal de poliadenilação do SV40, enquanto a subunidade p40 IL-12 foi expressa sob o controlo do promotor do CMV símio (SCMV) e do sinal de poliadenilação da BGH. A produção de IL-12 murina foi confirmada após a transfeção transitória de células RD através do rastreio dos sobrenadantes de células utilizando uma captura EUSA p70 IL-12 antirratinho (Endogen, Woburn, MA) (dados não apresentados).

Quadro 3. Estudo de Ratinho – Duas Imunizações

N.º do Grupo	N.º do Plasmídeo	Descrição do plasmídeo	ADN Total (ug)	N.º de ratinhos	Plano de Imunização (semana)
1	303	HCMV-env; SCMVgag/ pol; lap-ntv	100	9	0 - 3
1a	203	HCMV- gag/pol; SCMVenv;	100	9	0 - 3
2b	101 + 110	HCMV-env HCMV-gag- pol-ntv	50 50	9	0 - 3
2c	104 + 204	HCMV-ntv HCMV-gag- pol, SCMV- env	50 50	9	0 - 3
2d	111 + 202	HCMV-gag-pol HCMV-ntv, SCMV-env	50 50	9	0 - 3
2e	201 + 202	HCMV-pol, SCMV-gag HCMV-ntv, SCMV-env	50 50	9	0 - 3
3a	111 101 104	HCMV-gag/pol HCMV-env HCMV-ntv	33 33 33	9	0 - 3
3b	101 104 201	HCMV-env HCMV-ntv HCMV-pol, SCMV-gag	33 33 33	9	0 - 3

N.º do Grupo	N.º do Plasmídeo	Descrição do plasmídeo	ADN Total (ug)	N.º de ratinhos	Plano de Imunização (semana)
3c	102	HCMV-gag	33	9	0 - 3
	103	HCMV-pol	33		
	202	HCMV-ntv, SCMV-env	33		
4	001	Controlo de vetor	100	6	0 - 3

Os plasmídeos de expressão para imunização foram produzidos por Puresyn, Inc. (Malvern, PA). Os plasmídeos foram propagados em *E. coli*, isolados das células através de lise alcalina, purificados por cromatografia em coluna e formulados individualmente numa concentração de 2,5 mg/mL num tampão citrato isotónico (29,3 mM de citrato de sódio, 0,67 mM de ácido cítrico, 150mM de NaCl, 0,34 mM de EDTA, pH = 6,4 a 6,7) que contém 0,25% de bupivacaína como um agente facilitador para permitir a formação de ADN: complexos de bupivacaína. Para todos os grupos, o plasmídeo de adjuvante foi misturado com os plasmídeos de expressão de antígenos como parte da composição imunogénica. As preparações de plasmídeo finais consistiam em >90% de ADN de plasmídeo super-enrolamento e a endotoxina residual era <30 EU/mg de ADN (dados não apresentados). Imediatamente antes da imunização, as composições imunogénicas foram preparadas misturando as formulações de vetor de expressão apropriadas. As composições imunogénicas resultantes foram administradas por injeção intramuscular em ambos os músculos quadricíptes (0,1 cc de volume de injeção total, com 0,05 cc por local) utilizando uma agulha de espessura 18 e uma seringa de 0,3 mL.

Ensaio ELISPOT de IFN- γ Murino

Originalmente, o ELISPOT (ou ElisaSpot, abreviatura de Enzyme-linked ImmunoSpot Assay) foi desenvolvido como um método para detetar células B segregadas de anticorpos. O método foi agora adaptado para determinar as reações das células T a um antigénio específico, normalmente representado como o número de células ativadas por milhão. No presente exemplo, a produção de interferão-gama (IFN-gama) foi utilizada como uma leitura da ativação de células únicas.

Nesta análise, o ELISPOT serviu para determinar a atividade de células T citotóxicas provocada pelas composições imunogénicas que expressam antigénios de VIH específicos. Para a determinação de respostas ELISPOT de IFN- γ , foi utilizado um kit ELISPOT de IFN- γ de Ratinho (número do material 551083, BD Biosciences, San Diego CA). Os Ensaio ELISPOT foram efetuados em placas de microtitulação de noventa e seis poços com um fundo de membrana para cada poço. Especificamente, as placas ELISPOT de fundo raso de noventa e seis poços (ImmunoSpot, Cellular Technology Limited, Cleveland Ohio) foram revestidas durante a noite com um anticorpo monoclonal γ -interferão (mIFN- γ) antirratinho purificado (N.º do Material 51-2525KC, BD-Biosciences, San Diego CA) numa concentração de 10 mcg/mL, depois foram lavadas três vezes com 1 x salina tamponada com fosfato esterilizada (1 x PBS) e, em seguida, bloqueadas durante 2 horas com meio de cultura completo R10 (RPMI-1640 contendo 10% de soro bovino fetal (FBS) inativado por calor (HI) e 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina, 100 mcg/mL de sulfato de estreptomicina, 1 mM de piruvato de sódio, 1 mM de HEPES, 100 mM de aminoácidos não essenciais). Os baços de ratinho foram primeiro processados através da trituração dos baços entre a ponta congelada de duas lâminas de microscópio esterilizadas. A substância homogeneizada resultante foi

novamente suspensa em 10 mls de meio de cultura R05 completo (meio RPMI 1640 complementado com 5% de FBS, 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina, 100 mcg/mL de sulfato de estreptomicina, 1 mM de piruvato de sódio, 1 mM de HEPES, 100 mM de aminoácidos não essenciais) e os esplenocitos foram subsequentemente isolados por centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque e novamente suspensos no meio de cultura R10 completo que contém 2 mcg/mL de Con-A (Sigma), pools de péptidos (sobreposição de 15 mers por 11 aminoácidos; 2,5 mM de cada concentração de péptidos final) abrangendo p55 gag de VIH, gp160 env 6101 de VIH-1, pol, nef, tat, vif ou apenas o meio. Os números de células de entrada correspondiam a 4×10^5 esplenocitos por poço (4×10^6 esplenocitos/mL) e foram ensaiados em poços duplicados. Os esplenocitos foram incubados durante 22 a 24 horas a 37 °C e, em seguida, removidos da placa ELISPOT, lavando primeiro 3 vezes com água desionizada e incubando em gelo durante 10 a 20 minutos. Depois as placas foram lavadas 6 vezes com 1x de PBS contendo 0,1% de Tween-20. Subsequentemente, as placas foram tratadas com um anticorpo de detecção biotinilado IFN- γ antirratinho (5,0 mcg/ml, N.º do Material 51-1818KZ, BD-Biosciences, San Diego CA) diluído com R10 e incubado durante a noite a 4 °C. Em seguida, as placas ELISPOT foram lavadas 10 vezes com 1x de PBS contendo 0,1% de Tween-20 e tratadas com 100 mL por poço de conjugado de peroxidase de rábano-estreptavidina (N.º de Catálogo 51-9000209, BD-Biosciences, San Diego CA) diluída 1:100 com R10 e incubada mais 1 hora à temperatura ambiente. O conjugado de peroxidase de rábano-estreptavidina não ligado foi removido enxaguando a placa 6 vezes com 1 x de PBS contendo 0,1% de Tween-20 e 3 vezes com 1 x de PBS. Depois o substrato da peroxidase foi preparado diluindo 20 mL/mL de Cromogénio AEC na solução de substrato AEC (N.º de Catálogo 551951, BD-Biosciences, San Diego CA). O desenvolvimento da cor foi

iniciado adicionando 100 µL/poço de solução de substrato durante 3 a 5 minutos. Finalmente, as placas foram enxaguadas com água e secas ao ar. Os resultados foram determinados utilizando um analisador ELISPOT ou dispositivo de imagens que tira uma fotografia de um único poço da placa ELISPOT e, em seguida, os pontos foram enumerados. Neste caso, os pontos resultantes foram contados utilizando um Immunospot Reader (Leitor de Pontos Imunes) (CTL Inc., Cleveland, OH). As respostas ELISPOT de IFN- γ específicas do péptido foram consideradas positivas se a resposta (menos ruído de fundo dos meios) fosse ≥ 3 vezes acima da resposta dos meios e ≥ 50 células de formação de pontos que excretam interferon-gama por 10^6 esplenocitos (#SFC/ 10^6 esplenocitos).

Conforme ilustrado no Quadro 4, as respostas ELISPOT de IFN-gama específicas de VIH totais e de antígeno de VIH-1 individuais nos ratinhos após as imunizações de ADN de múltiplos plasmídeos foram medidas após duas imunizações com composições imunogénicas constituídas pelos plasmídeos ilustrados no Quadro 3.

Quadro 4. Respostas Imunitárias Murinas Depois de Duas Imunizações

ID do Grupo	Resposta* específica de gag	Resposta específica de pol	Resposta específica de env	Resposta específica de ntv#-	Resposta específica de VIH total
Controlo	2	0	3	0	5
1a	46	43	238	4	331
2e	29	138	181	12	360
2c	102	118	203	44	467
1	20	39	468	2	529
3b	16	109	404	20	548
2d	188	185	251	8	632
2b	43	65	548	6	662
3a	139	105	802	18	1064

ID do Grupo	Resposta* específica de gag	Resposta específica de pol	Resposta específica de env	Resposta específica de ntv#-	Resposta específica de VIH total
3c	174	378	616	11	1179
* As respostas ELISPOT de IFN-gama específicas do antígeno foram apresentadas como as células de formação de pontos (#SFC/10 ⁶ esplenocitos) que excretam interferão-gama por 10 ⁶ esplenocitos. # ntv, proteína de fusão nef-tat-vif.					

Em todos os casos, as respostas específicas de nef-tat-vif foram relativamente baixas. Foram mais baixas nos ratinhos do grupo 1, em que nef-tat-vif estava sob o controlo do promotor lap1. Contudo, nos exemplos 4 a 7 acima, foi descoberto que a expressão de genes ativada pelo promotor HCMV foi mais elevada do que com o promotor SCMV, e a expressão de genes ativada pelo promotor SCMV foi mais elevada do que com o promotor HSV-lap1. Esta diferença na força dos promotores utilizados na construção de promotor triplo pode ser responsável pelas respostas imunitárias induzidas mais baixas observadas quando esta construção foi utilizada numa composição imunogénica.

Relativamente à utilização de proteínas de fusão, comparando a resposta ELISPOT ao pol de VIH em 3a e 3c, parece existir uma imunogenicidade reduzida quando são utilizados os polipéptidos de fusão em vez dos polipéptidos únicos.

Outra consideração é a imunogenicidade relativa da proteína que está a ser examinada. Por exemplo, ao examinar 3b contra 3c (em que a expressão de genes ativada pelo promotor HCMV ativa cada um dos genes env, gag, pol e nef-tat-vif num único plasmídeo que contém uma unidade de transcrição única), continua a existir uma hierarquia de imunogenicidade que corresponde aproximadamente a env > pol > gag > nef-tat-vif. Conforme descrito acima, a força do

promotor e a imunogenicidade relativa devem ser consideradas na concepção de plasmídeos individuais e nas combinações de plasmídeos para a utilização nas composições imunogénicas.

Em seguida, foi efetuado outro estudo para avaliar o efeito nas respostas imunitárias em três imunizações utilizando uma, duas e três composições imunogénicas de plasmídeos. Consulte o Quadro 5. Foram imunizados grupos de seis ratinhos conforme descrito acima, com a exceção de que foram imunizados três vezes em intervalos de três semanas em vez de duas vezes em intervalos de três semanas. Consulte o Quadro 5. Os grupos 1, 2e e 3a utilizam as mesmas composições imunogénicas apresentadas no Quadro 3. Além disso, no estudo que utiliza três imunizações, foi construído um novo plasmídeo, designado por 301, para comprar diretamente a expressão de genes ativada pelo promotor HCMV de uma proteína de fusão gag/pol com a expressão de genes ativada pelo promotor SCMV de uma proteína de fusão gag/pol. Compare os grupos 3a e 4b nos Quadros 5 e 6. Este plasmídeo permitiu igualmente a comparação do potencial imunogénico da fusão gag-pol que está a ser expressa a partir de um plasmídeo com unidade de transcrição tripla com a fusão gag-pol e os genes env que estão a ser expressos a partir de plasmídeos com três unidades de transcrição ativados por promotores semelhantes. Compare os grupos 1 e 4b nos Quadros 5 e 6. O tecido do baço foi colhido 17 dias após o reforço final e analisado relativamente a respostas ELISPOT específicas do antígeno às proteínas de VIH individuais.

Quadro 5. Estudo Murino – Três Imunizações

N.º do Grupo ¹	N.º do Plasmídeo	Descrição do plasmídeo	ADN Total (ug)	N.º de ratinhos	Plano de Imunização (semana)
1	303	HCMV-env; SCMV-gag/pol; lap-ntv	100	9	0 - 3 - 6
2e	201 + 202	HCMV-pol, SCMV-gag HCMV-ntv, SCMV-env	50 50	9	0 - 3 - 6
3a	111 101 104	HCMV-gag/pol HCMV-env HCMV-ntv	33 33 33	9	0 - 3 - 6
4b	101 104 301	HCMV-env HCMV-ntv SCMV-gag/pol, HCMV-[nenhum], Lap1-[nenhum]	33 33 33	9	0 - 3 - 6
controle	001	Controle de vetor	100	6	0 - 3 - 6
Os grupos ¹ 1, 2e e 3a utilizam as mesmas composições imunogénicas apresentadas no Quadro 3, com a exceção de terem sido realizadas três imunizações.					

As respostas imunitárias celulares induzidas totais do plasmídeo com três unidades de transcrição foram aproximadamente iguais ou superiores às respostas imunitárias celulares induzidas pelas composições imunogénicas que contêm plasmídeos com unidade de transcrição única ou dupla. Consulte o Quadro 6.

Quadro 6. Respostas Imunitárias Celulares Murinas – Três Imunizações

ID do Grupo	Resposta* específica de gag	Resposta específica de pol	Resposta específica de env	Resposta específica de ntv#-	Resposta específica de VIH total
1	34	58	986	1	1077
2e	32	363	431	69	895
3a	174	162	713	82	1131
4b	47	35	722	79	883
controle	0	0	3	2	5
* As respostas ELISPOT de IFN-gama específicas do antígeno foram apresentadas como #SFW10⁶ esplenocitos. # ntv, proteína de fusão nef-tat-vif.					

Os resultados ELISPOT das seguintes três imunizações das composições imunogénicas indicaram que as respostas imunitárias celulares de VIH após três imunizações com a composição imunogénica baseada no plasmídeo com três unidades de transcrição aumentaram em 100% a seguir à terceira imunização. Contudo, o equilíbrio da resposta ainda pode variar dependendo da força dos promotores envolvidos e da imunogenicidade relativa dos antígenos. Manifestamente, para algumas situações onde é necessária uma vantagem de produção, o plasmídeo com unidade de transcrição tripla será um bom veículo para administrar três ou mais genes numa composição imunogénica.

Foi verificado que todas as conceções de plasmídeo testadas até este ponto nas composições imunogénicas expressam corretamente os antígenos e são imunogénicas, ativando as respostas imunitárias celulares após três imunizações. Contudo, as respostas específicas de nef, tat e vif não eram detetáveis quando colocadas sob o controle do promotor Lap1 HSV na construção de promotor triplo.

Em alguns cenários, são preferíveis as composições imunogénicas que induzem respostas imunitárias celulares amplas e equilibradas a uma gama de antigénios. Neste caso, as conceções de duas e três composições imunogénicas de ADNp (2d, 3a e 3c) conforme ilustrado nos Quadros 3 e 4 parecem capazes de provocar respostas ELISPOT específicas de VIH, equilibradas e potentes (>600 SFC/ 10^6 células), e foram selecionadas para mais testes em primatas não humanos. Consulte o Exemplo 9.

Exemplo 9. Estudos de Imunização de Macacos com Vetores de Plasmídeo com Uma ou Duas Unidades de Transcrição Completas

No Exemplo 8, nos Quadros 3 e 4, três composições imunogénicas de ADNp, particularmente as composições imunogénicas utilizadas nos grupos 2d, 3a e 3c, pareceram capazes de provocar respostas ELISPOT específicas de VIH, equilibradas e potentes (>600 SFC/ 10^6 células) a todas as seis proteínas de VIH, e foram selecionadas para mais testes em primatas não humanos.

Conceção Experimental

Para este estudo, foi utilizado um total de 30 macacos rhesus (*Macaca mulatta*) machos, reproduzidos em cativeiro, Mamu-A*01 negativos de origem indiana. Os macacos foram alojados no New Iberia Research Center (New Iberia, LA) e mantidos de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, National Academic Press, Washington, DC, 1996). Além disso, os procedimentos para a utilização e tratamento dos macacos foram aprovados pelo Institutional Animal Care and Use Committee de Wyeth Research.

Imunizações:

Os plasmídeos de expressão para imunização foram produzidos por Puresyn, Inc. (Malvern, PA). Os plasmídeos foram propagados em *E. coli*, isolados das células através de lise alcalina e purificados por cromatografia em coluna. Em seguida, os plasmídeos foram formulados individualmente

numa concentração de 2,5 mg/mL num tampão citrato isotónico (29,3 mM de citrato de sódio, 0,67 mM de ácido cítrico, 150 mM de NaCl, 0,34 mM de EDTA, pH = 6,4 a 6,7) que contém 0,25% de bupivacaína para permitir a formação de ADN: complexos de bupivacaína. As preparações de plasmídeo finais consistiam em >90% de ADN de plasmídeo superespiralado e a endotoxina residual era <30 EU/mg de ADN (dados não apresentados).

O adjuvante utilizado para os estudos do macaco rhesus foi um plasmídeo de ADN ministrado como parte da composição imunogénica. Este plasmídeo de adjuvante é um plasmídeo de expressão com duas unidades de transcrição (plasmídeo n.º 212 no Quadro 1) que codifica os genes p35 e p40 IL-12 de rhesus. Consulte o Quadro 7. A subunidade p35 IL-12 foi expressa sob o controlo do promotor do HCMV precoce imediato e do sinal de poliadenilação do SV40, enquanto a subunidade p40 IL-12 foi expressa enquanto estava sob o controlo do promotor do CMV símio (SCMV) e do sinal de poliadenilação da BGH. A bioatividade da IL-12 de rhesus expressa pelo plasmídeo foi confirmada analisando os sobrenadantes de células RD transfectadas transitoriamente relativamente à respetiva capacidade de induzir a secreção de IFN- γ nos linfócitos do sangue periférico de rhesus em repouso (PBLs; dados não apresentados).

Quadro 7. Estudo de Macacos

N.º do Grupo	N.º do Plasmídeo	Descrição do plasmídeo ¹	ADN Total (ug)	N.º de animais
2d	111 +	HCMV-gag-pol	4,25	6
	202	HCMV-ntv,	4,25	
		SCMV-env		
	212	HCMV-IL-12 p35, SCMV-IL-12 p40	1,5	

N.º do Grupo	N.º do Plasmídeo	Descrição do plasmídeo ¹	ADN Total (ug)	N.º de animais
3a	111	HCMV-ag/pol	2,8	6
	101	HCMV-env	2,8	
	104	HCMV-ntv	2,8	
	212	HCMV-IL-12	1,5	
		p35, SCMV-IL-12 p40		
3c	102	HCMV-gag	2,8	6
	103	HCMV-pol	2,8	
	202	HCMV-ntv,	2,8	
		SCMV-env		
	212	HCMV-IL-12	1,5	
		p35, SCMV-IL-12 p40		
3cE ²	102	HCMV-gag	0,56	6
	103	HCMV-pol	0,56	
	202	HCMV-ntv,	0,56	
		SCMV-env		
	212	HCMV-IL-12	0,30	
		p35, SCMV-IL-12 p40		
4a ³	102	HCMV-gag	2,1	6
	101	HCMV-env	2,1	
	103	HCMV-pol	2,1	
	104	HCMV-ntv	2,1	
	212	HCMV-IL-12	1,5	
		p35, SCMV-IL-12 p40		

N.º do Grupo	N.º do Plasmídeo	Descrição do plasmídeo ¹	ADN Total (ug)	N.º de animais
4 -	001	Controlo de vetor	8,5	6
controle	212	HCMV-IL-12 p35, SCMV-IL-12 p40	1,5	
¹ Todos os grupos receberam 1,5 mg de plasmídeo n.º 212 (HCNtV-IL-12 p35, SCAAV-IL-12 p40) que codifica IL-12 de macaco rhesus (rIL-12) como adjuvante. ² Foi incluído um segundo grupo 3c, em que a eletroporação foi adicionada ao protocolo de administração. ³ Foi adicionado um grupo suplementar (4a) ao estudo de macacos posteriormente para determinar a imunogenicidade da concepção da vacina de vetor 4 indicada.				

Todos os macacos foram imunizados num plano de 0, 4 e 8 semanas. Imediatamente antes da imunização, as formulações de vetor de expressão de plasmídeo apropriadas foram misturadas para criar composições imunogénicas e administradas através de injeção intramuscular (grupos 2d, 3a, 3c e controlos) em ambos os músculos deltoides e ambos os músculos quadricíptes (1 ml de volume de injeção, 2,5 mg de ADN por local) utilizando uma agulha de espessura 18 e uma seringa de 3 mL.

Os macacos do grupo 3cE foram imunizados com ADNp através de injeção intramuscular em ambos os músculos deltoides e ambos os músculos quadricíptes utilizando seringas de 1 mL padrão com agulhas de espessura 21 (Braun) posicionadas a 8,0 mm de distância e seguidas imediatamente por eletroestimulação (ou seja, eletroporação). O volume de injeção foi de 0,2 ml fornecendo 0,5 mg de ADN de plasmídeo por local por injeção para um total de 2 mg de ADN. Por conseguinte, o grupo de eletroporação (3cE) recebeu 1/5 do total de ADN administrado aos outros grupos.

Neste exemplo, as condições de electroporação foram as seguintes: seis impulsos unipolares de 20 a 250mA e cerca de 100 V/cm. Existiu uma pausa de 250 ms entre cada impulso.

Na ausência de eletroporação, os resultados ilustrados no Quadro 8 indicaram que as composições imunogénicas baseadas numa combinação de plasmídeos com uma unidade de transcrição única (grupo 3a) produziram as respostas imunitárias celulares totais mais elevadas após dez ou dezasseis semanas em comparação com as composições imunogénicas baseadas numa combinação de plasmídeos que contém, pelo menos, um plasmídeo com mais de uma unidade de transcrição. Compare 3a com 2d e 3c.

Quadro 8. Respostas ELISPOT de IFN- γ Específicas de VIH Totais ao Longo do Tempo Após a Vacinação de ADN de Múltiplos Plasmídeos

Resposta ELISpot de IFN-gama específica de VIH Total*							
ID do Grupo	Ponto de referência	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
2d	43,8 ±0,5	286,5 ±234,9	278,7 ±104,5	403,1 ±89,9	348,3 ±108,8	769,9 ±340,4	407,5 ±82,2
3a	29,5 ±2,8	61,5 ±23,2	204,8 ±26,4	635,0 ±230,5	365,8 ±47,1	1652,5 ±563,3	1015,3 ±584,8
3c	35,5 ±9,0	56,5 ±12,3	138,3 ±32,5	892,5 ±277,5	300,0 ±95,9	786,7 ±213,1	816,3 ±330,6
3cE	41,5 ±13,6	1405,0 ±422,0	346,3 ±72,7	1287,9 ±365,6	3349,6 ±1575,9	3637,8 ±863,7	8140,8 ±1819,0
4a	18,8 ±8,2	52,1 ±13,3	43,3 ±16,6	272,9 ±60,0	230,0 ±40,5	190,6 ±38,9	nr ¹
controle	32,0 ±12,5	10,2 ±2,7	33,2 ±12,0	24,2 ±9,3	16,7 ±4,0	12,1 ±4,1	47,1 ±13,7

* As respostas ELISpot de IFN-gama específicas de VIH são apresentadas como a média de #SFC/10⁶ PBLs ± erro padrão.

¹ nr, não realizado

Um resultado surpreendente foi o facto de a eletroporação ter melhorado as respostas imunitárias celulares totais em mais de 450% em dez semanas e em mais de 990% em dezasseis semanas. Compare 3cE com 3c. Os resultados ilustrados no Quadro 8 indicaram que as composições imunogénicas baseadas numa combinação de plasmídeos contendo, pelo menos, um plasmídeo com mais de uma unidade de transcrição quando combinadas com a eletroporação produziram as respostas imunitárias celulares totais mais elevadas após dez ou dezasseis semanas em comparação com as composições imunogénicas baseadas numa combinação de plasmídeos contendo uma unidade de transcrição única. Compare o grupo 3c e o grupo 3a.

No estudo de macacos, excluindo a utilização de eletroporação, o grupo 3a desenvolveu as respostas ELISPOT específicas do antigénio de VIH totais de dez ou dezasseis semanas mais elevadas (1,652 e 1015 SFC/ 10^6 células). Esta resposta não foi estatisticamente diferente em relação ao grupo 2d (770 SFC/ 10^6 células) ou grupo 3c (787 SFC/ 10^6 células). Consulte o Quadro 8. Contudo, a resposta ELISPOT mais elevada foi alcançada com a utilização de eletroporação. Consulte o grupo 3cE no Quadro 8.

Curiosamente, a resposta imunitária máxima a seguir às imunizações de reforço em que a eletroporação foi utilizada foi mais tardia do que para os grupos sem eletroporação. Por exemplo, a resposta ELISPOT de IFN-gama específica de VIH total para os animais do grupo 3a atingiu o ponto máximo por volta da semana 6 a seguir à imunização ou reforço da semana 4. Consulte o Quadro 8. Em contraste, para o grupo de eletroporação, o ponto máximo foi próximo da semana 10. Consulte o Quadro 8.

A resposta imunitária celular foi ainda analisada como respostas ELISPOT de IFN-gama às seis proteínas de VIH. O Quadro 9 ilustra respostas ELISPOT de IFN-gama às proteínas env, gag, pol de VIH e uma proteína de fusão de nef-tat-

vif. No estudo de macacos, excluindo novamente a utilização de eletroporação, o grupo 3a desenvolveu as respostas ELISPOT específicas do antígeno de VIH de dez semanas mais elevadas Consulte o Quadro 9. Os animais do grupo 3c desenvolveram a resposta ELISPOT mais elevada a gag e o grupo 2d desenvolveu a resposta ELISPOT mais elevada à proteína pol. Compare 3a com 2d e 3c no Quadro 9. Indiscutivelmente, a resposta ELISPOT mais elevada foi alcançada com a utilização de eletroporação. Consulte o grupo 3cE no Quadro 9.

Quadro 9. Respostas ELISPOT de IFN-Gama Específicas do Antígeno de VIH Individuais na Semana 10 Após a Vacinação de ADN de Múltiplos Plasmídeos

ID do Grupo	Resposta ELISPOT de IFN-gama específica do antígeno*				
	Env	Gag	Pol	ntv	total
2d	360,4 ±111,8	107,9 ±45,2	204,0 ±182,6	97,6 ±67,6	769,9 ±340,4
3a	1170,4 ¹ ±427,0	43,8 ±17,5	173,8 ±97,7	264,6 ³ ±113,8	1652,5 ±563,3
3c	412,1 ±131,7	246,32 ±59,7	106,7 ±60,5	21,7 ±8,9	786,7 ±213,1
3cE	861,1 ±292,5	1147,9 ±356,9	1023,1 ±384,0	605,7 ±159,3	3637,8 ±863,7
4a	132,9 ±33,9	29,4 ±6,5	9,1 ±5,4	19,2 ±7,9	190,6 ±38,9
controlo	7,1 ±3,4	1,7 ±0,8	2,5 ±1,1	0,8 ±0,5	12,1 ±4,1
* As respostas ELISPOT de IFN-gama específicas do antígeno de VIH individuais são apresentadas como a média de #SFC/10⁶ PSIs ± erro padrão. ¹ Resposta ELISPOT específica de env estatisticamente mais elevada em relação ao grupo 2d (p<0,05). ² Resposta ELISPOT específica de gag estatisticamente mais elevada em relação ao grupo 3a (p<0,05). ³ Resposta ELISPOT específica de ntv estatisticamente mais elevada em relação ao grupo 3c (p<0,05).					

O Quadro 10 ilustra respostas ELISPOT de IFN-gama às proteínas env, gag, pol de VIH e uma proteína de fusão de nef-tat-vif na semana dezasseis, 8 semanas após a última imunização. Excluindo a utilização de eletroporação, o grupo 3a desenvolveu as respostas ELISPOT específicas do antígeno de VIH de dezasseis semanas mais elevadas a env e nef-tat-vif, enquanto o grupo 3c desenvolveu as respostas ELISPOT específicas do antígeno de dez semanas mais elevadas a gag e pol. A resposta ELISPOT mais elevada foi alcançada com a utilização de eletroporação. Consulte o grupo 3cE no Quadro 10.

Os Quadros 9 e 10 ilustram que o aumento do número de plasmídeos de expressão de antígenos de 3 para 4 na composição imunogénica diminuiu a resposta imunitária a todas as proteínas de VIH. Consulte os Quadros 9 e 10.

Os Quadros 9 e 10 ilustram igualmente que os plasmídeos no grupo 2d com dois plasmídeos de expressão de antígenos na composição imunogénica, em que um plasmídeo tem duas unidades de transcrição, induziram a resposta imunitária mais ampla e mais equilibrada a todas as proteínas de VIH. Consulte os Quadros 9 e 10.

Quadro 10. Respostas ELISpot de IFN-gama específicas do antígeno de VIH individuais na semana 16 após a vacinação de ADN de múltiplos plasmídeos

ID do Grupo	Resposta ELISpot de IFN-gama específica do antígeno*				
	Env	Gag	Pol	Ntv	total
2d	217,5 ±33,3	76,3 ±25,8	81,3 ±32,2	32,5 ±14,3	407,5 ±82,2
3 ^a	831,0 ±457,8	39,7 ±35,6	80,2 ±68,7	64,3 ±25,6	1015,3 ±584,8
3c	437,5 ±187,9	250,0 ±88,2	96,3 ±68,0	32,5 ±10,7	816,3 ±330,6

ID do Grupo	Resposta ELISpot de IFN-gama específica do antígeno*				
	Env	Gag	Pol	Ntv	total
3cE	1984,7 ±698,1	1975,3 ±567,2	2305,6 ±786,2	1875,3 ±624,4	8140,8 ±1819,0
4 ^a	nr ¹	nr	nr	nr	nr
controle	22,5 ±7,2	5,0 ±2,3	9,2 ±3,6	10,4 ±4,4	47,1 ±13,7
* As respostas ELISpot de IFN-gama específicas do antígeno de VIH individuais são apresentadas como a média de #SFC/10⁶ PBLs ± erro padrão. ¹ nr, não realizado					

O Quadro **11** ilustra respostas ELISPOT de IFN-gama às proteínas env, gag, pol de VIH e uma proteína de fusão de nef-tat-vif em trinta semanas, 22 semanas após a última imunização. No estudo de macacos, excluindo novamente a utilização de eletroporação, o grupo 3a desenvolveu as respostas ELISPOT específicas do antígeno de VIH mais elevadas a env, pol e nef-tat-vif. Consulte o Quadro 11. Os animais do grupo 3c desenvolveram a resposta ELISPOT mais elevada a gag. Compare 3a com 2d e 3c no Quadro 11. A resposta ELISPOT mais elevada foi alcançada com a utilização de eletroporação. Consulte o grupo 3cE no Quadro 11.

Em ambos os estudos de ratinhos e macacos, as respostas ELISPOT específicas do antígeno foram geralmente mais elevadas nos grupos que recebem cada gene individual por si mesmo sob o controle do promotor HCMV. No estudo de macacos, a eletroporação foi um fator mais importante na produção de respostas imunitárias do que se fosse utilizada a composição imunogénica contendo plasmídeos com uma contra duas unidades de transcrição completas ou se fossem utilizadas proteínas de fusão.

Quadro 11. Respostas ELISpot de IFN-gama específicas do antígeno de VIH individuais na semana 30 após a vacinação de ADN de múltiplos plasmídeos

ID do Grupo	Resposta ELISpot de IFN-gama específica do antígeno*				
	Env	Gag	Pol	Ntv	total
2d	44,2 ±11,6	6,7 ±3,1	8,8 ±6,3	4,6 ±3,6	64,2 ±16,0
3a	184,0 ±105,4	5,6 ±3,7	14,0 ±6,9	10,2 ±4,7	213,9 ±119,1
3c	52,5 ±11,7	25,4 ±6,6	2,9 ±2,0	0,8 ±0,8	81,7 ±19,6
3cE	831,3 ±339,1	768,9 ±216,7	907,4 ±476,5	886,4 ±371,8	3,393,9 ±920,4
4a ¹	nr	nr	nr	nr	nr
controlo	9,6 ±4,8	0,0 ±0,0	1,6 ±1,2	0,0 ±0,0	11,3 ±5,8
* As respostas ELISpot de IFN-gama específicas do antígeno de VIH individuais foram anunciadas como a média de #SFC/10⁶ PBLs ± erro de padrão. ¹ não realizado					

Resposta Imunitária Celular a Proteínas de VIH Individuais ao Longo do Tempo

As respostas ELISPOT de IFN-gama foram medidas nas semanas 2, 4, 6, 8, 10 e 16 a proteínas de VIH individuais env, gag, pol, nef, tat e vif a seguir à imunização com os plasmídeos descritos no Quadro 7. Os resultados são apresentados nos Quadros 12 a 17.

Quadro 12. Respostas ELISpot de IFN-gama específicas de env de VIH ao longo do tempo após a vacinação de ADN de múltiplos plasmídeos

Resposta ELISpot de IFN-gama específica de env de VIH*							
ID do Grupo	Ponto de referência	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
2d	17,7 ±4,5	204,0 ±162,8	182,3 ±64,8	295,1 ±60,9	209,6 ±66,1	360,4 ±111,8	217,5 ±33,3
3a	5,3 ±2,2	43,8 ±19,6	165,3 ±20,6	577,9 ±224,5	308,8 ±38,6	1170,4 ±427,0	831,0 ±457,8
3c	21,0 ±8,4	26,3 ±7,1	84,8 ±20,2	538,3 ±174,2	192,1 ±71,1	412,1 ±131,7	437,5 ±187,9
3cE	23,2 ±9,5	598,3 ±203,9	144,2 ±30,9	382,9 ±387,2	1165,8 ±647,7	861,1 ±292,5	1984,7 ±698,1
4a	14,6 ±8,7	24,2 ±10,1	22,1 ±9,6	254,2 ±57,5	169,2 ±33,5	132,9 ±33,9	nr ¹
controlo	13,7 ±5,4	3,0 ±1,6	17,2 ±9,0	17,1 ±6,0	9,2 ±2,6	7,1 ±3,4	22,5 ±7,2
* As respostas ELISpot de IFN-gama específicas de env de VIH foram apresentadas como a média de #SFC/10⁶ PBLs ± erro padrão. ¹ nr, não realizado							

Quadro 13. Respostas ELISpot de IFN-gama específicas de gag de VIH ao longo do tempo após a vacinação de ADN de múltiplos plasmídeos

Resposta ELISpot de IFN-gama específica de gag de VIH*							
ID do Grupo	Ponto de referência	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
2d	6,8 ±1,5	23,5 ±16,7	36,0 ±18,3	28,1 ±5,7	59,6 ±31,2	107,9 ±45,2	76,3 ±25,8
3a	2,2 ±1,0	9,0 ±3,4	21,5 ±4,9	17,5 ±11,5	10,0 ±2,7	43,8 ±17,5	39,7 ±35,6

	Resposta ELISpot de IFN-gama específica de pol de VIH*						
ID do Grupo	Ponto de referência	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
2d	12,2 ±4,3	33,8 ±31,3	27,7 ±7,6	53,3 ±32,3	41,7 ±25,1	204,0 ±182,6	81,3 ±32,2
3a	7,3 ±4,1	1,8 ±0,9	7,3 ±2,9	17,5 ±7,9	15,0 ±4,5	173,8 ±97,7	80,2 ±68,7
3c	6,5 ±3,4	3,5 ±2,1	1,8 ±1,3	102,1 ±42,3	17,1 ±6,8	106,7 ±60,5	96,3 ±68,0
3cE	3,7 ±2,4	54,6 ±30,5	22,1 ±9,1	316,3 ±215,8	497,9 ±179,7	1023,1 ±384,0	2305,6 ±786,2
4a	1,7 ±1,1	9,3 ±6,8	2,5 ±1,3	5,4 ±2,0	13,8 ±4,8	9,1 ±5,4	nr ¹
controlo	10,7 ±4,4	3,2 ±2,8	4,7 ±3,0	2,1 ±1,6	4,2 ±2,7	2,5 ±1,1	9,2 ±3,6

* As respostas ELISpot de IFN-gama específicas de pol de VIH são apresentadas como a média de #SFC/10⁶ PBLs ± erro padrão.

¹ nr, não realizado

Quadro 15. Respostas ELISpot de IFN-gama específicas de nef de VIH ao longo do tempo após a vacinação de ADN de múltiplos plasmídeos

Resposta ELISpot de IFN-gama específica de nef de VIH*							
ID do Grupo	Ponto de referência	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
2d	4,8 ±3,2	16,3 ±16,3	22,5 ±16,7	12,4 ±6,0	32,9 ±14,4	43,7 ±27,6	24,6 ±12,3
3a	20,1 ±9,8	2,5 ±2,0	7,9 ±3,6	13,8 ±5,2	22,5 ±9,8	192,1 ±76,7	54,8 ±25,4
3c	4,2 ±4,2	0,4 ±0,4	0,0 ±0,0	10,4 ±7,5	3,3 ±2,5	10,0 ±8,1	18,3 ±9,6
3cE	5,1 ±3,4	11,9 ±7,2	11,7 ±7,7	67,1 ±56,6	281,7 ±207,0	403,2 ±158,3	1276,2 ±516,3
4a	0,4 ±0,4	1,7 ±1,4	5,4 ±3,1	2,1 ±2,1	10,4 ±5,0	8,3 ±4,4	nr ¹
control o	3,6 ±2,8	0,8 ±0,8	0,8 ±0,8	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	2,9 ±1,5
* As respostas ELISpot de IFN-gama específicas de nef de VIH são apresentadas como a média de #SFC/10 ⁶ PBLs ± erro padrão.							
¹ nr, não realizado							

Quadro 16. Respostas ELISpot de IFN-gama específicas de tat de VIH ao longo do tempo após a vacinação de ADN de múltiplos plasmídeos

Resposta ELISpot de IFN-gama específica de tat de VIH*							
ID do Grupo	Ponto de referência	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
2d	7,1 ±3,3	0,8 ±0,5	7,1 ±4,2	8,5 ±3,3	2,9 ±2,1	4,6 ±2,1	3,8 ±1,4
3a	10,0 ±5,3	3,8 ±2,3	2,9 ±1,2	4,2 ±2,0	8,8 ±7,3	14,6 ±8,2	1,7 ±1,2
3c	6,2 ±4,5	6,3 ±2,9	0,4 ±0,4	8,3 ±3,5	0,4 ±0,4	1,3 ±1,3	2,9 ±1,2

	Resposta ELISpot de IFN- γ específica de tat de VIH*						
ID do Grupo	Ponto de referência	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
3cE	7,6 ±5,2	22,4 ±13,8	2,1 ±1,0	25,0 ±17,8	75,0 ±42,4	29,3 ±19,9	190,0 ±88,4
4a	0,0 ±0,0	1,8 ±1,5	5,8 ±2,9	1,3 ±1,3	5,8 ±3,7	10,3 ±6,1	nr ¹
control o	5,1 ±4,5	0,8 ±0,5	2,1 ±1,6	3,3 ±1,5	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	2,1 ±1,2

* As respostas ELISpot de IFN- γ específicas de tat de VIH são apresentadas como a média de #SFC/10⁶ PBLs ± erro padrão.

¹ nr, não realizado

Quadro 17. Respostas ELISpot de IFN-gama específicas de vif de VIH ao longo do tempo após a vacinação de ADN de múltiplos plasmídeos

	Resposta ELISpot de IFN-gama específica de vif de VIH*						
ID do Grupo	Ponto de referência	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
2d	9,4 ±3,9	7,9 ±7,9	3,3 ±2,9	5,8 ±2,7	1,7 ±1,2	8,7 ±8,1	4,2 ±1,9
3a	12,9 ±8,5	0,4 ±0,4	0,4 ±0,4	4,2 ±2,3	0,8 ±0,8	12,1 ±12,1	7,8 ±2,7
3c	6,4 ±4,8	0,8 ±0,5	0,0 ±0,0	3,8 ±2,0	0,4 ±0,4	2,5 ±2,5	11,3 ±3,3
3cE	8,9 ±5,9	8,2 ±5,1	5,0 ±2,6	115,0 ±51,6	159,6 ±64,8	173,2 ±103,6	409,1 ±129,9
4a	0,0 ±0,0	2,8 ±1,8	2,1 ±0,8	0,0 ±0,0	3,3 ±1,1	0,6 ±0,2	nr ¹
controle	6,8 ±2,2	1,2 ±0,8	0,8 ±0,8	0,0 ±0,0	1,3 ±1,3	0,0 ±0,0	5,4 ±3,1

* As respostas ELISpot de IFN-gama específicas de vif de VIH são apresentadas como a média de #SFC410⁶ PBLs ± erro padrão.

¹ nr, não realizado

Os **Quadros 12 a 17**, que ilustram as respostas imunitárias a proteínas individuais ao longo do tempo indicam que o aumento do número de plasmídeos de expressão de antígenos de 3 para 4 na composição imunogénica resultou numa resposta imunitária diminuída a todas as proteínas de VIH nesta concentração específica de ADN administrado. Consulte os Quadros 12 a 17.

EXEMPLO 10. Estimativa da Percentagem de Células CTL e Auxiliares Específicas de VIH

As quantidades relativas de células CTL e auxiliares específicas de VIH foram estimadas esvaziando primeiro os linfócitos do sangue periférico (PBLs) não fracionados das células CD4+ ou CD8+ antes de medir as respostas ELISpot de IFN-gama específicas de VIH totais nas semanas 10 e 16.

Preparação de PBLs vazios de esferas

As células CD4+ ou CD8+ foram esvaziadas de PBLs não fracionados utilizando esferas de poliestireno magnéticas revestidas com anticorpos monoclonais de rato específicos de CD4 ou CD8 anti-humanos, segundo as instruções do fabricante (Dynal Biotech, Oslo, Noruega). Em resumo, os PBLs de rhesus recentemente isolados foram lavados e novamente suspensos para uma concentração final de 2×10^8 células /mL em 1 x PBS muito frio com 2% de FBS. As microesferas Dynal revestidas com anticorpos monoclonais de rato específicos de CD4 ou anti-CD8 anti-humanos foram lavadas três vezes com 1 x PBS com 2% de FCS, adicionadas a PBLs não fracionados numa relação de esfera para célula de 5:1 e incubadas durante uma hora a 4 °C num aparelho giratório/inclinado. Após a incubação, a suspensão de esferas/células foi colocada numa coluna magnética, e o fluxo que contém PBLs vazios de células CD4+ ou CD8+ foi acumulado. As células foram lavadas uma vez com meio de cultura completo complementado com 5% de FBS, e novamente suspenso para o volume original com meio de cultura completo complementado com 5% de FBS. Foram utilizados

volumes iguais de PBLs não fracionados e vazios de esferas diretamente no ensaio ELISpot.

A eficácia da depleção do subconjunto de células CD4+ e CD8+ e os números precisos de células CD4+ e CD8+ adicionados à placa ELISpot foram subsequentemente quantificados através de citometria de fluxo. Em resumo, os PBLs vazios de esferas foram lavados uma vez com 1 x PBS com 2% de FBS e coloridos durante 15 minutos à temperatura ambiente com os seguintes anticorpos monoclonais: isotiocianato de fluoresceína antimacaco rhesus CD3 (FITC, clone SP34; BD Pharmingen, San Jose, CA); ficoeritrina anti-humana CD4 (PE, clone M-T477; BD Pharmingen, San Jose, CA); proteína peridínica-clorofila anti-humana CD8 (PerCP; clone SK1; BD Pharmingen, San Jose, CA); e alofococianina anti-humana CD20 (APC, clone L27; BD Pharmingen, San Jose, CA). Em seguida, as células foram lavadas uma vez com 1 x PBS com 2% de FBS, 0,02% de azida e novamente suspensas em 1 x PBS com 1% de paraformaldeído. A análise FACS foi efetuada num Citómetro de Fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) e mediante a utilização de Software CellQuest. A percentagem de depleção de células CD4+ ou CD8+ era habitualmente > 95% (dados não apresentados).

Quadro 18. Respostas ELISpot de IFN- γ específicas de VIH totais nas semanas 10 e 16 em PBLs não fracionados e vazios de células CD4+ ou CD8+

		Semana 10			Semana 16	
ID do Grupo	Não fracionados	Vazios de CD4	Vazios de CD8	Não fracionados	Vazios de CD4	Vazios de CD8
2d	1501 ±632	1494 ±801	364 ±77	902 ±173	758 ±141	431 ±93
3a	2524 ±789	1239 ±662	997 ±222	1821 ±906	1059 ±689	539 ±175

		Semana 10			Semana 16	
ID do Grupo	Não fracionados	Vazios de CD4	Vazios de CD8	Não fracionados	Vazios de CD4	Vazios de CD8
3c	1484 ±359	908 ±268	536 ±147	1532 ±556	856 ±308	607 ±203
3cE	6651 ±1326	10.563 ±3388	1921 ±274	13.361 ±2770	21.051 ±7067	2754 ±543
4a	1591 ±281	688 ±119	954 ±248	nr	nr	nr
controle	6±2	31±10	34±15	187±12	107 ±31	118 ±24
* As respostas ELISpot de IFN-gama específicas de VIH totais são apresentadas como a média de #SFC410⁶ PBLs não fracionados, vazios de CD4+ ou CD8+ ± erro padrão. ¹ nr, não realizado						

Os resultados ilustrados no Quadro 18 fornecem uma estimativa da percentagem relativa de células CTL específicas de VIH contra células auxiliares que participam numa determinada resposta imunitária induzida. É possível tirar algumas observações gerais a partir dos dados. Primeiro, os grupos 2d, 3a e 3c provocam magnitudes semelhantes de resposta imunitária celular ao VIH. O grupo 3a parece induzir um nível elevado de resposta imunitária, mas a quantidade de variação no ensaio é igualmente superior com esse grupo. Nos casos em que eletroporação foi utilizada em conjunto com a imunização, a magnitude da resposta imunitária aos plasmídeos no grupo 3c foi melhorada em cerca de 5 vezes a cerca de 10 vezes. Consulte o Quadro 18, compare 3cE e 3c. Convém igualmente mencionar que muitas mais células participaram na resposta imunitária como resultado da utilização de eletroporação com a imunização.

EXEMPLO 11. Titulações de Anticorpos Específicas de VIH

Induzidas por Imunização de Múltiplos Plasmídeos

Uma composição imunogénica (CI) com ADN de plasmídeos fornece diversas vantagens em relação a outros tipos de tecnologias de composição imunogénica atualmente utilizadas. Por exemplo, as ICs baseadas em ADN, em contraste com as ICs de subunidade baseadas na proteína convencional, permitem que o antígeno codificado seja eficazmente processado e apresentado através da via de processamento de antígenos de Classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). A via de processamento de antígenos de Classe I é crítica para a indução de respostas imunitárias mediadas por células T CD8+. Contudo, as ICs de subunidade baseadas na proteína convencional normalmente superam as ICs baseadas em ADN em termos da respetiva capacidade de provocar respostas de anticorpo específicas do antígeno.

Para a determinação de titulações de anticorpos específicas do lisado viral de VIH, as placas ELISA foram revestidas durante 18 horas a 4 °C com VIH-1_{MN} desfeito com detergente em 20 ng/poço, (Advanced Biotechnologies, Columbia, MD). O VIH-1_{MN} desfeito com detergente foi diluído num tampão carbonato/bicarbonato (15 mMNa₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6). Para a determinação de titulações de anticorpos específicas de env de VIH, as placas ELISA foram revestidas com gp120 6101 de VIH-1 purificado (atenciosamente fornecido por Larry Liao, Duke University, 20 ng/poço) diluído em 1 x PBS. A seguir às 18 horas de incubação com proteínas de VIH, as placas ELISA foram então lavadas cinco vezes com 1 x PBS contendo 0,1% de Tween 20 e obstruídas durante 2 horas à temperatura ambiente com 1 x PBS contendo 0,1% de Tween 20 e 3% de BSA. As amostras de soro de animais imunizados e de controlo foram diluídas com 1 x PBS contendo 1% de BSA e 0,1% de Tween-20, adicionadas às placas ELISA numa diluição inicial de 1:100 e ainda diluídas em 3 vezes nas placas. As amostras de soro

diluídas foram incubadas durante a noite a 4 °C com as placas revestidas com proteína. A detecção da imunoglobulina específica do antigénio foi realizada através da incubação de um anticorpo primário conjugado com biotina específico para IgG de primata durante 2 horas à temperatura ambiente. Este anticorpo foi diluído 1:30000 com 1 x PBS complementado com 0,1% de Tween-20, 1% de BSA, Accurate Scientific, Westbury, NY. Em seguida, o anticorpo primário foi lavado e seguido por uma incubação de 1 hora à temperatura ambiente de anticorpo secundário anti-biotina conjugado com peroxidase de rábano-estreptavidina (500 unidades/ml de stock, diluído 1:10000 com 1 x PBS complementado com 0,1% de Tween-20, 1% de BSA, Roche Immunochemical, Indianapolis, IN). Finalmente, a cor foi desenvolvida através da adição de 100 mcL/poço de TMB (3,3', 5,5'-tetrametil benzidina, Sigma). As titulações de anticorpos específicas do antigénio foram definidas como a recíproca da última diluição de soro fornecendo um O.D.₄₅₀ superior ao soro *naive* do mesmo animal (ou seja, semana 0) + 3 desvios padrão.

As titulações de envelope de VIH para determinados momentos durante as primeiras 16 semanas de imunizações de ADN de múltiplos plasmídeos foram determinadas e são ilustradas no Quadro 19. As titulações ELISA gp120 env 6101 de VIH-1 foram calculadas como a recíproca da última diluição de soro fornecendo um O.D.₄₅₀ superior ao soro *naive* do mesmo animal (ou seja, semana 0) + desvios padrão. Os dados do Quadro 19 (bem como do Quadro 20 abaixo) foram apresentados como a titulação $\log_{10}$ média $\pm$ erro padrão da média. Neste caso, as titulações env de VIH-1 $\leq 2,00$ representam uma titulação de ponto final inferior a 1:100 e estavam abaixo do limite de detecção.

Quadro 19. Titulações de anticorpos ELISA específicas de gp120 env 6101 de VIH-1 ao longo do tempo após a Imunização de ADN de múltiplos plasmídeos

ID do Grupo ¹	Titulação ELISA env de VIH-1*					
	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
2d	2,00 ±0,00	2,00 ±0,00	2,08 ±0,35	2,43 ±0,21	2,73 ±0,27	2,59 ±0,20
3a	2,00 ±0,00	2,00 ±0,00	2,16 ±0,10	2,64 ±0,32	2,95 ±0,28	2,56 ±0,29
3c	2,00 ±0,00	2,00 ±0,00	2,16 ±0,16	2,48 ±0,21	2,80 ±0,32	2,95 ±0,37
3cE	2,16 ±0,16	2,72 ±0,16	4,39 ±0,49	3,67 ±0,44	5,18 ±0,20	4,78 ±0,23
4a	nr ¹	Nr	nr	nr	nr	nr
controlo	2,00 ±0,00	2,08 ±0,08	2,00 ±0,00	2,16 ±0,10	2,16 ±0,16	2,32 ±0,16
*Os dados foram apresentados como a titulação $\log_{10}$ média $\pm$ erro padrão da média. As titulações env de VIH-1 $\leq 2,00$ representam uma titulação de ponto final inferior a 1:100 e estavam abaixo do limite de deteção.						
¹ nr indica não realizado						

Conforme ilustrado no Quadro 19, os animais do grupo 3c imunizados com composições imunogénicas baseadas numa combinação de plasmídeos contendo, pelo menos, um plasmídeo com mais de uma unidade de transcrição alcançaram as titulações sem eletroporação mais elevadas na semana 16. Contudo, os resultados para os grupos 2d e 3a foram um pouco semelhantes, mas com os animais do grupo 3a a mostrarem as titulações mais elevadas nas semanas 8 e 10. Consulte o Quadro 19, compare 3a com 2d e 3c. Uma composição imunogénica baseada numa combinação de plasmídeos contendo, pelo menos, um plasmídeo com mais de uma unidade de transcrição e recebendo eletroporação-eletoestimulação com imunização desenvolveu

indiscutivelmente as titulações mais elevadas para a proteína envelope de VIH. Consulte o Quadro 19, compare 3c com 3cE.

O total de titulações de VIH para todo o lisado de vírus foi determinado para as semanas 2, 4, 6, 8, e 10, e as 16 semanas de imunizações de ADN de múltiplos plasmídeos são ilustradas no Quadro 20. As titulações ELISA específicas do lisado viral de VIH-1_{MN} foram determinadas como a recíproca da última diluição de soro fornecendo um O.D.₄₅₀ superior ao soro *naive* do mesmo macaco (ou seja, pré-imune) + 3 desvios padrão. Nesto Quadro, os dados foram apresentados como a titulação log₁₀ média ± erro padrão da média. Note que as titulações de anticorpos ≤1,70 representam uma titulação de ponto final inferior a 1:50 e estavam abaixo do limite de deteção. Os resultados do Quadro 20 na semana 16 eram semelhantes aos apresentados no Quadro 19.

Quadro 20. Titulações de anticorpos ELISA específicas de VIH-1 Totais ao longo do tempo após a vacinação de ADN de múltiplos plasmídeos

ID do Grupo	Titulação ELISA de VIH-1 total*					
	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
2d	1,70 ±0,00	1,70 ±0,00	1,75 ±0,05	1,75 ±0,05	2,04 ±0,28	1,70 ±0,00
3a	1,75 ±0,05	1,75 ±0,05	1,70 ±0,00	1,70 ±0,00	1,70 ±0,00	1,70 ±0,00
3c	2,06 ±0,19	2,11 ±0,18	1,75 ±0,05	1,88 ±0,13	1,85 ±0,07	1,90 ±0,06
3cE	1,88 ±0,13	1,88 ±0,13	3,46 ±0,53	2,38 ±0,34	4,36 ±0,16	3,75 ±0,29
4a	nr ¹	nr	nr	nr	nr	nr
controlo	1,70 ±0,00	1,75 ±0,05	1,70 ±0,00	1,70 ±0,00	1,91 ±0,21	1,91 ±0,21

ID do Grupo	Titulação ELISA de VIH-1 total*					
	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
*Os dados foram apresentados como a titulação $\log_{10}$ média $\pm$ erro padrão da média. As titulações de anticorpos $\leq 1,70$ representam uma titulação de ponto final inferior a 1:50 e estavam abaixo do limite de deteção. ¹ nr indica não realizado						

EXEMPLO 12. Efeito da Imunização de Múltiplos Plasmídeos em Vários Parâmetros Serológicos e no Peso Corporal nos Macacos

As contagens de glóbulos brancos do sangue (WBC) periférico nos macacos utilizados no estudo foram determinadas ao longo do tempo através da análise da contagem sanguínea completa e apresentadas como a WBC média ($\times 1000/\text{ml}$) $\pm$ erro padrão. Consulte o Quadro 21.

Quadro 21. Contagens WBC totais ($\times 1000$) em macacos imunizados com vacinas de ADN de plasmídeo com e sem eletroporação

				Semana				
ID do Grupo	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	10,3 $\pm 1,1$	8,8 $\pm 1,4$	8,1 $\pm 1,0$	7,2 $\pm 0,7$	7,1 $\pm 1,0$	8,6 $\pm 0,7$	6,9 $\pm 0,9$	6,6 $\pm 0,4$
3a	8,6 $\pm 1,4$	5,5 $\pm 0,8$	7,9 $\pm 1,3$	6,0 $\pm 0,9$	6,3 $\pm 1,0$	7,3 $\pm 1,1$	7,8 $\pm 1,1$	8,0 $\pm 1,6$
3c	9,4 $\pm 1,4$	6,3 $\pm 0,6$	8,0 $\pm 0,8$	7,0 $\pm 0,8$	7,3 $\pm 0,9$	9,9 $\pm 0,9$	8,4 $\pm 1,4$	7,8 $\pm 1,2$
3cE	11,0 $\pm 1,7$	12,1 $\pm 1,5$	8,2 $\pm 1,1$	18,4 $\pm 2,0$	11,0 $\pm 1,3$	13,1 $\pm 1,3$	9,3 $\pm 0,9$	7,9 $\pm 0,5$
4a	11,6 $\pm 0,8$	10,3 $\pm 1,4$	8,9 $\pm 0,8$	8,0 $\pm 0,8$	8,2 $\pm 0,5$	7,9 $\pm 0,5$	8,3 $\pm 0,7$	nr ¹
controlo	7,6 $\pm 0,9$	5,6 $\pm 0,7$	7,1 $\pm 0,9$	5,7 $\pm 0,6$	5,9 $\pm 0,7$	7,6 $\pm 1,3$	5,6 $\pm 0,5$	6,6 $\pm 0,7$

				Semana				
ID do Grupo	-2	0	2	4	6	8	10	16
* As contagens de glóbulos brancos do sangue (WBC) periférico conforme determinado através da análise da contagem sanguínea completa são apresentadas como a média WBC ($\times 1000/\text{ml}$) $\pm$ erro padrão. ¹ nr, não realizado								

As contagens de glóbulos vermelhos do sangue (RBC) periférico nos animais utilizados no estudo foram determinadas ao longo do tempo através da análise da contagem sanguínea completa e apresentadas como a RBC média ($\times 10^8/\text{ml}$) $\pm$ erro padrão. Consulte o Quadro 22.

Os níveis de hemoglobina do sangue periférico (g/dL) nos animais utilizados no estudo foram determinados ao longo do tempo através da análise da contagem sanguínea completa e apresentados como o nível de hemoglobina médio $\pm$ erro padrão. Consulte o Quadro 23.

A imunização de múltiplos plasmídeos com os plasmídeos e as composições imunogénicas descritas no Quadro 7 não produziu quaisquer efeitos adversos nas WBCs, nas RBCs e nos níveis de hemoglobina nos animais utilizados neste estudo. Consulte os Quadros 21 a 23. Um efeito positivo importante foi detetado quando foi utilizada a eletroporação com a composição imunogénica utilizada para imunizar o grupo 3cE. Neste grupo, o número de WBC aumentou significativamente durante o estudo. Consulte o Quadro 21.

Quadro 22. Contagens RBC totais ($\times 10^6$) em macacos imunizados com vacinas de ADN de plasmídeo com e sem eletroporação

				Semana				
ID do Grupo	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	5,60 $\pm 0,12$	5,64 $\pm 0,03$	5,62 $\pm 0,08$	5,69 $\pm 0,09$	5,70 $\pm 0,11$	5,67 $\pm 0,11$	5,74 $\pm 0,06$	5,91 $\pm 0,08$

				Semana				
ID do Grupo	-2	0	2	4	6	8	10	16
3a	5,61 ±0,19	5,36 ±0,17	5,39 ±0,17	5,40 ±0,13	5,39 ±0,15	5,53 ±0,18	5,32 ±0,14	5,70 ±0,16
3c	5,39 ±0,13	5,32 ±0,14	5,43 ±0,09	5,46 ±0,13	5,38 ±0,14	5,45 ±0,10	5,52 ±0,13	5,69 ±0,09
3cE	5,63 ±0,15	5,91 ±0,09	5,80 ±0,07	5,60 ±0,21	5,87 ±0,10	5,57 ±0,13	5,70 ±0,07	5,75 ±0,1
4a	5,99 ±0,11	5,68 ±0,09	5,97 ±0,08	5,77 ±0,11	5,84 ±0,07	5,79 ±0,12	5,54 ±0,10	nr ¹
controlo	5,69 ±0,18	5,49 ±0,13	5,57 ±0,09	5,63 ±0,09	5,61 ±0,08	5,66 ±0,09	5,73 ±0,12	5,94 ±0,13
* As contagens de glóbulos vermelhos do sangue (RBC) periférico foram determinadas através da análise da contagem sanguínea completa e apresentadas como a média RBC (x10 ⁸ /ml) ± erro padrão.								

Quadro 23. Níveis de hemoglobina totais em macacos imunizados com vacinas de ADN de plasmídeo com e sem eletroporação

				Semana				
ID do Grupo	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	12,5 ±0,3	12,7 ±0,2	12,5 ±0,2	12,6 ±0,2	12,5 ±0,1	12,6 ±0,2	12,9 ±0,2	13,1 ±0,2
3a	13,1 ±0,3	12,6 ±0,3	12,6 ±0,3	12,5 ±0,3	12,6 ±0,3	13,0 ±0,3	12,8 ±0,4	13,4 ±0,2
3c	12,7 ±0,3	12,6 ±0,2	12,7 ±0,2	12,7 ±0,2	12,6 ±0,4	13,0 ±0,3	13,2 ±0,3	13,5 ±0,3
3cE	12,8 ±0,3	13,4 ±0,2	13,0 ±0,2	13,1 ±0,3	13,4 ±0,2	12,9 ±0,2	13,0 ±0,1	13,3 ±0,2
4a	13,5 ±0,3	13,1 ±0,2	13,5 ±0,2	13,1 ±0,2	13,2 ±0,2	13,1 ±0,2	12,5 ±0,2	nr ¹
controlo	13,3 ±0,3	12,8 ±0,3	13,0 ±0,2	12,9 ±0,2	13,0 ±0,2	13,2 ±0,1	13,6 ±0,3	13,9 ±0,3

				Semana				
ID do Grupo	-2	0	2	4	6	8	10	16
* Os níveis de hemoglobina do sangue periférico (g/dL) conforme determinado através da análise da contagem sanguínea completa são apresentados como o nível de hemoglobina médio $\pm$ erro padrão. ¹ nr, não realizado								

Os níveis de plaquetas do sangue periférico conforme determinado nos animais utilizados no estudo foram determinados ao longo do tempo através da análise da contagem sanguínea completa e apresentados como o nível de plaquetas médio ($\times 1000$) $\pm$ erro padrão. Consulte o Quadro 24.

Os níveis de percentagem de hematócritos nos animais utilizados no estudo foram determinados ao longo do tempo através da análise da contagem sanguínea completa e apresentados como o nível de percentagem de hematócritos médio $\pm$ erro padrão. Consulte o Quadro 25.

Os números de linfócitos totais do sangue periférico conforme determinado nos animais utilizados no estudo foram determinados ao longo do tempo através da análise da contagem sanguínea completa e apresentados como o número de linfócitos totais médio $\pm$ erro padrão. Consulte o Quadro 26.

Os números de linfócitos T CD3⁺ totais do sangue periférico nos animais utilizados no estudo foram determinados ao longo do tempo através da análise da contagem sanguínea completa e apresentados como o número de linfócitos T CD3⁺ totais médio $\pm$ erro padrão. Consulte o Quadro 27.

Os números de linfócitos Th CD3⁺CD4⁺ totais do sangue periférico nos animais utilizados no estudo foram determinados ao longo do tempo através da análise da contagem sanguínea completa e apresentados como o número de linfócitos Th CD3⁺CD4⁺ totais médio $\pm$ erro padrão. Consulte

				Semana				
ID do Grupo	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	404 ±42	433 ±19	399 ±21	411 ±16	392 ±30	420 ±13	448 ±17	394 ±21
3a	419 ±41	418 ±31	399 ±28	441 ±25	402 ±30	411 ±20	450 ±35	380 ±17
3c	454 ±19	404 ±13	418 ±21	405 ±19	391 ±13	423 ±41	381 ±23	381 ±27
3cE	384 ±29	389 ±30	414 ±31	389 ±33	431 ±33	315 ±33	400 ±24	347 ±24
4a	364 ±21	373 ±9	339 ±16	368 ±15	355 ±16	357 ±16	360 ±19	nr ¹
controle	458 ±39	412 ±33	386 ±47	383 ±14	386 ±43	414 ±35	409 ±27	378 ±34

* Os níveis de plaquetas do sangue periférico conforme determinado através da análise da contagem sanguínea completa são apresentados como o nível de plaquetas médio (x1000) ± erro padrão.

¹ nr, não realizado

Quadro 25. Percentagem de hematócritos em macacos imunizados com vacinas de ADN de plasmídeo com e sem eletroporação

				Semana				
ID do Grupo	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	38,3 ±0,9	38,5 ±0,5	37,8 ±0,6	38,6 ±0,4	38,4 ±0,4	38,6 ±0,5	38,9 ±0,4	40,2 ±0,5
3a	39,9 ±1,0	37,7 ±0,8	38,4 ±1,1	38,3 ±0,9	38,0 ±0,8	39,7 ±1,1	38,3 ±1,1	40,7 ±0,7
3c	38,9 ±0,8	37,8 ±0,8	38,7 ±0,5	38,8 ±1,1	38,4 ±1,1	39,3 ±0,9	39,7 ±0,9	40,6 ±0,8
3cE	39,1 ±0,9	40,6 ±0,5	39,7 ±0,6	39,6 ±0,9	40,9 ±0,5	39,0 ±0,6	40,0 ±0,3	39,9 ±0,5
4a	41,3 ±0,8	38,8 ±0,6	40,8 ±0,5	39,6 ±0,4	40,1 ±0,6	39,8 ±0,6	37,9 ±0,5	nr ¹
controle	40,3 ±1,0	38,5 ±0,6	39,3 ±0,4	39,4 ±0,4	39,6 ±0,5	40,3 ±0,5	40,8 ±0,7	41,8 ±0,7
* Os níveis de percentagem de hematócritos conforme determinado através da análise de contagem sanguínea completa são apresentados como o nível de percentagem de hematócritos médio ± erro padrão. ¹ nr, não realizado								

Quadro 26. Números de linfócitos totais em macacos imunizados com vacinas de ADN de plasmídeo com e sem eletroporação

				Semana				
ID do Grupo	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	3444 ±554	4399 ±521	3952 ±578	4038 ±462	3646 ±677	4631 ±574	3600 ±581	3018 ±422
3a	2955 ±613	2901 ±452	2706 ±405	2910 ±434	2804 ±459	3631 ±714	3186 ±775	3814 ±736
3c	3213 ±448	3097 ±369	3192 ±407	3343 ±559	3417 ±699	4268 ±667	3098 ±678	3925 ±805

				Semana				
ID do Grupo	-2	0	2	4	6	8	10	16
3cE	3157 ±331	3737 ±718	4441 ±608	2737 ±383	4835 ±822	5286 ±987	4927 ±575	4385 ±612
4a	4850 ±348	3763 ±381	4268 ±339	3471 ±149	4544 ±363	3494 ±248	3408 ±248	nr ¹
controle	2638 ±230	3685 ±784	3280 ±349	3037 ±334	3828 ±456	4392 ±465	3451 ±358	3470 ±220

* Os números de linfócitos totais do sangue periférico conforme determinado através da análise da contagem sanguínea completa são apresentados como o número de linfócitos total médio ± erro padrão.

¹ nr, não realizado

Quadro 27. Números de linfócitos T CD3⁺ totais em macacos imunizados com vacinas de ADN de plasmídeo com e sem eletroporação

				Semana				
ID do Grupo	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	1778 ±356	2469 ±265	2167 ±306	2299 ±257	2051 ±356	2917 ±313	2261 ±318	1852 ±218
3a	1697 ±291	1796 ±269	1681 ±255	1910 ±327	1822 ±322	2536 ±450	2344 ±619	2772 ±523
3c	1862 ±215	1815 ±175	1862 ±187	1949 ±279	2080 ±341	2679 ±313	2019 ±385	2458 ±426
3cE	1716 ±223	1926 ±421	2718 ±427	1417 ±241	3139 ±560	3437 ±680	3229 ±360	2928 ±457
4a	2848 ±240	2141 ±263	2481 ±265	1881 ±95	2851 ±328	2153 ±212	2141 ±224	nr ¹
controle	1455 ±85	2188 ±484	1883 ±218	1749 ±258	2334 ±382	2789 ±334	2352 ±341	2291 ±197

* Sangue periférico

Quadro 28. Números de linfócitos Th CD3⁺CD4⁺ totais em macacos imunizados com vacinas de ADN de plasmídeo com e sem eletroporação

				Semana				
ID do Grupo	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	1117 ±226	1463 ±197	1348 ±219	1371 ±190	1317 ±225	1770 ±208	1435 ±225	1457 ±266
3a	934 ±143	1007 ±158	986 ±156	1084 ±191	1078 ±198	1425 ±242	1291 ±322	1535 ±287
3c	1132 ±167	1108 ±130	1178 ±129	1195 ±176	1283 ±209	1598 ±208	1229 ±224	1480 ±256
3cE	1034 ±155	1115 ±194	1622 ±267	827 ±124	1752 ±271	1917 ±347	1673 ±165	1628 ±165
4a	1774 ±220	1362 ±202	1528 ±202	1171 ±91	1743 ±247	1363 ±163	1360 ±174	nr ¹
controle	877 ±79	1292 ±259	1162 ±117	1109 ±155	1430 ±239	1659 ±226	1437 ±178	1353 ±139
* Os números de linfócitos Th CD3⁺CD4⁺ totais do sangue periférico conforme determinado através da análise da contagem completa sanguínea são apresentadas como o número de linfócitos Th CD3⁺CD4⁺ total médio ± erro padrão. ₁ nr, não realizado								

Quadro 29. Números de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ totais em macacos imunizados com vacinas de ADN de plasmídeo com e sem eletroporação

				Semana				
ID do Grupo	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	627 ±141	1008 ±105	807 ±96	908 ±87	729 ±147	1137 ±131	811 ±103	678 ±92
3a	729 ±159	778 ±118	691 ±94	823 ±139	729 ±120	1111 ±224	1041 ±285	1254 ±251

				Semana				
ID do Grupo	-2	0	2	4	6	8	10	16
3c	663 ±61	661 ±69	635 ±61	709 ±102	744 ±122	1023 ±111	712 ±151	884 ±149
3cE	626 ±78	774 ±229	1067 ±169	542 ±114	1409 ±334	1431 ±348	1528 ±206	1270 ±294
4a	1005 ±47	721 ±70	901 ±74	628 ±53	994 ±95	699 ±64	718 ±58	nr ¹
controle	540 ±92	876 ±252	695 ±151	625 ±141	870 ±172	1104 ±184	872 ±215	880 ±131
* Os números de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ totais do sangue periférico conforme determinado através da análise da contagem sanguínea completa são apresentados como o número de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ total médio ± erro padrão. ¹ nr, não realizado								

Quadro 30. Números de linfócitos CD20⁺ totais em macacos imunizados com vacinas de ADN de múltiplos plasmídeos com e sem eletroporação

				Semana				
ID do Grupo	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	1468 ±309	1287 ±347	1369 ±403	1131 ±328	1337 ±391	1300 ±331	993 ±301	918 ±275
3a	1071 ±296	857 ±204	859 ±218	767 ±175	782 ±195	799 ±229	575 ±115	746 ±189
3c	1143 ±269	994 ±205	1155 ±264	1089 ±283	1083 ±340	1322 ±380	902 ±295	1175 ±356
3cE	1081 ±140	968 ±139	1221 ±156	923 ±125	1147 ±201	1080 ±173	1006 ±138	966 ±118
4a	1332 ±186	1127 ±162	1247 ±113	1255 ±148	1051 ±104	938 ±100	987 ±91	nr ¹
controle	984 ±161	1134 ±296	1171 ±169	1027 ±183	1206 ±221	1223 ±204	912 ±144	945 ±164

				Semana				
ID do Grupo	-2	0	2	4	6	8	10	16
*Os números de linfócitos CD20⁺ totais do sangue periférico conforme determinado através da análise da contagem sanguínea completa são apresentados como o número de linfócitos CD20⁺ total médio $\pm$ erro padrão. ¹nr, não realizado								

A imunização de múltiplos plasmídeos com os plasmídeos e as composições imunogénicas descritos no Quadro 7 também não produziu quaisquer efeitos adversos nas contagens de plaquetas (Quadro 24), percentagem de hematócritos (Quadro 25), números de linfócitos totais (Quadro 26), números de linfócitos T CD3⁺ totais (Quadro 27), números de linfócitos Th CD3⁺CD4⁺ totais (Quadro 28), números de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ totais (Quadro 29) e números de linfócitos T CD20⁺ totais (Quadro 30) nos animais utilizados neste estudo. Novamente, nestas análises foi detetado um efeito positivo nos números de linfócitos totais (Quadro 26), números de linfócitos T CD3⁺ totais (Quadro 27), números de linfócitos Th CD3⁺CD4⁺ totais (Quadro 28), números de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ totais (Quadro 29) quando a eletroporação foi utilizada em conjunto com a composição imunogénica formulada com bupivacaína para imunizar o grupo 3cE. Neste grupo, o número de linfócitos em cada uma destas categorias aumentou significativamente em momentos durante o estudo.

Os pesos corporais dos animais utilizados no estudo foram monitorizados semanalmente. Os pesos corporais (kg) foram apresentados como o peso corporal médio $\pm$ erro padrão. Consulte o Quadro 31.

Quadro 31. Peso corporal (kg) de macacos imunizados com vacinas de ADN de múltiplos plasmídeos com e sem eletroporação

				Semana				
ID do Grupo	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	3,74 ±0,2	3,63 ±0,27	3,84 ±0,29	3,93 ±0,28	3,98 ±0,29	4,16 ±0,29	4,00 ±0,28	4,05 ±0,28
3a	3,63 ±0,19	3,56 ±0,19	3,74 ±0,22	3,75 ±0,22	3,83 ±0,25	3,98 ±0,23	3,85 ±0,25	3,96 ±0,25
3c	3,70 ±0,23	3,65 ±0,20	3,87 ±0,24	3,97 ±0,25	4,16 ±0,25	4,26 ±0,29	4,14 ±0,26	4,28 ±0,30
3cE	3,67 ±0,23	3,91 ±0,23	4,03 ±0,28	3,99 ±0,26	4,04 ±0,28	4,12 ±0,25	4,06 ±0,27	4,14 ±0,30
4a	3,67 ±0,19	3,72 ±0,21	3,83 ±0,22	3,77 ±0,19	3,85 ±0,18	3,71 ±0,18	3,72 ±0,14	nr ¹
controle	3,61 ±0,23	3,66 ±0,20	3,91 ±0,18	4,03 ±0,19	4,15 ±0,18	4,24 ±0,19	4,21 ±0,20	4,29 ±0,21
* Os pesos corporais (kg) são apresentados como o peso corporal médio ± erro padrão. ¹nr, não realizado								

Finalmente, esta análise indica que a imunização de múltiplos plasmídeos com os plasmídeos e as composições imunogénicas descritos no Quadro 7 também não produziu quaisquer efeitos adversos nos pesos corporais (Quadro 31) dos animais utilizados neste estudo.

Exemplo 13. Estudos de Imunização Murinos Utilizando Composições Imunogénicas que Compreendem Quatro Plasmídeos em que Cada Um Tem Uma Unidade de Transcrição Única

Os exemplos anteriores sugerem que em situações em que a resposta imunitária total tem de ser maximizada, pode ser vantajoso utilizar uma composição imunogénica baseada numa combinação de plasmídeos com uma unidade de transcrição única que expressa um único antigénio por plasmídeo. Neste

exemplo, os estudos de imunização murinos foram efetuados para comparar a funcionalidade imunogénica de composições imunogénicas baseadas em quatro plasmídeos com composições imunogénicas baseadas em três plasmídeos. Mais particularmente, a funcionalidade imunogénica de uma composição imunogénica baseada em quatro plasmídeos individuais que orientam a expressão de seis genes de VIH-1 incluindo gag, pol, env e apenas uma fusão de genes nef-tat-vif foi comparada com as composições imunogénicas baseadas em três plasmídeos individuais que orientam a expressão de seis genes de VIH-1 incluindo env, uma fusão de genes gag-pol e uma segunda fusão de genes nef tat-vif. A funcionalidade imunogénica foi avaliada como capacidade relativa de várias composições imunogénicas baseadas em ADN de três ou quatro plasmídeos para provocar respostas imunitárias mediadas por células específicas de múltiplos antígenos em ratinhos Balb/c. Os genes de VIH e as sequências foram descritos no Exemplo 1. As composições imunogénicas de três plasmídeos dos grupos 3a e 3c foram as mesmas conforme descrito nos Exemplos 8 e 9. Consulte os Quadros 1 e 32.

Composições Imunogénicas e Imunização

Os vetores de expressão de ADN de plasmídeo que codificam gp160 env de VIH, p55 gag, pol (ou uma fusão gag-pol), ou uma proteína de fusão nef-tat-vif foram utilizados como composições imunogénicas experimentais, e a estrutura principal do vetor de expressão vazio foi utilizada como um vetor de composição imunogénica de controlo. Para ver o estudo, consulte o Quadro 32 abaixo. A expressão de genes de VIH pelos vários vetores de expressão foi confirmada através de *Western blot* após a transfeção transitória das células de rabdomiossarcoma (RD) humano. Consulte os Exemplos 4 a 7.

O grupo 3a tem três plasmídeos cada um com um plasmídeo com unidade de transcrição única, mas em que dois

dos antígenos são proteínas de fusão (gag-pol e nef-tat-vif). O grupo 3c tem igualmente três plasmídeos, em que dois dos plasmídeos têm uma unidade de transcrição única e o terceiro plasmídeo tem duas unidades de transcrição completas. Consulte o Quadro 32. Apenas um dos antígenos é expresso como uma proteína de fusão (nef-tat-vif). O grupo 4a tem quatro plasmídeos cada um com um plasmídeo com unidade de transcrição única, mas em que apenas um dos antígenos é uma proteína de fusão (nef-tat-vif).

O adjuvante utilizado para estes estudos foi igualmente ministrado através de um plasmídeo de ADN. Neste exemplo, todos os animais foram coinjetados com 25 µg de plasmídeo n.º 212 que codifica genes p35 e p40 IL-12 murina e expressa IL-12 murina. Consulte o Quadro 1.

Os ratinhos Balb/c foram imunizados de modo intramuscular com um total de 100 doses µg de ADN conforme descrito no Quadro 32. Em todos os casos, as composições imunogénicas foram formuladas com 0,25% de bupivacaína e injetadas nos músculos quadrícipites num volume de 100 µl. Dez dias após a segunda imunização, os animais foram sacrificados e o soro e os baços foram isolados para ensaios imunes. Os baços foram utilizados para medir células segregadas IFN-gama específicas de antígeno utilizando ensaios ELISPOT conforme descrito abaixo.

Animais

Para estes estudos, foram utilizadas fêmeas de ratinhos Balb/c com 4 a 6 semanas de idade. Os ratinhos foram mantidos de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, National Academic Press, Washington, DC, 1996). Além disso, os procedimentos para a utilização e tratamento dos ratinhos foram aprovados pelo Institutional Animal Care and Use Committee de Wyeth Research.

Quadro 32. Estudo Murino – Duas Imunizações

N.º do Grupo ¹	N.º do Plasmídeo	Descrição do plasmídeo	ADN Total (ug)	N.º de ratinhos	Plano de Imunização (semana)
3a	111	HCMV-gag/pol	33	8	0 - 3
	104	HCMV-ntv	33		
	101	HCMV-env	33		
3c	102	HCMV-gag	33	8	0 - 3
	103	HCMV-pol	33		
	202	HCMV-ntv, SCMV-env	33		
4a	101	HCMV-env	25	8	0 - 3
	102	HCMV-gag	25		
	103	HCMV-pol	25		
	104	HCMV-ntv	25		
5	001	Controlo de vetor	100	4	0 - 3
Os grupos ¹ 3a e 3c utilizam as mesmas composições imunogénicas apresentadas no Quadro 3.					

Os dados ilustrados no Quadro 33 indicam que o aumento do número de plasmídeos de expressão de antigénios de 3 para 4 na composição imunogénica não produziu nenhum aumento drástico na resposta imunitária às proteínas de VIH. Consulte o Quadro 33.

Quadro 33. Respostas Imunitárias Murinas Depois de Duas Imunizações

ID do Grupo	Resposta* específica de gag	Resposta específica de pol	Resposta específica de env	Resposta específica de ntv#	Resposta específica de VIH total
Controlo	3	0	9	1	13

ID do Grupo	Resposta* específica de gag	Resposta específica de pol	Resposta específica de env	Resposta específica de ntv#	Resposta específica de VIH total
3a	163	247	1564	116	2090
3c	436	1155	671	83	2345
4a	295	662	1150	123	2229
* As respostas ELISPOT de IFN-gama específicas do antigénio são apresentadas como as células de formação de pontos (#SFC/10⁶ esplenocitos) que excretam interferão-gama por 10⁶ esplenocitos. # ntv, proteína de fusão nef-tat-vif					

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Wyeth Sidhu, Maninder K. Egan, Michael I Israel, zimra Eldridge, John

<120> PLASMÍDEO COM TRÊS UNIDADES DE TRANSCRIÇÃO COMPLETAS E COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNITÁRIA AO VIH

<130> AM101565

<160> 6

<170> PatentIn versão 3.2

<210> 1

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 2

<211> 6

<212> DNA

<213> Vírus da imunodeficiência humana tipo 1

<400> 2

tttttt 6

<210> 3

<211> 6

<212> DNA

<213> Vírus da imunodeficiência humana tipo 1

<220>

<221> misc_difference

<222> (1)..(1)

<223> mutação "read-through"

<220>

<221> misc_difference

<222> (4)..(4)

<223> mutação "read-through"

<220>

<221> misc_difference

<222> (6)..(6)

<223> mutação "read-through"

<400> 3

Cttctg 6

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Vírus da imunodeficiência humana tipo 1

<400> 4

Lys Gly Arg Pro
1

<210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
 <400> 5

Asp Arg Gln Gly Thr Val Ser Phe Asn Phe
1 5 10

<210> 6
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
 <400> 6

Pro Gln Ile Thr
1

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- CA 2012311 [0046]
- US 5158062 A [0057]
- US 5385839 A [0057]
- US 5585263 A [0058]
- WO 9961596 A [0058]
- US 5830877 A [0091]
- WO 9951259 A [0091]
- US 5965726 A [0093] [0139]
- US 5972596 A [0093] [0139]
- US 6174666 A [0093] [0139]
- US 6291664 A [0093] [0139]
- US 6414132 A [0093] [0139]
- WO 0146408 A [0093]
- WO 98110088 A [0100]
- WO 0055335 A [0101]
- US 5723127 A [0108] [0109]
- US 5078996 A [0108]
- WO 98177 A [0108]
- WO 9943839 A [0108] [0113]
- US 5457038 A [0109]
- US 5648467 A [0109]
- US 6168923 A [0109]
- US 4912094 A [0110]
- US 6113918 A [0110]
- US 5057540 A [0111]
- US 6207646 B [0111] [0115]

- WO 9313302 A [0111]
- WO 9219265 A [0111]
- WO 0018434 A [0112]
- WO 02098368 A [0112]
- WO 02098369 A [0112]
- WO 9817799 A [0113] [0117]
- WO 0051432 A [0113]
- WO 0066162 A [0113]
- US 6406705 B, Davis [0115]
- US 5593972 A [0117]
- US 5817637 A [0117]
- US 5380876 A [0117]
- US 5981505 A [0117]
- US 6383512 A [0117]
- US 5703055 A [0117]
- US 5739118 A [0117]
- US 5837533 A [0117]
- WO 9610038 A [0117]
- WO 941673 A [0117]
- WO 9921591 A [0120]
- WO 9945966 A [0124]
- WO 9820734 A [0128]
- US 5273525 A, G. A. Hofmann [0131]
- US 5869326 A, G. A. Hofmann [0131]
- US 5993434 A, S. B. Dev [0131]
- US 6014584 A, G. A. Hofmann [0131]
- US 6068650 A, G. A. Hofmann [0131]
- US 6096020 A, G.A. Hofmann [0131]
- US 6233482 B, G.A. Hofmann [0131]
- US 6241701 B, G.A. Hofmann [0131]
- US 6418341 B, G.A. Hofmann [0131]
- US 6451002 B, S.B. Dev [0131]
- US 6516323 B, G.A. Hofmann [0131]
- US 6763264 B, G.A. Hofmann [0131]
- US 6110161 A, I. Mathiesen [0131]

- US 60576819 B [0140]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- Donnelly JJ et al. *Ann. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 617-48 [0002]
- Iwasaki A et al. *J Immunol*, 1997, vol. 158 (10), 4591-601 [0002]
- Wayne, C.L ; Bennett M. *Crit. Rev. Immunol.*, 1998, vol. 18, 449-484 [0002]
- Conry R.M. et al. *Gene Therapy*, 1996, vol. 3 (1), 67-74 [0004] [0005]
- Chen TT. et al. *Journal of Immunology*, 1994, vol. 153 (10), 4775-87 [0004]
- Ayyavoo V. et al. *AIDS*, 2000, vol. 14 (1), 1-9 [0004]
- Amara R.R. et al. *Vaccine*, 2002, vol. 20 (15), 1949-55 [0004]
- Singh G et al. *Vaccine*, 2002, vol. 20, 1400-1411 [0004]
- Sugimoto Y. et al. *Hum. Gen. Ther.*, 1995, vol. 6, 905-915 [0005]
- Mizoguchi H et al. *Mol. Ther.*, 2000, vol. 1, 376-382 [0005]
- Xiang et al. *Virology*, 1994, vol. 209, 564-579 [0046]
- Chapman et al. *Nucle. Acids. Res.*, 1991, vol. 19, 3979-3986 [0046]
- Montgomery et al. *DNA Cell Bio.*, 1993, vol. 12, 777-783 [0046]
- Fynan et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1993, vol. 90, 11478-11482 [0046]
- Eisenbraun et al. *DNA Cell Biol.*, 1993, vol. 12, 791-797 [0046]
- Wu et al. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 963-967 [0046]
- Wu; Wu. *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, 14621-14624 [0046]

- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, 3.18-3.2616.17-16.27 [0048] [0063]
- **Ausubel et al.** *Current Protocols in Molecular Biology.* Wiley Interscience Publishers, 1995 [0048]
- **Herrera et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2000, vol. 279, 548-551 [0051]
- **Amann et al.** *Gene*, 1988, vol. 69, 301-315 [0055]
- **Guzman et al.** *J. Bacteriol.*, 1995, vol. 177, 4121-4130 [0055]
- **Studier et al.** *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 60-89 [0055]
- **Gossen et al.** *Science*, 1995, vol. 268, 1766-1769 [0056] [0100]
- **Magari et al.** *J clin Invest*, 1997, vol. 100, 2865-2872 [0056]
- **Maniatis, T. et al.** *Science*, 1987, vol. 236, 1237 [0057]
- **Goins W.F. et al.** *J. Virology*, 1994, vol. 68, 2239-2252 [0057] [0143]
- **Soares, K. J. et al.** *Virology*, vol. 70, 5384-5394 [0057] [0143]
- **Goins W.F. et al.** *J. Virology*, 1999, vol. 73, 519-532 [0057] [0143]
- **Hammarskjold ; Zolotukhin et al.** *J. Virol*, 1994, vol. 68, 944-7952 [0058]
- **Tabemero et al.** *J. Virol.*, 1997, vol. 71, 95-101 [0058]
- **W. Sheay et al.** *Biotechniques*, 1993, vol. 15 (5), 856-62 [0060]
- **S.Y. Kim et al.** *J Biotechnol.*, 1993, vol. 14 (2), 183-7 [0060]
- **B. Han B. ; J.T. Zhang.** *Mol Cell Biol*, 2002, vol. 22 (21), 7372-84 [0060]
- **S. Vivinus et al.** *Eur J Biochem.*, 2001, vol. 268 (7), 1908-17 [0060]

- **A. Oumard et al.** *Mol Cell Biol.*, 2000, vol. 20 (8), 2755-9 [0060]
- **Y. Takebe et al.** *Mol Cell Biol.*, 1988, vol. 8 (1), 466-472 [0060]
- **Wasylyk et al.** *Nucleic Acid Res.*, 1984, vol. 12, 5589-5608 [0061]
- **Ausubel et al.** *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 1989 [0063]
- **Herrera et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, vol. 279, 548-551 [0070]
- **Boshart et al.** *Cell*, 1985, vol. 41, 521-530 [0099]
- **No et al.** *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1996, vol. 93, 3346-3351 [0100]
- **Gossen et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 5547-5551 [0100]
- **Harvey et al.** *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1998, vol. 2, 512-518 [0100]
- **Wang et al.** *Nat. Biotech.*, 1997, vol. 15, 239-243 [0100]
- **Wang et al.** *Gene Ther.*, 1997, vol. 4, 432-441 [0100]
- **Magari et al.** *J. Clin. Invest.*, 1997, vol. 100, 2865-2872 [0100]
- **Li et al.** *Nat Biotech.*, 1999, vol. 17, 241-245 [0101]
- **Miyatake et al.** *J. Virol.*, 1997, vol. 71, 5124-32 [0101]
- **Sandig et al.** *Gene Ther.*, 1996, vol. 3, 1002-9 [0101]
- **Arbuthnot et al.** *Hum. Gene Ther.*, 1996, vol. 7, 1503-14 [0101]
- **Stein et al.** *Mol. Biol. Rep.*, 1997, vol. 24, 185-96 [0101]
- **Chen et al.** *J. Bone Miner. Res.*, 1996, vol. 11, 654-64 [0101]
- **Hansal et al.** *J. Immunol.*, 1988, vol. 161, 1063-8 [0101]

- **Andersen et al.** *Cell. Mol. Neurobiol.*, 1993, vol. 13, 503-15 [0101]
- **Piccioli et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 5611-5 [0101]
- **Piccioli et al.** *Neuron*, 1995, vol. 15, 373-84 [0101]
- **Gil ; Proudfoot.** *Cell*, 1987, vol. 49, 399-406 [0103]
- **Gil ; Proudfoot.** *Nature*, 1984, vol. 312, 473-474 [0103]
- **Cole, C. N. ; T. P. Stacy.** *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 2104-2113 [0103]
- **Schek; N ; Cooke, C. ; J. C. Alwine.** *Mol. Cell Biol.*, 1992, vol. 12, 5386-5393 [0103]
- **Gil, A. ; N. J. Proudfoot.** *Cell*, 1987, vol. 49, 399-406 [0103]
- **Batt, D. B ; G. G. Carmichael.** *Mol. Cell. Biol.*, 1995, vol. 15, 4783-4790 [0103]
- **Gimmi, E. R ; Reff, M. E. ; I. C. Deckman.** *Nucleic Acid Res.*, 1989 [0103]
- **Schek et al.** *Mol. Cell Biol.*, 1992, vol. 12, 5386-5393 [0104]
- **Carswell ; Alwine.** *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9, 4248 [0104]
- **Murthy K. G. ; Manley J. L.** *Genes Dev*, 1995, vol. 9, 2672-2683 [0105]
- **Takagaki Y. ; Manley J. L.** *Mol Cell Biol*, 1997, vol. 17, 3907-3914 [0105]
- **Takagaki et al.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, vol. 89, 1403-1407 [0105]
- **Remington: The Science and Practice of Pharmacy.** 1995, vol. 2 [0124]
- **Electroporation and electrofusion in cell biology.** Plenum Publishing Corporation, 1989, 389-407 [0132]
- **Sambrook J ; Fritsch EF ; Maniatis T.** *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0141]

- **Megede, J. Z. et al.** *J. Virology*, 2003, vol. 77, 6197-6207 [0141]
- **Loeb et al.** *Nature*, 1989, vol. 340, 397 [0141]
- **Wu et al.** *J Virol*, 1996, vol. 70, 3378 [0141]
- **Larder et al.** *Nature*, 1987, vol. 327, 716-717 [0141]
- **Larder et al.** *PNAS*, 1989, vol. 86, 4803-4807 [0141]
- **Davies et al.** *Science*, 1991, vol. 252, 88-95 [0141]
- **Schatz et al.** *FEBS lett.*, 1989, vol. 257, 311-314 [0141]
- **Wiskerchen et al.** *J. Virol*, 1995, vol. 69, 376-386 [0141]
- **Leavitt et al.** *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 2113-2119 [0141]
- **Shaw KJ et al.** *Microbiol. Reviews*, 1993, vol. 57, 138-163 [0143]
- **Sadale, Y et al.** *J. Bacteriol.*, 1980, vol. 141, 1178-1182 [0143]
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Research Council, National Academic Press, 1996 [0177] [0193] [0239]

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição imunogénica para a utilização num método de indução de uma resposta imunitária ao vírus da imunodeficiência humana (VIH) num hospedeiro vertebrado, em que a referida composição imunogénica consiste:

a) num primeiro plasmídeo de ADN que consiste numa unidade de transcrição única que consiste numa sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão gag-pol de VIH, em que a referida unidade de transcrição única é ligada de modo funcional a elementos reguladores incluindo um promotor e um sinal de poliadenilação;

(b) num segundo plasmídeo de ADN que consiste

(i) numa primeira unidade de transcrição que consiste numa sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de fusão nef-tat-vif de VIH ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um primeiro promotor e um primeiro sinal de poliadenilação;

(ii) numa segunda unidade de transcrição que consiste numa sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido envelope de VIH ligado de modo funcional a elementos reguladores incluindo um segundo promotor e um segundo sinal de poliadenilação;

em que os referidos primeiro e segundo promotores derivam de unidades de transcrição diferentes; e em que os referidos primeiro e segundo sinais de poliadenilação derivam de unidades de transcrição diferentes; e

em que a direção de transcrição para a referida primeira unidade de transcrição é na direção oposta da direção de transcrição da referida segunda unidade de transcrição; ou em que a direção de transcrição para a referida primeira unidade de transcrição é na mesma direção da direção de transcrição da referida

segunda unidade de transcrição e as referidas primeira e segunda unidades de transcrição são separadas por uma região de separador de, pelo menos, uma quilobase de pares;

(c) num terceiro plasmídeo de ADN que consiste num ADN de plasmídeo que codifica um adjuvante; e

(d) pelo menos, num entre um agente facilitador de transfeção, veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

2. A composição imunogénica de acordo com a reivindicação 1, em que o referido agente facilitador de transfeção é bupivacaína.

3. A composição imunogénica de acordo com a reivindicação 1, em que os referidos promotores são seleccionados a partir do grupo que consiste no promotor do gene *immediate early* do citomegalovírus humano (HCMV), promotor do citomegalovírus símio (SCMV), promotor do citomegalovírus murino (MCMV), promotor associado a latência 1 (LAP1) do vírus herpes simplex (HSV), promotor do vírus símio 40, promotor do fator de alongamento 1 alfa humano e promotor da desmina específica das células musculares humanas.

4. A composição imunogénica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por os referidos sinais de poliadenilação serem seleccionados a partir do grupo que consiste no sinal de poli(A) da beta-globina de coelho, na poliA sintética, poli A da timidina quinase do HSV, poli A da alfa-globina humana, poli A do SV40, poli A da beta-globina humana, poli A do poliomavírus e poli A da hormona de crescimento bovino.

5. A composição imunogénica de acordo com a reivindicação 3, em que o referido promotor no referido primeiro

plasmídeo é o promotor do gene *immediate early* do citomegalovírus humano (HCMV).

6. A composição imunogénica de acordo com a reivindicação 4, em que o referido sinal de poliadenilação no referido primeiro plasmídeo é o sinal de poliadenilação poli A da hormona de crescimento bovino.

7. A composição imunogénica de acordo com a reivindicação 3, em que o referido primeiro promotor no referido segundo plasmídeo é o promotor do gene *immediate early* citomegalovírus humano (HCMV).

8. A composição imunogénica de acordo com a reivindicação 4, em que o referido primeiro sinal de poliadenilação no referido segundo plasmídeo é o sinal de poliadenilação poli A do SV40.

9. A composição imunogénica de acordo com a reivindicação 1, em que o referido polipéptido de fusão nef-tat-vif de VIH é uma proteína de fusão nef, tat e vif (NTV) expressa a partir de uma fusão dos genes nef, tat e vif (ntv) de VIH.

10. A composição imunogénica de acordo com a reivindicação 3, em que o referido segundo promotor no referido segundo plasmídeo é o promotor do citomegalovírus símio (SCMV).

11. A composição imunogénica de acordo com a reivindicação 4, em que o referido segundo sinal de poliadenilação no referido segundo plasmídeo é o sinal de poliadenilação da hormona de crescimento bovino (BGH).

12. A composição imunogénica de acordo com a reivindicação 1, em que o referido terceiro plasmídeo de ADN codifica o adjuvante IL-12.

13. Utilização de uma composição imunogénica de acordo com o definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12 no fabrico de um medicamento para imunizar um hospedeiro vertebrado contra os antigénios seleccionados.

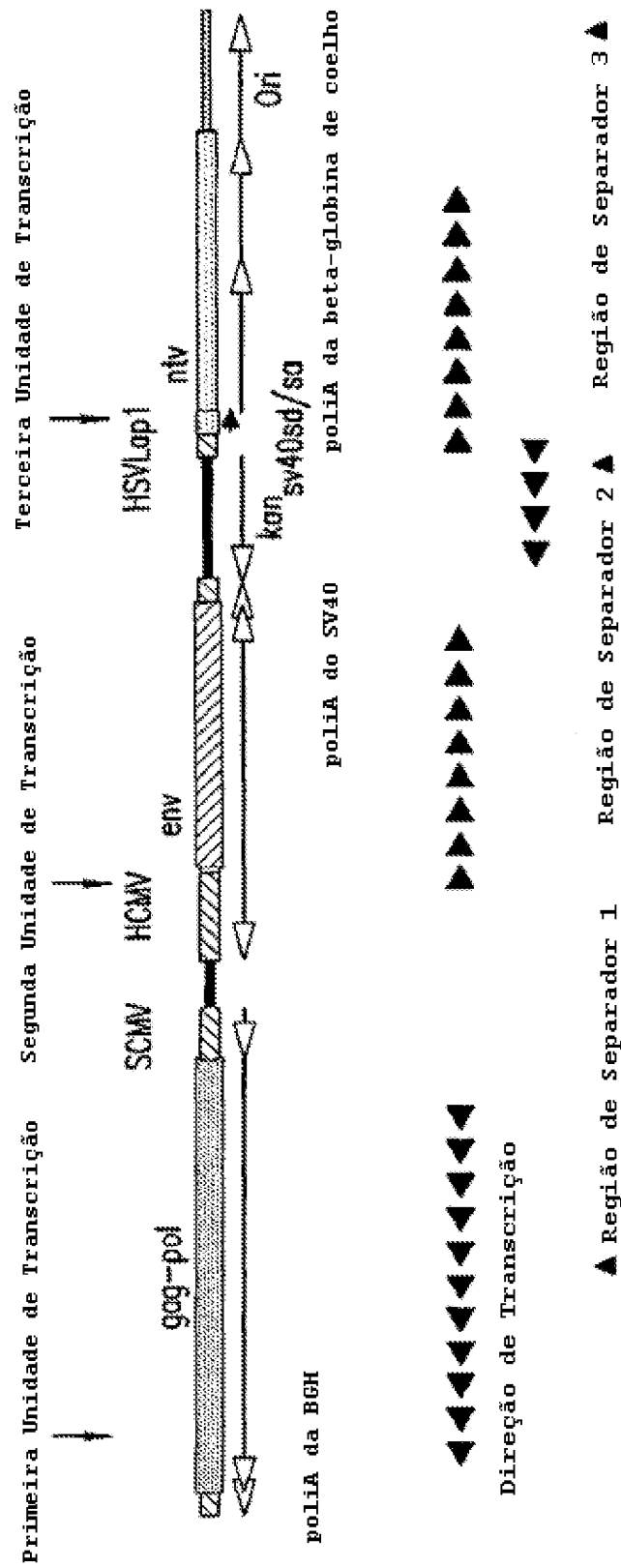


FIG.1

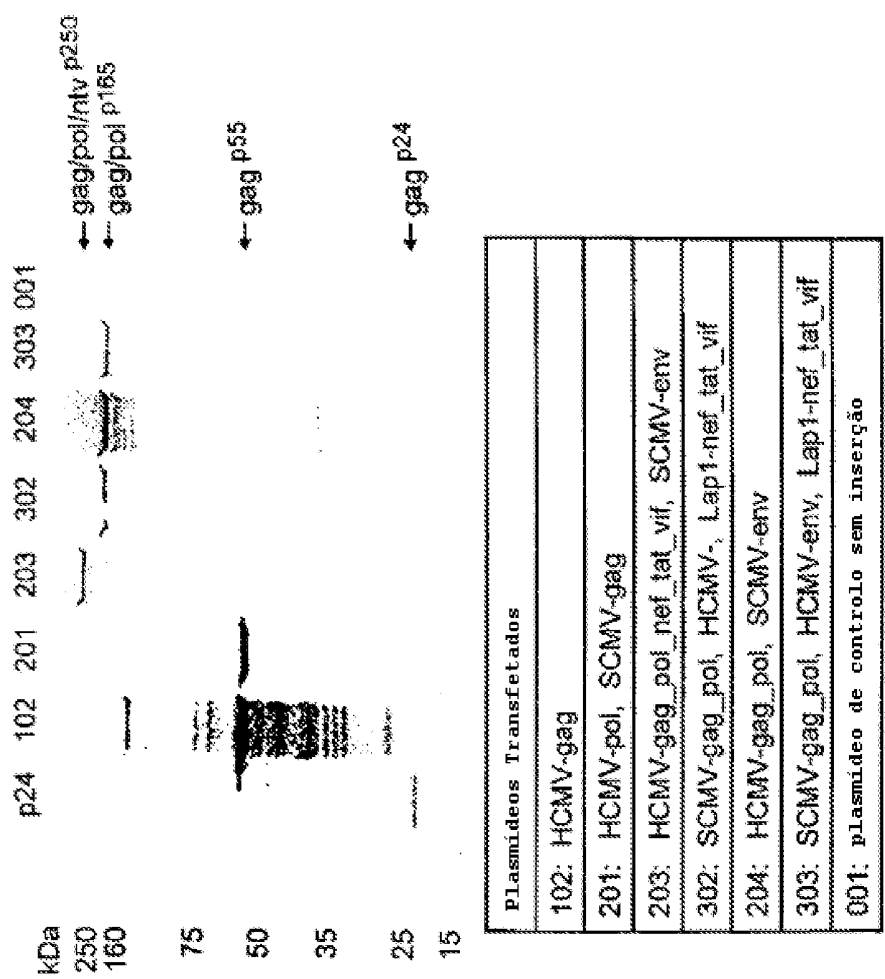
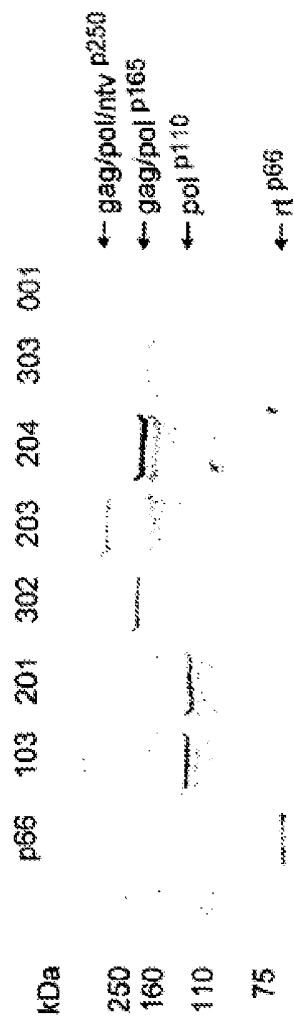
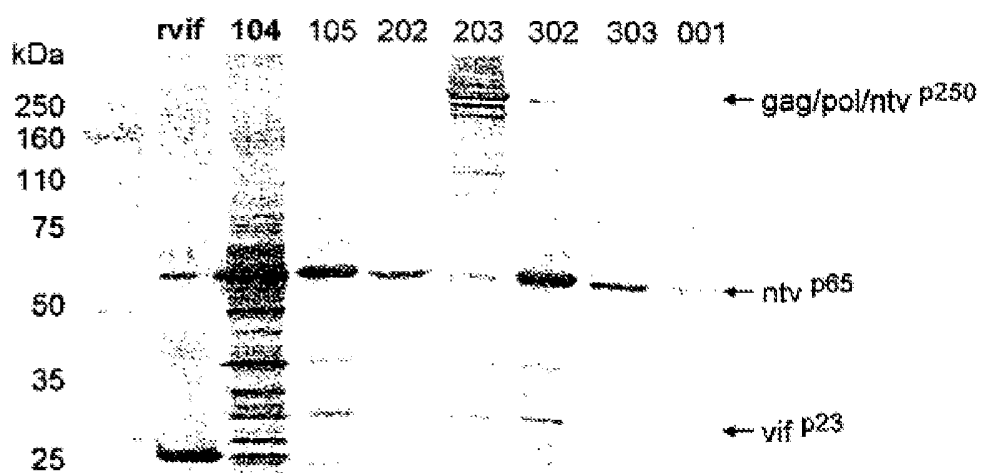


FIG.2



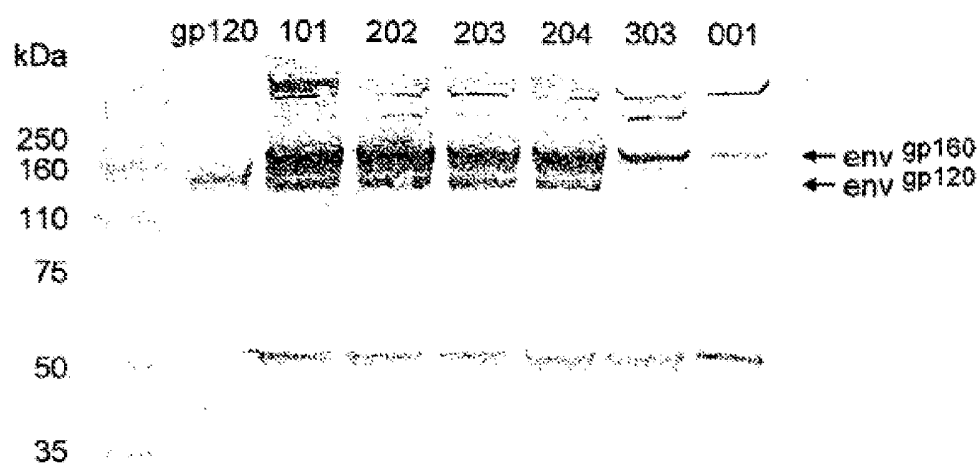
Plasmídeos Transfetados
103: HCMV-pol
201: HCMV-pol, SCM-V-gag
302: SCM-V-gag_pol, HCMV-, Lap1-nef_tat_vif
203: HCMV-gag_pol_nef_tat_vif, SCM-V-env
204: HCMV-gag_pol, SCM-V-env
303: SCM-V-gag_pol, HCMV-env, Lap1-nef_tat_vif
001: plasmídeo de controlo sem inserção

FIG.3



Plasmídeos Transfetados
104: HCMV-ntv
105: Lap1-ntv
202: HCMV-ntv, SCMV-env
203: HCMV-gag/pol/nef/tat/vif, SCMV-env
302: SCMV-gag/pol, HCMV-, Lap1-nef/tat/vif
303: SCMV-gag/pol, HCMV-env, Lap1-nef/tat/vif
001: plasmídeo de controle sem inserção

FIG.4



Plasmídeos Transfetados
101: HCMV-env
202: HCMV-ntv, SCMV-env
203: HCMV-gag/pol/nef/tat/vif, SCMV-env
204: HCMV-gag/pol, SCMV-env
303: SCMV-gag/pol, HCMV-env, Lap1-ntv
001: plasmídeo de controle sem inserção

FIG.5

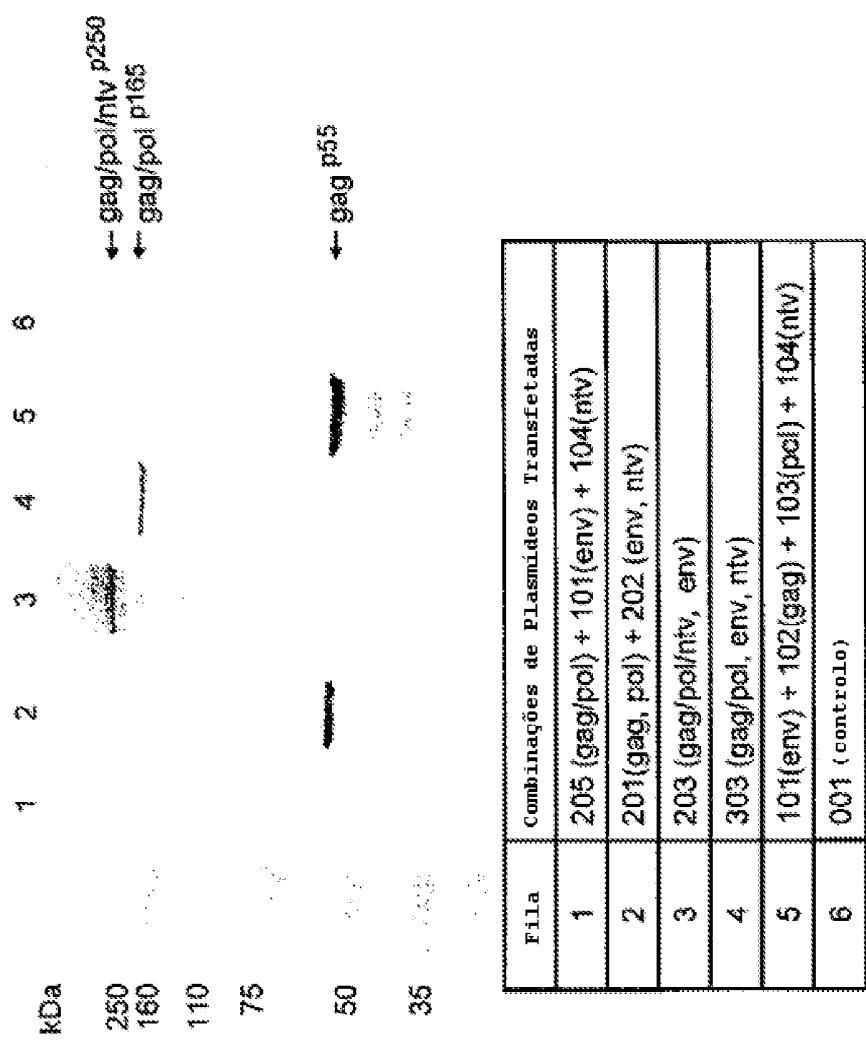
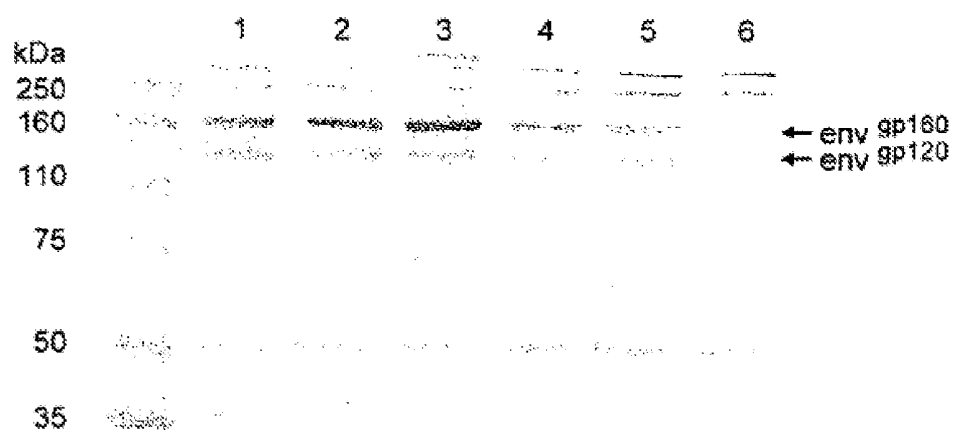
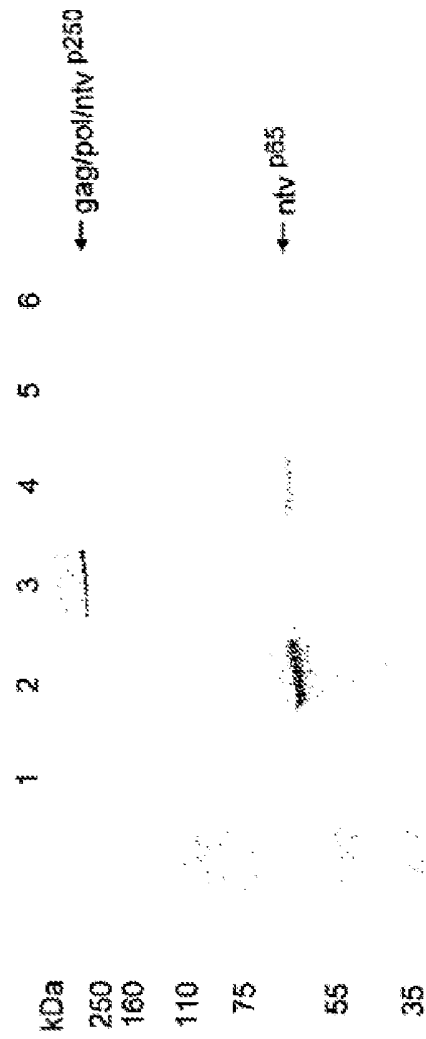


FIG.6



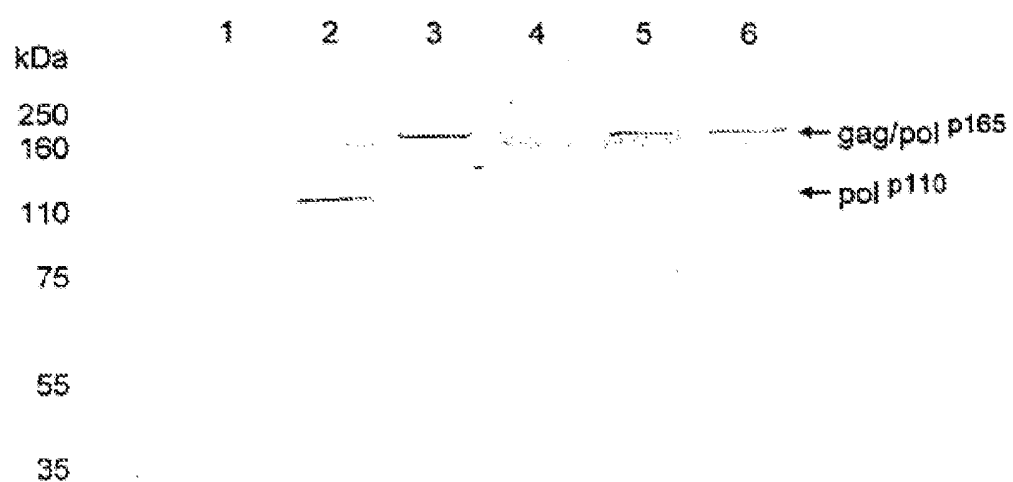
Fila	Combinações de Plasmídeos Transfetadas
1	205 (gag/pol) + 101(env) + 104(ntv)
2	201(gag, pol) + 202(env, ntv)
3	203(gag/pol/ntv, env)
4	303(gag/pol, env, ntv)
5	101(env) + 102(gag) + 103(pol) + 104(ntv)
6	001 (controle)

FIG.7



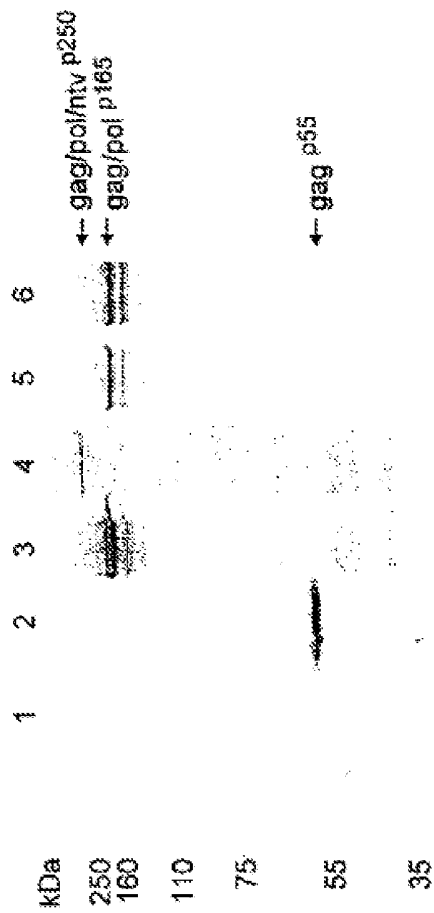
Fila	Combinações de Plasmídeos Transfetadas
1	205 (gag/pol) + 101(env) + 104(ntv)
2	201(gag, pol) + 202(env, ntv)
3	203(gag/pol/ntv, env)
4	303(gag/pol, env, ntv)
5	101(env) + 102(gag) + 103(pol) + 104(ntv)
6	001 (controle)

FIG.8



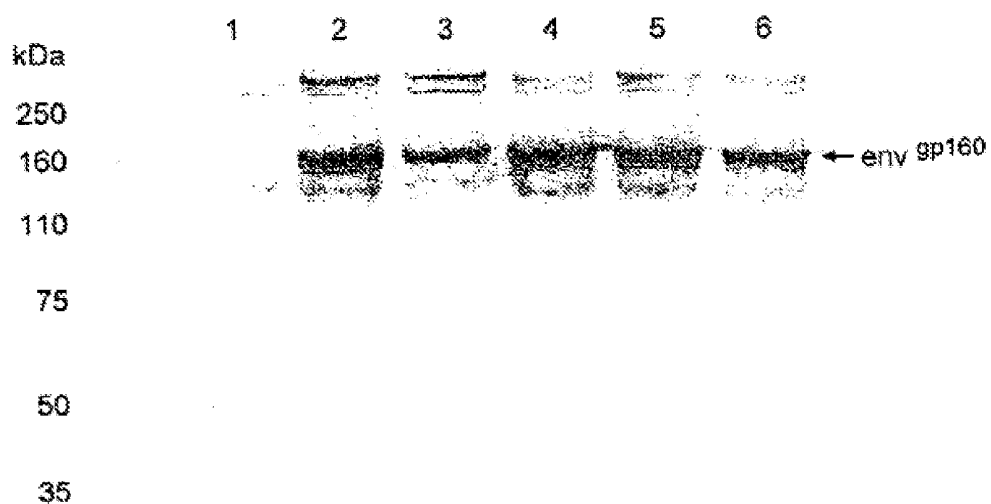
Fila	Combinações de Plasmídeos Transfetadas	Concentração de plasmídeos Transfetada (µg)
1	001 (controle)	2
2	201(gag, pol) + 202(ntv, env)	1+1
3	204(gag/pol, env) + 104(ntv)	1+1
4	203(gag/pol/ntv, env)	2
5	302(gag/pol, ntv) + 101(env)	1+1
6	303((gag/pol, env, ntv)	2

FIG.9



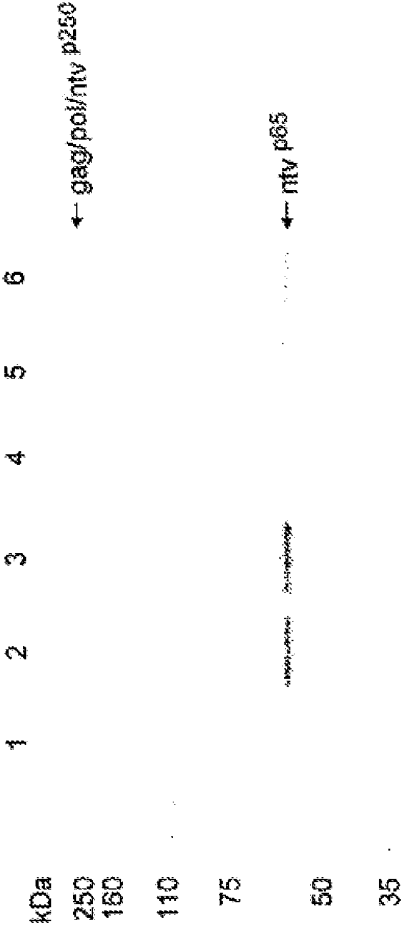
Fila	Combinações de Plasmídeos Transfetadas	Concentração de plasmídeos Transfetada (ug)
1	001 (controle)	2
2	201(gag, pol) + 202(ntv, env)	1+1
3	204(gag/pol, env) + 104(ntv)	1+1
4	203(gag/pol/ntv, env)	2
5	302(gag/pol, ntv) + 101(env)	1+1
6	303(gag/pol, env, ntv)	2

FIG.10



Fila	Combinações de Plasmídeos Transfetadas	Concentração de plasmídeos Transfetada (µg)
1	001 (controle)	2
2	201(gag, pol) + 202(ntv, env)	1+1
3	204(gag/pol, env) + 104(ntv)	1+1
4	203(gag/pol/ntv, env)	2
5	302(gag/pol, ntv) + 101(env)	1+1
6	303(gag/pol, env, ntv)	2

FIG.11



Lane	Combinações de Plasmídeos Transfetadas	Concentração de plasmídeos Transfetada (µg)
1	001 (controle)	2
2	201(gag, pol) + 202(ntv, env)	1+1
3	204(gag/pol, env) + 104(ntv)	1+1
4	203(gag/pol/ntv, env)	2
5	302(gag/pol, ntv) + 101(env)	1+1
6	303(gag/pol, env, ntv)	2

FIG.12