(11) Número de Publicação: **PT 1108035 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/37 (2006.01) ***C12N 15/86*** (2006.01)
C07K 14/25 (2006.01) ***A61K 48/00*** (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **1999.09.03**

(30) Prioridade(s): **1998.09.04 US 99291 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2001.06.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.08.08**
125/2007

(73) Titular(es):
SANOFI PASTEUR LIMITED
1755 STEELES AVENUE WEST TORONTO, ONTARIO M2R 3T4 **CA**

(72) Inventor(es):
JAMES TARTAGLIA **US**
FEI-LONG YAO **CA**
MICHEL H. KLEIN **CA**
DIANE M. GAJEWCZYK **CA**
ROY PERSSON **CA**

(74) Mandatário:
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **TRATAMENTO DE CANCRO CERVICAL**

(57) Resumo:
TRATAMENTO DE CANCRO CERVICAL

RESUMO

"Tratamento de cancro cervical"

Vectores para imunização de ADN contra cancro cervical que incluem uma molécula de ácido nucleico que codifica pelo menos um epítopo de células T não tóxico dos antigénios E6 e/ou E7 de uma estirpe de vírus do papiloma humano (HPV) associado a cancro cervical, tal como HPV-16, e um promotor acoplado operativamente à molécula de ácido nucleico para expressão da molécula de ácido nucleico num hospedeiro ao qual o vector é administrado.

DESCRIÇÃO

"Tratamento de cancro cervical"

CAMPO DO INVENTO

O invento refere-se a vectores e composições imunogénicas tal como definido nas reivindicações. Estes vectores e composições imunogénicas são úteis na imunoterapia do cancro, especificamente cancro cervical.

ANTECEDENTES DO INVENTO

O cancro cervical é a segunda causa de morte mais comum de mortes relacionadas com cancro em mulheres em todo o mundo. Existem dados tanto epidemiológicos como experimentais que relacionam a etiologia de cancro cervical com a infecção com vírus de papiloma humano (HPV) tipos 16 e 18. O vírus de HPV é prevalecente em 35 a 40% das mulheres jovens. Embora o tratamento num estágio precoce da doença seja relativamente bem sucedido, verifica-se doença recorrente em 15% das doentes. Os resultados em doentes com doença recorrente são relativamente fracos. Assim, é necessária uma nova abordagem terapêutica (referencias 1, 2, 3 - várias referencias são referidas entre parêntesis para descrever mais completamente o estado da arte a que se refere este invento. Encontra-se a informação bibliográfica completa para cada citação no final da especificação, imediatamente antes das reivindicações. A revelação destas referências é aqui incorporada por referência na presente revelação).

A forte associação entre infecção por HPV e cancro cervical sugere que uma estratégia exequível pode ser uma abordagem imunoterapêutica específica de antigénio viral no tratamento de cancro cervical. O objectivo da imunoterapia específica é estimular a resposta imunitária de um doente que apresente um tumor para atacar e erradicar lesões tumorais. Esta estratégia tornou-se exequível pela identificação de antigénios associados a tumor (TAA). A forte associação entre infecção por HPV-16 e cancro cervical tornou esta doença um bom candidato para intervenção imunoterapêutica (ref. 4).

Em cancros cervicais positivos para ADN de HPV, as proteínas oncogénicas E6 e E7 são expressas. A evidência experimental sugere que estas duas proteínas são responsáveis pela progressão carcinogénica de cancros cervicais dado que a sua expressão leva a um estado transformado e imortalizado em culturas celulares epiteliais humanas (ref. 5). Assim, estas duas proteínas são candidatos potenciais para imunoterapia específica de antigénio em cancros cervicais induzidos por HPV e são aqui avaliadas.

Embora permaneçam muitas questões relativas à natureza da imunidade a infecção por HPV natural e, portanto a cancro cervical, é evidente que existe uma componente imunitária dado que os indivíduos imunocomprometidos têm maior risco de desenvolver uma malignidade cervical (ref. 6). Além disso, esta imunidade é mais provavelmente mediada pelo ramo celular da resposta imunitária. Verificam-se infiltrados celulares extensos por exame de regressões espontâneas de tumores cervicais (ref. 7). Assim, parece ser necessária uma resposta celular específica de antigénio para tratar doentes de cancro cervical.

Embora a natureza do resultado de uma estratégia imunoterapêutica tenha sido identificada, a capacidade de induzir este tipo de resposta utilizando tecnologia de vacina actual é limitada. O desenvolvimento de vacina profilática para HPV tem-se focado em preparações de subunidades recombinantes consistindo de proteínas estruturais de virião L1 e L2. Em células eucarióticas, L1 (principal proteína de cápside) auto-organiza-se em partículas do tipo vírus de papiloma (VLP) (ref. 17). Embora L1 apenas seja suficiente para montagem de VLP, a co-expressão de L2 (proteína de cápside secundária) proporciona maior produção de cápside (ref. 18). Contrariamente, o desenvolvimento de vacina terapêutica tem sido tipicamente dirigido para a expressão de proteína E6 e/ou E7 de tipo selvagem. Os vectores de expressão utilizados incluem vírus *vaccinia* (por exemplo, tal como descrito em patente US N.º 5 744 133, (ref. 19, 20), alfavírus (por exemplo patente US N.º 5 843 723) ou outros poxvírus (por exemplo, patente US N.º 5 676 950). Assim, determinou-se que um vector de ADN que codifica antigénios de HPV implicado em progressão carcinogénica de doença é o método óptimo pelo qual

se pode conseguir uma estratégia imunoterapêutica bem sucedida.

No entanto, tal como previamente verificado, os antigénios de HPV E6 e E7 são supostamente oncogénicos e assim a imunização com uma construção de ADN que codifica qualquer ou ambas as proteínas pode resultar na indução de malignidade adicional (ref. 5, 10, 11). Assim, de modo a minimizar os riscos de toxicidade, codificou-se aqui uma molécula de E7 geneticamente desintoxicada numa construção de ADN. Esta molécula desintoxicada é modificada por deleção da região de ligação de retinoblastoma (Rb) (ref. 8, 9). Outro método de conseguir imunidade específica de antigénio sem os riscos concomitantes de transformação oncogénica é a utilização de uma estratégia de epítopo em que se administram apenas partes chave da molécula para induzir uma resposta imunitária específica (ref. 12 a 16). Esta abordagem é aqui descrita (apenas com objectivos ilustrativos; ou seja não é do invento tal como apresentado nas reivindicações) na concepção da construção de poliepítopos de ADN em que se ligam conjuntamente vários epítopos de células T derivados tanto de E6 como de E7. Fez-se aqui uma comparação destas duas abordagens num modelo murino de cancro cervical associado a HPV.

SUMÁRIO DO INVENTO

De acordo com o invento, proporciona-se um vector incluindo uma molécula de ácido nucleico que codifica um antigénio E7 de HPV-16 isento dos aminoácidos 21 a 26, em que a referida molécula de ácido nucleico está ligada operativamente a um promotor de citomegalovírus. Numa concretização, a molécula de ácido nucleico está contida no interior do plasmídeo CMV-3 tal como apresentado na figura 2. Numa concretização adicional, o vector é pCMV-dE7 tal como apresentado na figura 1. Os vectores do invento podem ser utilizados para administração a um hospedeiro para proporcionar uma resposta imunitária no hospedeiro, por exemplo, para imunoterapia de tumor causado por HPV, em particular cancro cervical.

O antigénio seleccionado para os vectores do presente invento é o antigénio E7, que se tinha previamente demonstrado ter uma capacidade protectora no sistema de vector *vaccinia*.

Existem preocupações sobre a toxicidade potencial com a utilização de uma forma nativa de E7 numa vacina, devido à sua capacidade de se ligar a proteína Rb e assim promover um estado oncogénico. Construiu-se aqui uma nova versão desintoxicada de E7 por deleção do local de ligação de Rb e incorporou-se em pCMV3 (figura 2) para proporcionar o vector pCMV-dE7 (figura 1) para imunização.

A sequência de codificação de E7 desintoxicada foi preparada a partir da sequência de codificação não modificada por substituição de aproximadamente 210 pb com ADN formado de oligonucleótidos hibridados. A sequência substituta omitiu uma porção de 18 nucleótidos que codificam a região de E7 envolvida na formação de complexo com proteínas da família de retinoblastoma celular (Rb), nomeadamente os aminoácidos 21 a 26 da proteína E7 nativa.

A imunização com a construção pCMV-dE7 resultou numa protecção significativa relativamente ao desenvolvimento de tumor após enxerto de células de tumor C3 vivas que expressam a molécula E7 de tipo selvagem, mostrando que a construção de ADN E7 pode ser utilizada com sucesso para estimular imunidade protectora, sem quaisquer riscos de imunidade associados.

Para avaliar a abordagem de células T (que é aqui descrita com objectivos meramente ilustrativos, tal como referido supra), preparou-se um mini-gene sintético contendo sequências de nucleótidos que codificam epítopos de células T de ambas as proteínas E6 e E7 de HPV-16 (figura 5A). Utilizou-se uma construção de ADN (pCMV3-HPVT#1) contendo o mini-gene (figura 6) para imunizar ratinhos. Os ratinhos imunizados com a construção de ADN da figura 6 foram 100% protegidos de desenvolvimento de tumor.

Os resultados destes estudos indicam que pode ser utilizada com sucesso imunização com ADN para proteger contra provocação com tumor C3 vivo e assim pode ser eficaz no tratamento clínico de cancro cervical.

Os vectores do presente invento incorporam um promotor de citomegalovírus. A molécula de ácido nucleico pode estar contida no interior do plasmídeo CMV-3 que contém o promotor precoce imediato de citomegalovírus incluindo sequências de facilitador e de intrão, juntamente com a cauda poli-A de hormona de crescimento bovino e um gene de resistência a canamicina. Os elementos de pCMV-3 apresentam-se na figura 2.

A molécula de ácido nucleico codifica um antigénio E7 desintoxicado de HPV-16 para evitar replicação de oncogene no hospedeiro. A desintoxicação é efectuada por remoção da sequência de ácido nucleico nativa, ácido nucleico que codifica os aminoácidos 21 a 26 de HPV-16. O vector contendo tal molécula de ácido nucleico pode ter as características de identificação de pCMV3-dE7, incluindo o mapa de restrição e elementos de construção, tal como apresentado na figura 1.

O presente invento, noutro aspecto, proporciona uma composição imunogénica para administração *in vivo* a um hospedeiro incluindo um vector tal como descrito supra, que pode incluir um transportador farmaceuticamente aceitável para tal. O presente invento, num aspecto adicional, proporciona um vector tal como descrito supra para utilização como um medicamento.

Ainda noutro aspecto do invento, proporciona-se a utilização de um vector tal como descrito supra para o fabrico de um medicamento para o tratamento de cancro cervical.

Os vectores do presente invento podem ser utilizados para imunizar um hospedeiro contra cancro cervical causado por vírus de papiloma humano (HPV). Os referidos vectores podem ser administrados ao hospedeiro numa quantidade eficaz na forma de uma composição imunogénica do invento.

DESCRIÇÃO SUCINTA DOS DESENHOS

A figura 1A é um mapa de um plasmídeo pCMV-dE7 incluindo plasmídeo pCMV-3 com E7 desintoxicado de HPV-16 nele inserido;

A figura 1B apresenta a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:1) de dE7 de HPV-16 amplificado por PCR (pSE859.2). Os

iniciadores de PCR 5' e 3' (SEQ ID NO: 2, 3) indicam-se nesta figura em caixas;

A figura 2 é um mapa do vector de plasmídeo pCMV3 contendo o promotor precoce imediato de CMV incluindo sequências de facilitador e de intrão, poliA de hormona de crescimento bovino (BGH PA) e resistência a canamicina (KN(R));

A figura 3 apresenta a montagem do vector de plasmídeo pCMV3 de pCMV2K;

A figura 4 é o mapa do vector de plasmídeo pEN-1;

A figura 5A apresenta a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:4, completa; SEQ ID NO:5, sequência de codificação) e sequência de aminoácidos derivada (SEQ ID NO:6) para um mini-gene de HPV sintético que codifica uma proteína que consiste de cinco epítopos de célula T de HPV 16 (do terminal NH_2- para o terminal -COOH) E7: 49 a 57, 11 a 20, 82 a 90, 86 a 93 e E6: 29 a 38. Introduziram-se três alaninas como espaçadores entre cada um dos epítopos;

A figura 5B apresenta a montagem de oligonucleótidos sintéticos contendo epítopos de HPV-16 de E6 e E7 para formar o mini-gene da figura 5A. Os cinco nucleótidos individuais indicam-se como I a V (SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11). Os epítopos de E6 e E7 indicam-se por cima das sequências específicas e os números correspondem à sequência de aminoácidos das proteínas E6 e E7 completas de HPV-16; e

A Figura 6 apresenta a montagem de pCMV3-HPVT#1 por inserção do mini-gene sintético apresentado na figura 5A no poliligante entre os locais *Sal*I e *Eco*RI do vector pCMV3 da figura 3.

DESCRIÇÃO GERAL DO INVENTO

O presente invento proporciona vectores e composições imunogénicas tal como descrito supra, que são úteis para uma abordagem imunoterapêutica do cancro cervical causado por vírus do papiloma humano (HPV) baseado em imunização com ADN.

Efectuaram-se uma série de experiências no sistema modelo de cancro cervical C3. Utilizando uma plataforma de entrega de ADN, avaliaram-se várias vacinas baseadas em antigénio E7 relativamente à sua capacidade de evitar o desenvolvimento de tumor após provocação com células de tumor vivas. Embora se tenha demonstrado que o antigénio E7 tem alguma capacidade protectora num sistema de vector *vaccinia*, tal como supramencionado existem preocupações sobre toxicidade potencial com a utilização de uma forma nativa de E7 numa vacina, devido à sua capacidade de se ligar a proteína Rb e assim promover um estado oncogénico. Assim, construiu-se uma construção de ADN que codifica uma versão "desintoxicada" (dE7) de E7 de HPV-16. A imunização com a construção de ADN de dE7 (pCMV3-dE7, figura 1) resultou numa protecção significativa de desenvolvimento de tumor após enxerto de células de tumor C3 vivas que expressam a molécula de E7 de tipo selvagem. Esta observação indica que se pode utilizar com sucesso uma construção de ADN dE7 para estimular imunidade protectora sem quaisquer riscos de toxicidade associados.

Foi também avaliada uma abordagem específica de epítopo (tal como discutido supra, com objectivos meramente ilustrativos, ou seja não do invento, tal como definido nas reivindicações). Utilizou-se uma construção de ADN composta de epítopos de células T derivados de ambas as proteínas E6 e E7 de HPV-16 para imunizar ratinhos (pCMV3-HPVT#1, figura 6). Verificaram-se resultados impressionantes no grupo de ratinhos imunizados com esta construção de poliepítopos, dado que se observou 100% de protecção de desenvolvimento de tumor.

É evidente para os peritos na arte, que as várias concretizações do presente invento, bem como a abordagem específica de epítopo aqui descrita, têm varias aplicações nos campos de vacinação, diagnóstico e tratamento de infecções por HPV. Apresenta-se adicionalmente infra uma discussão não limitativa adicional de tais utilizações.

Preparação e utilização da vacina

Podem preparar-se composições imunogénicas, adequadas para utilização como vacinas, a partir de genes, epítopos e vectores de HPV tal como aqui revelado. A vacina desencadeia uma resposta imunitária num indivíduo para induzir uma

resposta antitumoral protectora ou terapêutica. Podem preparar-se composições imunogénicas, incluindo vacinas, contendo o ácido nucleico como injectáveis, em soluções ou emulsões líquidas fisiologicamente aceitáveis para administração de polinucleótido. Os ácidos nucleicos em líquidos aceitáveis podem ser utilizados como agentes de imunização directos (por exemplo, tal como descrito geralmente em patente US N.º 5 589 466. Alternativamente, o ácido nucleico pode estar associado com lipossomas, tal como lipossomas de lecitina ou outros lipossomas conhecidos na arte, como um lipossoma de ácido nucleico (por exemplo, tal como descrito em WO 93/24640, ref. 21) ou o ácido nucleico pode estar associado com um adjuvante, tal como descrito mais detalhadamente infra. Os lipossomas incluindo lípidos catiónicos interactuam espontânea e rapidamente com polianiões tais como ADN e ARN, resultando em complexos lipossoma/ácido nucleico que capturam até 100% do polinucleótido. Além disso, os complexos policatiónicos fundem com membranas celulares, resultando numa entrega intracelular de polinucleótido que evita as enzimas de degradação do compartimento de lisossoma. O pedido PCT publicado WO 94/27435 descreve composições para imunização genética incluindo lípidos catiónicos e polinucleótidos. Podem ser utilizados vantajosamente agentes que auxiliam a absorção celular de ácido nucleico, tais como iões cálcio, proteínas virais e outros agentes auxiliares de transfecção.

As preparações imunogénicas de polinucleótido podem também ser formuladas como microcápsulas, incluindo partículas de libertação controlada biodegradáveis. Assim, a patente U.S. 5 151 264 descreve um transportador particulado de natureza fosfolípido/glicolípido/polissacárido que foi denominado Bio Vecteurs Supra Moléculaires (BVSM). Os transportadores particulados destinam-se a transportar várias moléculas com actividade biológica numa das suas camadas.

A patente U.S. 5 075 109 descreve encapsulação dos antigénios trinitrofenilados de hemocianina de lapa gigante e enterotoxina B de estafilococos em poli(DL-lactida-co-glicolida) 50:50. Sugerem-se outros polímeros para encapsulação, tais como poli(glicolida), poli(DL-lactida-co-glicolida), copolioxalatos, policaprolactona, poli(lactida-co-

caprolactona), poli(esteramidas), poliortoésteres e poli(ácido 8-hidroxibutírico) e polianidridos.

O pedido PCT publicado WO 91/06282 descreve um veículo de entrega incluindo várias microesferas bioadesivas e antigénios. As microesferas são de amido, gelatina, dextrano, colagénio ou albumina. Este veículo de entrega é particularmente devotado à absorção de vacina através da mucosa nasal. O veículo de entrega pode conter adicionalmente um facilitador de absorção.

Os vectores podem ser misturados com excipientes farmaceuticamente aceitáveis que são compatíveis com eles. Tais excipientes podem incluir água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol e suas combinações. As composições imunogénicas e vacinas podem conter adicionalmente substâncias auxiliadoras, tais como agentes molhantes ou emulsionantes, agentes de tamponamento de pH ou adjuvantes para melhorar a sua eficácia.

As composições imunogénicas e vacinas aqui proporcionadas podem ser administradas parentericamente, por injecção subcutânea, intravenosa, intradérmica ou intramuscular, possivelmente com pré-tratamento do local de injecção com um anestésico local. Alternativamente, as composições imunogénicas, formuladas de acordo com o presente invento, podem ser formuladas e entregues de uma forma a desencadear uma resposta imunitária nas superfícies mucosas. Assim, a composição imunogénica pode ser administrada a superfícies mucosas nasais, por exemplo, por via nasal ou oral (endogástrica). Alternativamente, podem ser desejáveis outros modos de administração incluindo supositórios e formulações orais. Os supositórios, aglutinantes e transportadores podem incluir, por exemplo, polialquilenoglicóis ou triglicéridos. As formulações orais podem incluir incipientes normalmente utilizados, tais como, por exemplo, sacarina, celulose e carbonato de magnésio de grau farmacêutico.

As preparações imunogénicas e vacinas podem ser administradas de uma forma compatível com a dosagem da formulação e em tal quantidade que será terapeuticamente eficaz, protectora e imunogénica. A quantidade a ser

administrada depende do indivíduo a ser tratado, incluindo, por exemplo, a capacidade do sistema imunitário do indivíduo sintetizar antigénios associados a tumor e seus anticorpos e, caso necessário, produzir uma resposta imunitária mediada por célula. As quantidades exactas do ingrediente activo necessárias para administração dependem do julgamento do médico assistente. No entanto, são facilmente determinadas as gamas de dosagem adequadas por um perito na arte e podem ser na gama de cerca de 1 µg a cerca de 1 mg dos vectores. Os regimes adequados para administração inicial e reforço são também variáveis, mas podem incluir uma administração inicial seguida por administrações subsequentes. A dosagem pode também depender da via de administração e variará de acordo com o tamanho do hospedeiro.

A imunogenicidade pode ser melhorada significativamente se os vectores forem co-administrados com adjuvantes, usualmente utilizados como uma solução de 0,05 a 0,1 porcento em solução salina tamponada de fosfato. Os adjuvantes aumentam a imunogenicidade de um antigénio mas não são necessariamente imunogénicos por si só. Os adjuvantes podem actuar retendo o antigénio localmente perto do local de administração para produzir um efeito de depósito que facilita uma libertação sustentada e lenta do antigénio às células do sistema imunitário. Os adjuvantes podem também atrair células do sistema imunitário a um depósito de antigénio e estimular tais células a desencadear respostas imunitárias.

Os agentes ou adjuvantes de imunoestimulação têm sido utilizados desde há muitos anos para melhorar as respostas imunitárias do hospedeiro a vacinas, por exemplo. Assim, foram identificados adjuvantes que melhoram a resposta imunitária a antigénios. Alguns destes adjuvantes são tóxicos, contudo, e podem provocar efeitos secundários indesejáveis, tornando-os desadequados para utilização em humanos e muitos animais. De facto, só são rotineiramente utilizados como adjuvantes em vacinas humanas e veterinárias hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio (denominados colectivamente habitualmente alúmen).

Uma vasta gama de adjuvantes extrínsecos e outros materiais imunomoduladores podem provocar respostas imunitárias potentes aos antigénios. Estes incluem saponinas

complexadas a antigénios de proteínas membranares para produzir complexos de estimulação imunitária (ISCOMS), polímeros Pluronic com óleo mineral, micobactérias mortas em óleo mineral, adjuvante completo de Freund, produtos bacterianos, tais como dipéptido de muramilo (MDP) e lipopolissacárido (LPS), bem como monoforil-lípido A, QS21 e polifosfazeno.

O vector pode ser entregue conjuntamente com uma molécula que dirija o vector a alvos de células seleccionadas incluindo células do sistema imunitário.

O polinucleótido pode ser entregue ao hospedeiro por vários procedimentos, por exemplo, Tang et al. (ref. 22) revelaram que a introdução de microprojécteis de ouro revestidos com ADN que codifica hormona de crescimento bovino (BGH) na pele de ratinhos resultou na produção de anticorpos anti-BGH nos ratinhos, enquanto Furth et al. (ref. 23) demonstraram que um injector de jacto pode ser utilizado para transfectar pele, músculo, gordura e tecido mamário de animais vivos.

EXEMPLOS

A revelação supra descreve de um modo geral o presente invento (e a abordagem de epítopo de célula T com propósitos meramente ilustrativos). Pode obter-se uma compreensão mais detalhada por referência aos seguintes exemplos específicos. Estes exemplos descrevem-se apenas com propósitos ilustrativos e não se pretende que limitem o âmbito do invento. Abrangem-se alterações de forma e substituições equivalentes tal como sugerido pelas circunstâncias ou para tornar prático. Apesar de aqui se terem utilizado expressões específicas tais expressões devem ser entendidas num sentido descritivo e não com objectivos limitativos.

Os métodos de genética molecular, bioquímica de proteínas e imunologia utilizados mas não explicitamente descritos nesta revelação e nestes exemplos encontram-se amplamente relatados na literatura científica e encontram-se abrangidos pelas capacidades dos peritos na arte.

Exemplo 1:

Este exemplo descreve o protocolo de imunização aqui utilizado.

Obtiveram-se ratinhos fêmea C57B1/6 pesando entre 18 e 20 gramas de Charles River (St. Constant, Quebeque, Canadá). Alojaram-se os ratinhos em micro-isoladores de acordo com directivas estabelecidas pelo Conselho Canadiano de Tratamento Animal ("Canadian Council on Animal Care") (CCAC). Incluíram-se dez animais em cada grupo de tratamento. No dia 0, imunizaram-se os ratinhos com 100 µg de cada uma das respectivas construções de ADN, por via intramuscular (i.m.) no músculo tibial anterior ou por via intradérmica (i.d.). Repetiram-se as imunizações, com doses equivalentes de cada construção, aos dias 21 e 42 do estudo. Obtiveram-se amostras de soro de ratinhos aos dias 20, 40 e 56.

Exemplo 2:

Este exemplo descreve o protocolo para provocação com células de tumor.

Duas semanas após a última dose de reforço com a construção de ADN seguindo o procedimento do exemplo 1, injectou-se cada ratinho por via subcutânea (s.c.) no cachaço com uma dose de 5×10^5 células vivas de tumor C3. A linha celular de tumor C3 foi gentilmente cedida por R. Offringa e C. Melief. A linha celular C3 foi criada por transfecção de células B6 de embrião de ratinho com o genoma completo de HPV-16 que foi transformado com o oncogene ras. É necessária a expressão das proteínas oncogénicas de HPV 16, E6 e E7 para manter o estado transformado.

Após administração das injecções, examinaram-se os ratinhos três vezes por semana durante o desenrolar do estudo. Efectuaram-se medidas de tumor utilizando craveiras calibradas. O volume da massa de tumor foi calculado utilizando a seguinte fórmula: volume= $ab^2/2$ em que a= diâmetro maior e b= menor das duas medições. Os ratinhos que permaneceram isentos de tumor durante um período de aproximadamente três meses após esta provocação inicial com

células de tumor vivas foram então tornados a provocar no dia 141 do estudo com a mesma dose e através da mesma via que a provocação inicial ao dia 57 descrito supra. Após a segunda provocação, monitoraram-se os ratinhos relativamente ao desenvolvimento de tumor tal como previamente descrito.

Exemplo 3:

Este exemplo descreve os imunoensaios IgG (EIA) específicos de E7 e dE7.

Revestiram-se placas de imunoensaio Nunc Maxisorp durante a noite com antigénios E7 recombinante ou dE7 recombinante a uma concentração de 10 µg/mL diluídos em tampão carbonato 50 mM pH 9,6. No dia seguinte lavaram-se as placas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e seguidamente bloquearam-se com solução de leite a 1% durante uma hora à temperatura ambiente. Após a etapa de bloqueio, lavaram-se as placas em PBS-T e adicionaram-se às placas as amostras de soro a diferentes diluições. Incubaram-se as amostras nas placas durante a noite a 4 °C. Removeram-se as amostras das placas por lavagem no dia seguinte com PBS-T e adicionou-se a cada poço um conjugado de IgG de ovelha anti-ratinho marcado com peroxidase a uma diluição 1/25 000. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente, lavaram-se as placas em PBS-T e revelou-se a reacção colorimétrica utilizando substrato TMB (ADI). Leram-se as reacções a 450 nm num leitor de placas Dynatech MR 5000 de 96 poços.

Exemplo 4:

Este exemplo descreve a construção de pCMV-dE7.

O plasmídeo pCMV3 contém segmentos de diferentes proveniências e apresentam-se os elementos da construção na figura 2. Sucintamente, o vector procariótico pBluescript SK (Stratagene) é o esqueleto de pCMV3 e foi modificado pela substituição do gene Amp^R por um gene Kan^R e a deleção da região f1 e LacZ. Obtiveram-se estas modificações por deleção das sequências entre os locais de restrição AhdI (nucleótido 2041) e Sac I (nucleótido 759) de pBluescript SK, que contém as sequências de Amp^R, da origem f1 e de LacZ.

Tornaram-se planas as extremidades de um fragmento PstI de 1,2 kb do plasmídeo pUC-4K (Pharmacia) contendo o gene Kan^R e ligou-se ao local AhdI do plasmídeo pBluescript SK modificado numa orientação contrária à dos ponteiros do relógio relativamente à sua transcrição. Ligou-se um fragmento SspI/PstI de 1,6 kb contendo as sequências do gene do promotor precoce imediato de citomegalovírus humano, do facilitador e do intrão A (denominado CMV na figura 2) à outra extremidade do gene Kan^R de tal modo que a transcrição do promotor CMV ocorra numa orientação segundo os ponteiros do relógio. Este procedimento produziu o plasmídeo pCMV2K, tal como apresentado na figura 3.

Removeu-se um fragmento de 0,2 kb contendo a sequência de sinalização de poliadenilação da hormona de crescimento bovina (BGH) do plasmídeo pEN-3 por restrição com XbaI seguido de tratamento com Klenow para produzir uma extremidade plana e seguidamente efectuou-se restrição com BamHI. Isolou-se o fragmento de 192 pb contendo o fragmento BGHpA por electroforese em gel de agarose. Preparou-se o plasmídeo pEN-3 por clonagem de bGHpA para pEN-1 (figura 4).

Restringiu-se então o plasmídeo pCMV2K com BglII, tratou-se com Klenow e restringiu-se com BamHI. Isolou-se então o fragmento de 4,2 kb (consultar figura 3) e ligou-se ao fragmento BGHpA de 192 pb previamente isolado para produzir o plasmídeo pCMV3.

Amplificou-se então por PCR o gene dE7 a partir do plasmídeo pSE859.2 utilizando iniciadores que introduziam um local PstI na extremidade 5' (SEQ ID NO:2 - CTGCAGCAGGCTAGCA TGCATGGAGATACACCT) e um local SalI na extremidade 3' (SEQ ID NO:12 - GTCGACTTATGGTTTCTGAGAACAGATGGGGCACA). Apresenta-se a sequência amplificada na figura 1B e contém a proteína E7 de HPV-16 desintoxicada. Inseriu-se o fragmento de PCR em pCR2.1 restringido com PstI e SalI (Invitrogen) e sequenciou-se a inserção (figura 1B). Subclonou-se então o fragmento de PstI a SalI para pCMV3 de PstI a SalI para produzir o plasmídeo pCMV-dE7 tal como apresentado na figura 1A.

Exemplo 5:

Este exemplo ilustra a utilização de pCMV-dE7 para proteger animais de desenvolvimento de tumor após enxerto com uma linha celular de tumor que expresse E7 de HPV-16 de tipo selvagem.

Imunizaram-se ratinhos quer com uma construção de ADN que codifica a proteína E7 desintoxicada (pCMV-dE7, preparada tal como descrito no exemplo 4; figura 1), quer com um controlo de ADN (pCMV-3; figura 2), quer com PBS por via intramuscular, seguindo o protocolo do exemplo 1. Após três imunizações sucessivas enxertaram-se células de tumor C3 vivas que expressam proteína E7 de tipo selvagem a uma dose de 5 X 10^5 células seguindo o protocolo do exemplo 2. Apresenta-se na tabela 1 infra, o número de ratinhos isentos de tumor após provocação com células vivas.

Aproximadamente um mês após provocação (dia 30), todos os ratinhos nos grupos de controlo (grupos de controlo pCMV-3 e PBS) apresentavam tumores palpáveis. Contrariamente, contudo, nenhum dos ratinhos no grupo imunizado pCMV-dE7 apresentou tumores palpáveis. Ao dia 60, um ratinho do grupo imunizado pCMV-dE7, que tinha sido anteriormente negativo relativamente a tumor, apresentou a indicação inicial de um tumor palpável. No dia 90, procedeu-se à eutanásia este ratinho devido ao elevado volume do tumor. Os ratinhos remanescentes do grupo imunizado pCMV-dE7 permaneceram contudo isentos de tumor. Assim, observou-se uma diferença significativa no estado isento de tumor entre os ratinhos do grupo imunizado com dE7 e dos grupos de controlo. Os resultados indicam assim que a imunização com uma construção de ADN que codifica uma molécula de E7 desintoxicada geneticamente (dE7) induziu uma resposta imunitária capaz de proteger o animal contra enxerto subsequente de células de tumor vivas.

Tabela 1

Percentagem de ratinhos isentos de tumor a vários pontos temporais após enxerto com células de tumor C3 vivas

	Dia 30 após provocação	**Dia 60 após provocação**	**Dia 90 após provocação**
CMV-dE7	100	90	90
Controlo de CMV-3	0	0	0
PBS	0	0	0

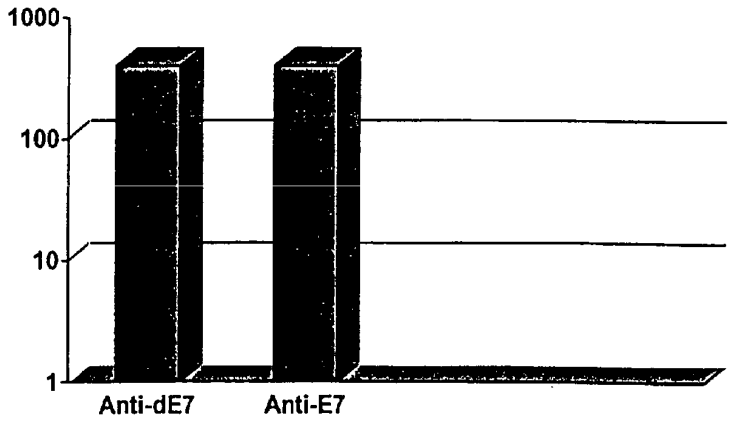
Exemplo 6:

Este exemplo ilustra que soros derivados de ratinhos imunizados com a construção pCMV-dE7 são reactivos com ambas as proteínas recombinantes E7 desintoxicada e E7 de tipo selvagem.

De modo a proporcionar evidência serológica que ratinhos imunizados com a proteína E7 desintoxicada geneticamente de acordo com o exemplo 5 poderiam gerar imunidade que apresentava reactividade cruzada com a proteína E7 de tipo selvagem, analisaram-se por EIA soros de ratinhos imunizados seguindo o procedimento do exemplo 3. A amostra de soro ensaiada foi derivada de uma amostra de sangue recolhida no dia 56, um dia antes de provocação com células de tumor vivas e duas semanas após a última imunização de reforço.

O título de anticorpo reactivo do soro, tal como apresentado na tabela 2 infra, foi equivalente quer este fosse ensaiado num EIA específico de dE7, quer num EIA específico de E7. Assim, ao nível de anticorpo, os anticorpos gerados por imunização com dE7 apresentaram reactividade cruzada com a proteína E7.

Tabela 2



Exemplo 7:

Este exemplo ilustra que a via específica de imunização tem um efeito significativo na indução de imunidade protectora.

Investigou-se o efeito da via intramuscular (i.m.) relativamente à via intradérmica (i.d.) de imunização de ADN na indução de imunidade antitumoral. Sucintamente, imunizaram-se ambos os grupos de ratinhos com a mesma construção (pCMV-dE7, preparada tal como descrito no exemplo 4; figura 1) a doses e com frequências descritas supra no exemplo 1. Contudo, um grupo foi imunizado por via i.m. enquanto que o outro grupo foi imunizado por via i.d.. Após provocação com células de tumor C3 vivas seguindo o procedimento do exemplo 2, o grupo imunizado por via i.d. apresentou desenvolvimento de tumor, em contraste flagrante com o grupo imunizado por via i.m. que se manteve isento de tumor. Assim, determinou-se que a vacinação com a construção de ADN dE7 desencadeou imunidade protectora contra provocação por células de tumor apenas quando a imunização ocorreu por via i.m.. Apresentam-se os resultados na seguinte tabela 3:

Tabela 3
Percentagem de ratinhos isentos de tumor após enxerto com células de tumor C3 vivas

	Dia 30 após provocação	**Dia 60 após provocação**	**Dia 90 após provocação**
CMV-dE7 i.m.	100	90	90
CMV-dE7 i.d.	0	0	0

Exemplo 8 : (com propósitos meramente ilustrativos)

Este exemplo descreve a preparação do plasmídeo pCMV3-HPVT#1.

Construiu-se o mini-gene sintético que codifica os cinco epítopos de célula T das proteínas E6 e E7 de HPV-16 (figura 5A) por síntese de oligonucleótidos utilizando um sintetizador de ADN Applied Biosystems 3AB. O mini-gene sintético montado utilizando cinco oligonucleótidos sintéticos (I a V, figura 5B) continha um local de restrição SalI na extremidade 5' e um local Eco RI na extremidade 3'. Este gene montado (figura 5) foi clonado no plasmídeo pCMV3 restringido com SalI/Eco RI para produzir o plasmídeo pCMV3-HPVT#1 tal como apresentado na figura 6. A construção de pCMV3 descreve-se no exemplo 3 e apresentam-se os elementos na figura 2.

Exemplo 9: (com propósitos meramente ilustrativos)

Este exemplo ilustra a utilização de pCMV3-HPVT#1 para induzir imunidade protectora antitumoral.

Imunizaram-se ratinhos C57Bl/6 quer com uma construção de ADN que codifica vários epítopos das proteínas E6 e E7 de HPV-16 (pCMV3-HPVT#1, preparada tal como descrito no exemplo 8; figura 6), quer com controlos (vector pCMV-3 sozinho, figura 2, ou PBS), seguido o protocolo do exemplo 1. Imunização profiláctica com uma construção de ADN de poliepítopos seguindo o protocolo do exemplo 2, induziu imunidade antitumoral protectora em 100% dos ratinhos provocados. Contrariamente, não se detectaram ratinhos isentos de tumor nos grupos de controlo. Apresentam-se os resultados na tabela 4 seguinte.

Tabela 4
Percentagem de ratinhos isentos de tumor após enxerto com células de tumor C3 vivas

	Dia 30 após provocação	**Dia 60 após provocação**	**Dia 90 após provocação**
pCMV-poliepítopo	100	100	100
Controlo de pCMV-3	0	0	0
PBS	0	0	0

Exemplo 10:

Este exemplo ilustra o efeito de uma segunda provocação com células de tumor C3 vivas em ratinhos isentos de tumor três meses após a provocação inicial com células de tumor vivas.

A fim de determinar se a imunidade protectora antitumoral induzida quer pela construção pCMV-dE7, preparada como descrito no exemplo 4 (figura 1) tal como observada no exemplo 7, quer pela construção pCMV-poliepítopo, preparada tal como descrito no exemplo 8 (figura 6) tal como observado no exemplo 9, era duradoura, os ratinhos que sobreviveram à provocação inicial com células de tumor e que permaneceram isentos de tumor durante um período de três meses foram re-enxertados com células de tumor C3 vivas. Monitoraram-se então os ratinhos relativamente a sinais de desenvolvimento de tumor.

Tal como indicado na tabela 5 infra, um animal no grupo pCMV-dE7 desenvolveu um tumor após esta segunda dose de provocação. Contudo, todos os ratinhos do grupo imunizado com poliepítopos de ADN permaneceram isentos de tumor. Assim, o maior nível de protecção relativamente a provocação com células de tumor parece ser do grupo imunizado com poliepítopos.

Tabela 5

Percentagem de ratinhos isentos de tumor após segundo enxerto com células de tumor C3 vivas

	Dia 30 após segunda provocação com células de tumor	**Dia 60 após segunda provocação com células de tumor**
pCMV-dE7 i.m.	80	80
pCMV-poliepítopo i.m.	100	100

REFERÊNCIAS

1. Pisani P. et al., Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden, Int. J. Cancer 1993:55:891-903.

2. Piver M.S., Handbook of gynecologic oncology. Boston: Little, Brown, 1996.

3. Kurman R.J. et al., Interim guidelines for management of abnormal cervical cytology. The 1992 National Cancer Institute Workshop, IAMA 1994-271:1866-9.

4. Bosch FX, et al., Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer - a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group [see comments], J. Natl. Cancer Inst. 1995:87:796-802.

5. Pecoraso G. et al., Differential effects of human papillomavirus type 6, 16 and 18 DNAs on immortalization and transformation of human cervical epithelial cells. Proc. Natl. Acad Sci. USA, 1989:86:563-7.

6. Shamanin V., et al., Specific types of human papillomavirus found in benign proliferations and carcinomas of the skin in immunosuppressed patients, Cancer Res. 1994:54:4610-3.

7. Hilders C.G., et al., Association between HLA-expression and infiltration of immune cells in cervical carcinoma [see comments]. Lab. Invest. 1993:69:651-9.

8. Munger K., et al., Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. Cancer Surv. 1992:12:197-217.

9. Dyson N., et al. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science: 1989:243:934-7.

10. Munger K., et al. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. J. Virol 1989:63:4417-21.

11. Crook T., et al., Continued expression of HPV-16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells co-transformed by HPV-16 plus EJ-ras. EMBO. J. 1989:8:513-9.

12. Ressing M.E., et al., Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. J. Immunol. 1995:154:5934-5943.

13. Kast W.M., et al., Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. J. Immunol. 1994:152:3904-3912.

14. Feltkamp M.C., et al., Vaccination with cytotoxic T lymphocyta epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. Eur. J. Immunol. 1993:23:2242-2249.

15. Alexander M., et al., Generation of tumor specific cytolytic T-lymphocytes from peripheral blood of cervical cancer patients by in vitro stimulation with a synthetic HPV-16 E7 epitope. Am. J. Obster. Gynecol 1996:175:1586-1593.

16. Steller M.A., et al., Human papillomavirus immunology and vaccine prospects. J. Natl. Cancer Inst. Monogr. 1996:21:145-148.

17. Schiller J.T., et al., Papillomavirus vaccines: current status and future prospects. Adv. Dermatol. 1996:11:355-80; discussion: 355-80; discusstion:381.

18. Kimbauer R., et al., Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles, J. Virol. 1993:67:6929-6936.

19. Borysiewicz L.K., et al., A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus type 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer [see comments]. Lancet 1996:347:1523-1527.

20. Irvine K.R., et al., Synthetic oligonucleotide expressed by a recombinant vaccinia virus elicits therapeutic CTL. J. Immunol. 1995:154:4651-7.

21. WO 93/24640

22. Tang et al., Nature 1992, 356:152-154.

23. Furth et al., Analytical Biochemistry, 1992, 205:365-368.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> GAJEWCZYK, Diane M.
PERSSON, Roy
YAO, Fei-Long
CAO, Shi-Xian
KLEIN, Michel H.
TARTAGLIA, James
MOINGEON, Phillipe
ROVINSKI, Benjamin

<120> TRATAMENTO DE CANCRO CERVICAL

<130> 1038-981 MIS:jb

<140> PCT/CA99/00807
<141> 1999-09-03

<150> 60/099,291
<151> 1998-09-04

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 300
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Mini-gene sintético

<400> 1
ctgcagcagg ctagcatgca tggagataca cctacattgc atgaatatat gttagatttg 60
caaccagaga caactcaatt gaatgacagc tcagaggagg aggatgaaat agatggtcca 120
gctggacaag cagaaccgga cagagcccat tacaatattg taacctttg ttgcaagtgt 180
gactctacgc ttcggttgtg cgtacaaagc acacacgtag acattcgtac tttggaagac 240
ctgttaatgg gcacactagg aattgtgtgc cccatctgtt ctcagaaacc ataagtcgac 300

<210> 2
<211> 33
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Mini-gene sintético

<400> 2
ctgcagcagg ctagcatgca tggagataca cct 33

<210> 3
<211> 35
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Mini-gene sintético
<400> 3
cagctgaata ccaaagactc ttgtctaccc cgtgt 35

<210> 4
<211> 386
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Mini-gene sintético

<400> 4
tcgacgccgc caccatgaga gcccattaca atattgttac ctttgccgcc gcctatatgt 60
tagatttgca accagagaca actgcagccg ctctgttaat gggcacacta ggaattgtgg 120
ccgcggcgac actaggaatt gtgtgcccca tcgcagcagc cactatacat gatataatat 180
tagaatgtgt gtaatagtga gaattcatga gagcccatta caatattgtt acctttgccg 240
ccgcctatat gttagatttg caaccagaga caactgcagc cgctctgtta atgggcacac 300
taggaattgt ggccgcggcg acactaggaa ttgtgtgccc catcgcagca gccactatac 360
atgatataat attagaatgt gtgtaa 386

<210> 5
<211> 180
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Sintética

<400> 5
atgagagccc attacaatat tgttaccttt gccgccgcct atatgttaga tttgcaacca 60
gagacaactg cagccgctct gttaatgggc acactaggaa ttgtggccgc ggcgacacta 120
ggaattgtgt gccccatcgc agcagccact atacatgata taatattaga atgtgtgtaa 180

<210> 6
<211> 59
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Sintética

<400> 6
Met Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Ala Ala Ala Tyr Met Leu
1 5 10 15

Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Ala Ala Ala Leu Leu Met Gly Thr Leu
20 25 30

Gly Ile Val Ala Ala Ala Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Ala Ala
35 40 45

Ala Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val
50 55

<210> 7
<211> 92
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Sintética

<400> 7
tcgacgccgc caccatgaga gcccattaca atattgttac ctttgccgcc gcctatatgt 60
tagatttgca accagagaca actgcagccg ct 92

<210> 8
<211> 109
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Sintética

<400> 8
ctgttaatgg gcacactagg aattgtggcc gcggcgacac taggaattgt gtgccccatc 60
gcagcagcca ctatacatga tataatatta gaatgtgtgt aatagtgag 109

<210> 9
<211> 55
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Sintética

<400> 9
catataggcg gcggcaaagg taacaatatt gtaatgggct ctcatggtgg cggcg 55

<210> 10
<211> 46
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Sintética

<400> 10
aatctaaacg ttggtctctg ttgacgtcgg cgagacaatt acccgt 46

<210> 11
<211> 100
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Sintética

<400> 11
gtgatcctta acaccggcgc cggtgtgatc cttaacacac ggggtagcgt cgtcggtgat 60
atgtactata ttataatctt acacacatta tcactcttaa 100

<210> 12
<211> 35
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Sintética

<400> 12
gtcgacttat ggtttctgag aacagatggg gcaca 35

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Vector incluindo uma molécula de ácido nucleico que codifica um antigénio E7 de HPV-16 isento dos aminoácidos 21 a 26, em que a referida molécula de ácido nucleico está ligada operativamente a um promotor de citomegalovírus.

2. Vector de acordo com a reivindicação 1, em que a referida molécula de ácido nucleico está contida no plasmídeo CMV-3 tal como apresentado na figura 2.

3. Vector de acordo com a reivindicação 1 que é pCMV-dE7 tal como apresentado na figura 1.

4. Composição imunogénica para administração *in vivo* a um hospedeiro contendo um vector de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

5. Vector de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 para utilização como medicamento.

6. Utilização de um vector de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 para o fabrico de um medicamento para tratar cancro cervical.

Lisboa,

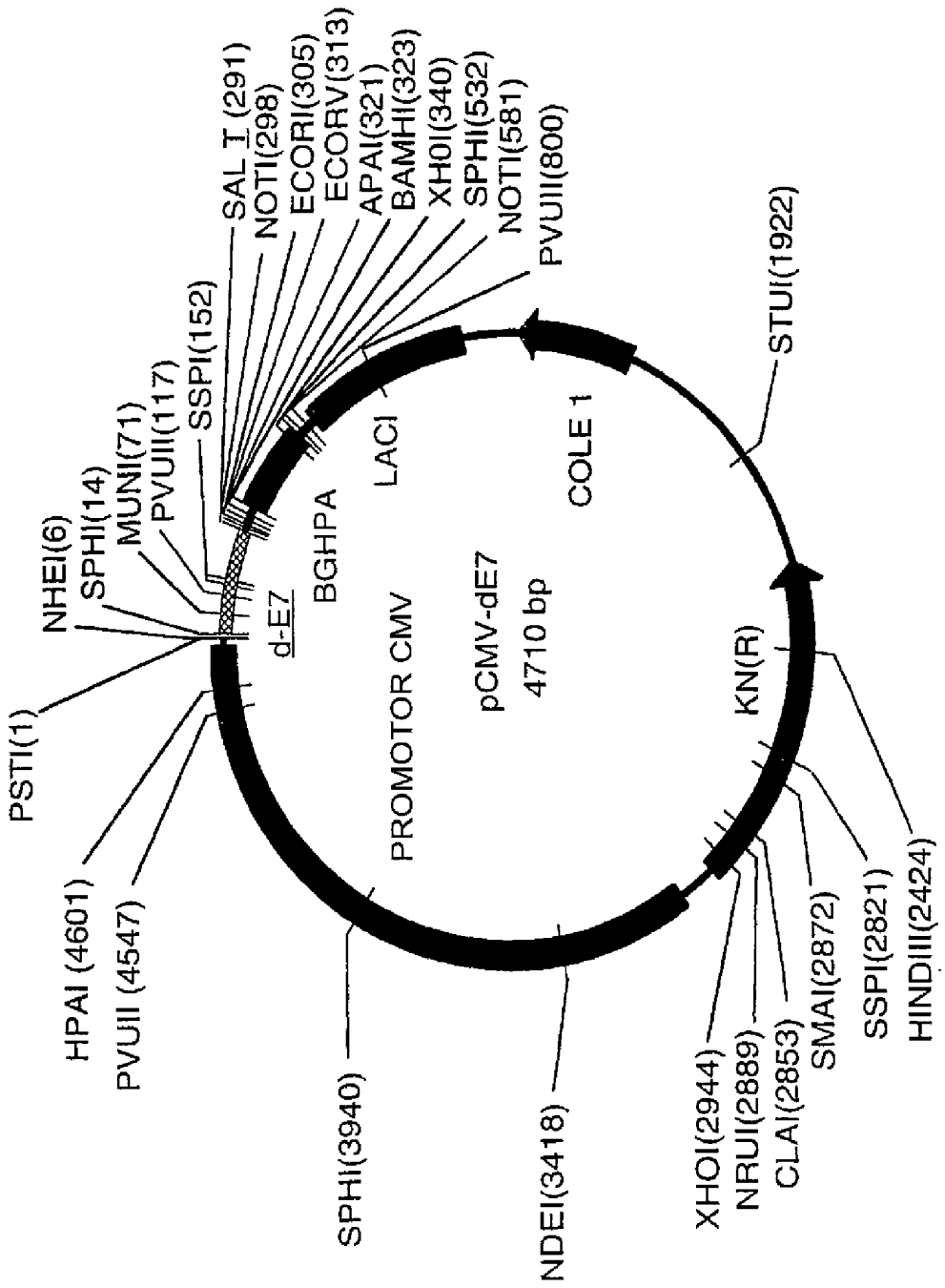

PSTI(1)
NHEI(6)
SPHI(14)
MUNI(71)
PVUII(117)
SSPI(152)
SAL I (291)
NOTI(298)
ECORI(305)
ECORV(313)
APAI(321)
BAMHI(323)
XHOI(340)
SPHI(532)
NOTI(581)
PVUII(800)
STUI(1922)
HPAI (4601)
PVUII (4547)
SPHI(3940)
NDEI(3418)
XHOI(2944)
NRUI(2889)
CLAI(2853)
SMAI(2872)
SSPI(2821)
HINDIII(2424)
d-E7
BGHPA
PROMOTOR CMV
LACI
pCMV-dE7
4710 bp
COLE 1
KN(R)

FIG.1A

FIG.1B

Sequência de nucleótidos de dE7 de HPV-16 amplificada por PCR

Iniciador de PCR 5' →

CTGCAGCAGG CTAGCATGCA TGGAGATACA CCTACATTGC ATGAATATAT GTTAGATTTG

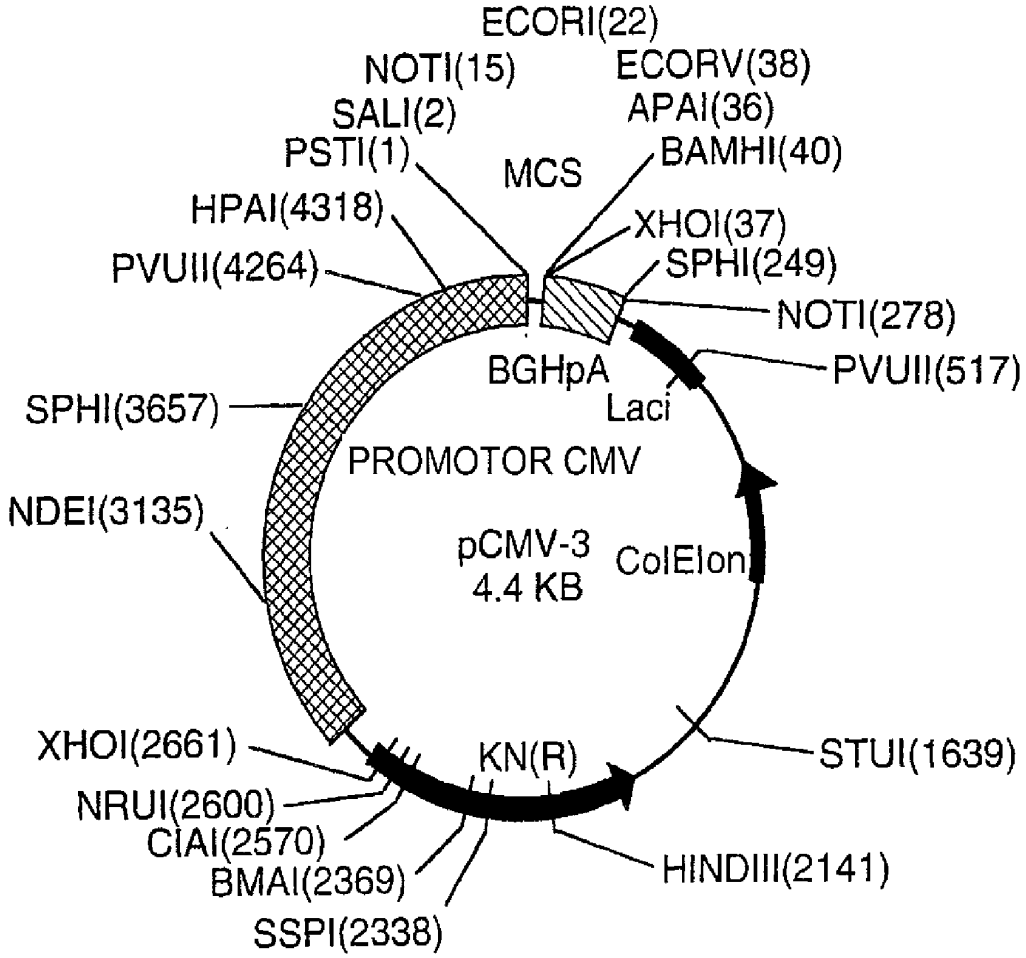
CAACCAGAGA CAACTCAATT GAATGACAGC TCAGAGGAGG AGGATGAAAT AGATGGTCCA

GCTGGACAAG CAGAACCGGA CAGAGCCCAT TACAATATTG TAACCTTTTG TTGCAAGTGT

GACTCTACGC TTCGGTTGTG CGTACAAAGC ACACACGTAG ACATTCGTAC TTTGGAAGAC

CTGTTAATGG GCACACTAGG AATTGTGTGC CCCATCTGTT CTCAGAAACC ATAAGTCGAC

← Iniciador de PCR 3'



Vector pCMV-3 contendo o promotor CMV, poliA da hormona de crescimento bovina e resistência a canamicina

FIG.2

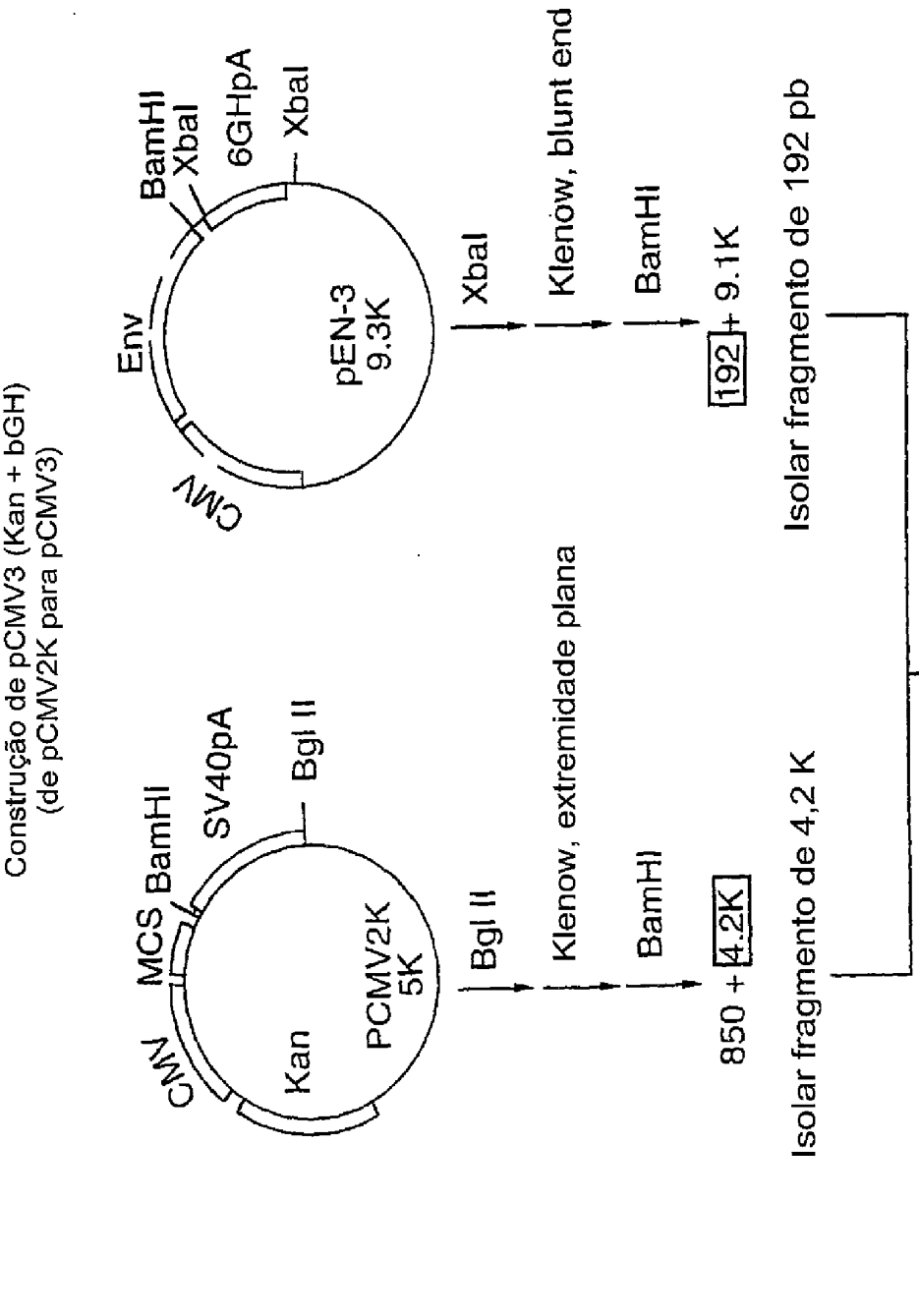
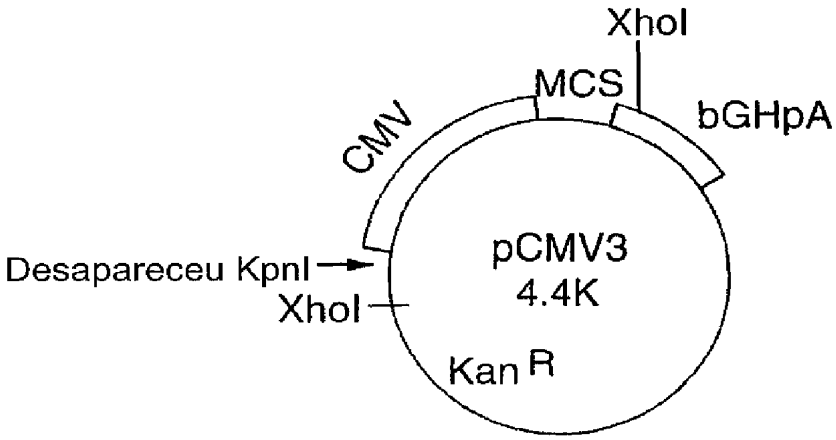

Construção de pCMV3 (Kan + bGH)
(de pCMV2K para pCMV3)
CMV
MCS
BamHI
SV40pA
Bgl II
Kan
PCMV2K
5K
Bgl II
Klenow, extremidade plana
BamHI
850 +
4.2K
Isolar fragmento de 4,2 K
Env
BamHI
XbaI
6GHpA
XbaI
pEN-3
9.3K
CMV
XbaI
Klenow, blunt end
BamHI
192
+ 9.1K
Isolar fragmento de 192 pb
Ligação

FIG.3A

Transformação, utiliza placas Kan R

pCMV3



pEN - 3: clonagem de bGHpA para pEN-1

pCMV2K é pCMV2 Amp R substituído por Kan R

pCMV2: pEN-1

com inserção cmv ligante de oligonucleótido

* consultar diagrama de pEN-1 (Figura 4)

FIG.3B

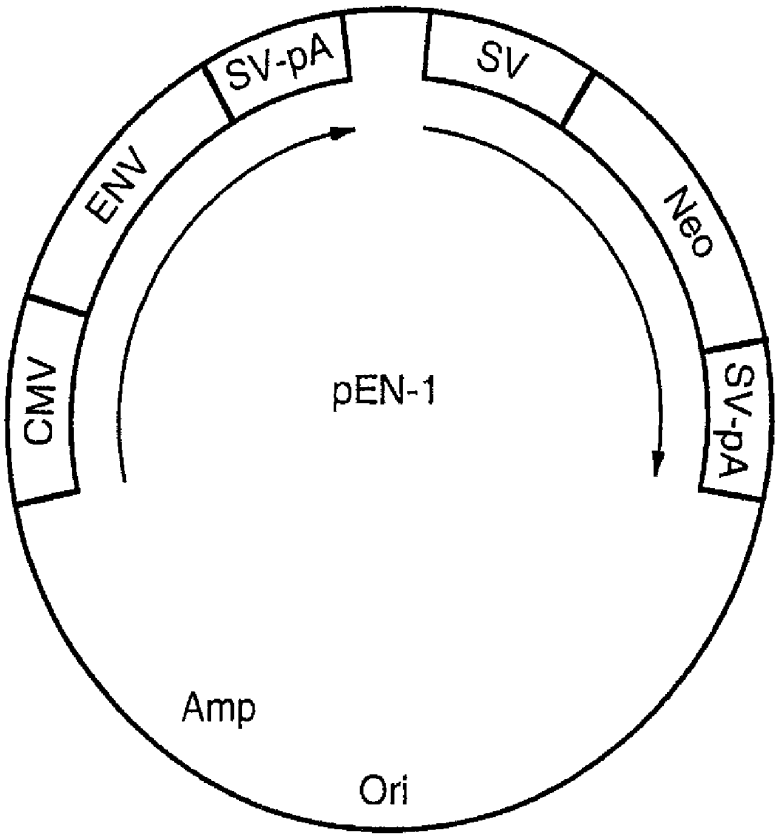


FIG.4

FIG.5A

pCMV3-HPVT#1

0.491 UG/UL, 50UL

Construção: Clonou-se um mini-gene sintético com a seguinte sequência no poli-ligante entre Sall e Eco RI do vector CMV3 resultando em pCMV3-HPVT#1. O gene codifica uma proteína que consiste de cinco epítopos de célula T de HPV 16 (do terminal NH2 para o terminal COOH), E7: 49-57, 11-20, 82-90, 86-93 e E6: 29-38. Introduziram-se três alaninas entre os epítopos. O codão de iniciação apresenta-se em letras a negrito, a sequência de Kozak sublinhada e os codões de terminação em letras em itálico e a negrito.

Sall
TCGACGCCGCCACCATGAGAGCCCATTACAATATTGTTACCTTTGCCGCCGCCTATATGTTA
GATTTGCAACCAGAGACAACTGCAGCCGCTCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGGCCG
CGGCGACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCGCAGCAGCCACTATACATGATATAATATTAGA
ATGTGTGTAATAGTGAGAATTC
EcoRI

Tradução da sequência de codificação:

		9			18			27			36			45			54
ATG	AGA	GCC	CAT	TAC	AAT	ATT	GTT	ACC	TTT	GCC	GCC	GCC	TAT	ATG	TTA	GAT	TTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Met	Arg	Ala	Mis	Tyr	Asn	Ile	Val	Thr	Phe	Ala	Ala	Ala	Tyr	Met	Leu	Asp	Leu

FIG.5A'

```
          63          72          81          90          99          100
CAA CCA GAG ACA ACT GCA GCC GCT CTG TTA ATG GGC ACA CTA GGA ATT GTG GCC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Gln Pro Glu Thr Thr Ala Ala Ala Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Ala

          117         126         135         144         153         162
GCG GCG ACA CTA GGA ATT GTG TGC CCC ATC GCA GCA GCC ACT ATA CAT GAT ATA
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Ala Ala Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Ala Ala Ala Thr Ile His Asp Ile

          171         180
ATA TTA GAA TGT GTG TAA 3'
--- --- --- --- --- ---
Ile Leu Glu Cys Val ***
```

FIG.5B

Mini-gene sintético de epítopos de HPV

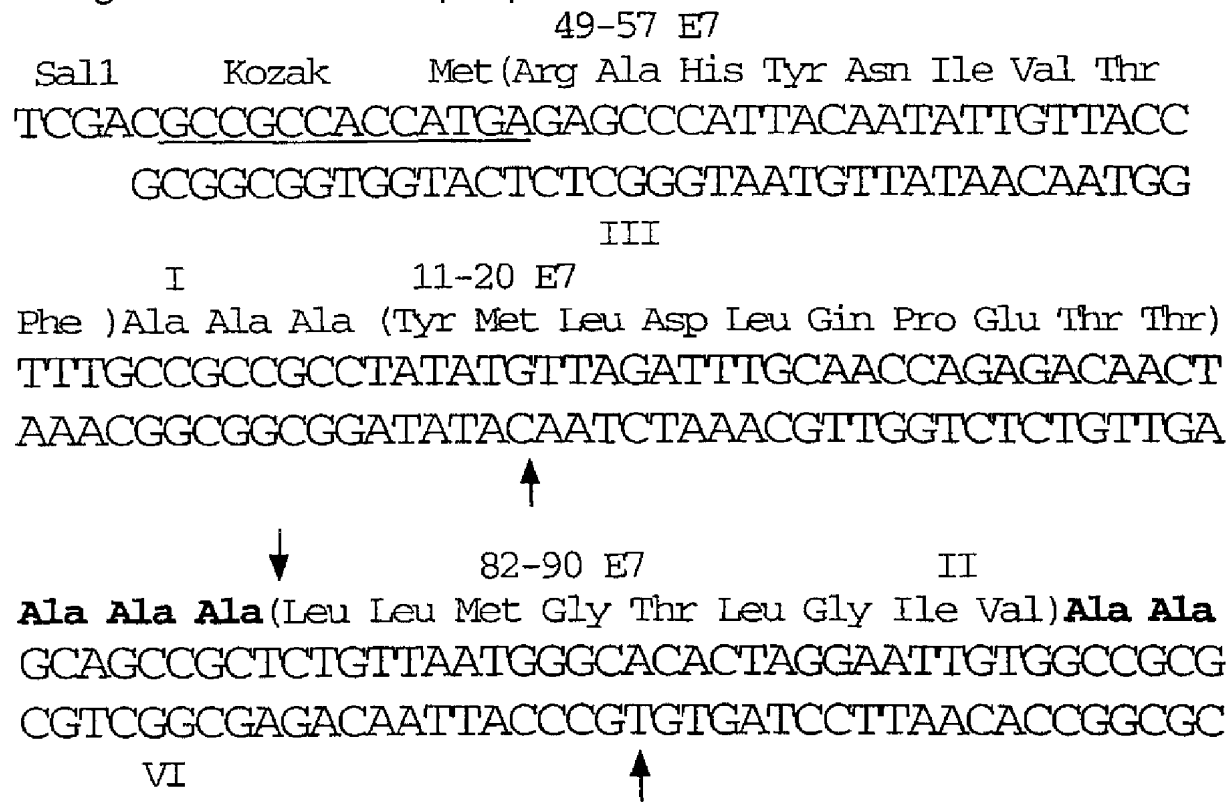


FIG.5B'

86-93 E7

Ala(Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile)**Ala Ala Ala**(Thr Ile

GCGACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCGCAGCAGCCACTATA

CGGTGTGATCCTTAACACACGGGGTAGCGTCGTCGGTGATAT

V

29-38 E6

His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val) * * *

CATGATATAATATTAGAATGTGTGTAATAGTGAG

GTACTATATTATAATCTTACACACATTATCACTCTTAA RI

O mini-gene foi montado utilizando cinco oligonucleótidos sintéticos (I-V, divididos por setas). Indicam-se as sequências de epítopo e os três espaçadores de alanina. O codão de iniciação ATG encontra-se em letras a negrito; a sequência de Kozak, sublinhada; os codões de terminação, assinalados com estrelas.

pCMV3-HPVT#1

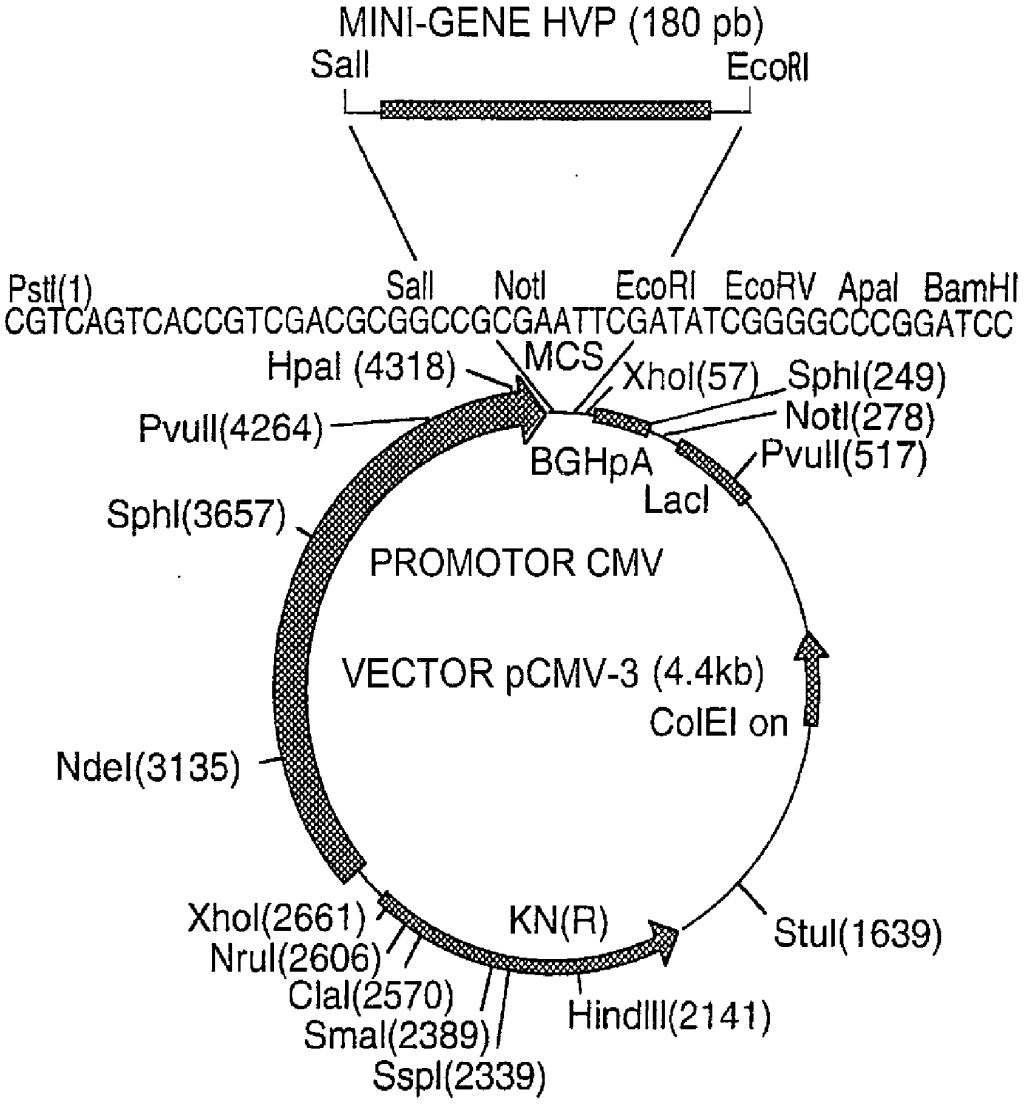


FIG.6