

(11) Número de Publicação: **PT 1105498 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/48 (2007.10) **C12N 7/01** (2007.10)

A61K 39/21 (2007.10) **C07K 16/10** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1999.08.12**

(30) Prioridade(s): **1998.08.12 US 96235 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2001.06.15**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.05.13**
156/2009

(73) Titular(es):

UNIVERSITY OF WESTERN ONTARIO
OFFICE IND. LIAISON, STEVENSON-LAWSON
BUIL. ROOM 319 LONDON, ONTARIO N6A 5B8

CA

(72) Inventor(es):

CHIL-YONG KANG
YAN LI

CA

CA

(74) Mandatário:

JOSÉ RAUL DE MAGALHÃES SIMÕES
AV. ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 131, 7º - C 1700-173
LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **VACINA CONTRA O VIH**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

VACINA CONTRA O VIH

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a uma nova vacina para uso no tratamento da SIDA, bem como a métodos para a produção da mesma. Mais particularmente a invenção refere-se a uma vacina que pode ser produzida em grandes quantidades e que é não citolítica e avirulenta.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Apesar dos recentes avanços em terapêutica antiviral, não existe cura permanente para a SIDA ou infecção por VIH. A terapêutica com fármaco é uma área de pesquisa promissora em termos de proporcionar terapêutica eficaz, contudo devido aos efeitos secundários, adesão e gastos, o progresso não tem sido rápido. Compondo estas dificuldades está o facto de que a disponibilidade de tais fármacos é limitada em países em desenvolvimento onde é estimado que 90% de infecções por VIH ocorrerá no ano 2000.

Devido ao sucesso que vacinas contra doenças infecciosas têm tido, o mais notável sendo contra varíola e poliomielite, a pesquisa por uma vacina eficaz contra a SIDA continua. Uma variedade de enfoques tem sido tentada. De facto, a maior parte do desenvolvimento de vacina contra o VIH-1 tem-se concentrado em vacinas subunitárias. A dificuldade com o enfoque da vacina

subunitária tem sido a capacidade de produzir imunidade óptima. No momento, não se conhece exactamente quais componentes do(s) antigénio(s) de VIH e do sistema imune são necessários para a protecção contra a infecção natural.

Ensaaios de vacina iniciais examinaram imunogénios a base de proteínas subunitárias recombinantes, tais como a proteína gp120 do envelope do VIH-1. Os resultados deste enfoque têm sido decepcionantes, apesar de que os regimes de imunização que empregam tanto vírus recombinante vivo como proteína subunitária têm, em alguns indivíduos, provocado tanto CTL CD8+ específico do envelope como anticorpo neutralizante contra o envelope do VIH-1 (Cooney EL, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 1882-86; McElrath MJ, *et al.* J Infect Dis. 169: 41-47 (1994); Graham BS, *et al.* J Infect Dis 166: 244-52 (1992); e Graham BS, *et al.* J Infect Dis 167: 533-37 (1993)).

Estudos da glicoproteína do envelope do VIH não têm rendido uma rota plausível para o desenvolvimento de vacina. Por exemplo, com respeito a gp120 do VIH-1, a sequência sinal de glicoproteína gp120 do envelope do VIH-1, que é referida como NSS para sequência sinal natural de VIH-1, encontrou-se que está associada com a extensão da secreção de gp120. Em relação a isso foi mostrado que a substituição da NSS por ou sequência sinal de melitina ou de IL-3 proporciona um alto nível de produção e secreção de gp120 eficiente (Li, Y., *et al.* Virology 204: 266-278 (1994); e Li, Y., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 9606-9611 (1996). Contudo, não se

conhece se a sequência sinal de gp120 de VIH-1 tem um papel a desempenhar na patogenicidade do vírus.

A rota preferida é o uso de vacinas de vírus inactivados inteiros, tal como a vacina do vírus da poliomielite inactivado, ou vacinas de vírus vivo atenuado, tal como a vacina contra poliomielite oral. Infelizmente, este enfoque na pesquisa por uma vacina contra o vírus da SIDA parece perigoso demais, dado o potencial para problemas tais como o "incidente Cutter" em que uma inactivação inadequada da vacina contra a poliomielite resultou em poliomielite clínica real. Um enfoque prévio incorporou o uso de VIH-1 de tipo selvagem, contudo, foi impossível produzir uma quantidade adequada de vírus para vírus inteiro morto porque o rendimento de linhas de células T infectadas por VIH-1 foi muito baixo (Coffin *et al.* Retroviruses, CSH Press, 1989). Assumindo que seja possível aumentar o rendimento, existe também a preocupação com respeito à responsabilidade potencial em crescer grandes volumes de VIH-1 infeccioso.

Com respeito às vacinas contra o VIH conhece-se que a deleção do gene *nef* do VIH atenua o vírus. Desrosiers e seus associados demonstraram que a vacinação de macacos com VIS com *nef* deletado protegeu contra a exposição a VIS de tipo selvagem (Daniels, M.D. *et al.* Science 258:1938 (1992); Desrosiers, R.C., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6353 (1989)) e outros demonstraram que o gene *nef* é dispensável para a replicação de VIS e VIH (Daniels, M.D. *et al.* Science 258: 1938 (1992); Gibbs, J.S., *et al.* AIDS Res. e Human

Retroviruses 10:343 (1994); Igarashi, T., *et al.* J. Gen. Virol. 78: 985 (1997); Kestler III, H.W., *et al.* Cell 65:651 (1991)). Além disso, a deleção do gene *nef* faz com que o vírus seja não patogénico no hospedeiro normalmente susceptível (Daniels, M.D. *et al.* Science 258:1938 (1992)). Embora esta deleção não proporcione uma forma do vírus que seja possível de produzir em grandes quantidades. Esta forma também não mostrou ser segura para a produção de uma vacina.

Consequentemente, o que é necessário é uma vacina que seja avirulenta, bem como que seja capaz de ser produzida em grandes quantidades e sem as preocupações e problemas prévios de usar VIH-1 de tipo selvagem.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os presentes inventores encontraram que a sequência sinal natural (NSS) da glicoproteína gp120 do envelope do vírus da imunodeficiência humana 1 (VIH-1) é responsável por apoptose bem como necrose geral de células infectadas por vírus. Os inventores também encontraram que a substituição da NSS por uma sequência sinal mais eficiente, tal como sequência sinal de melitina ou de IL-3, gera um VIH-1 não citolítico que é capaz de replicação e secreção de gp120 altamente eficiente. Consequentemente, a presente invenção refere-se a um retrovírus não citolítico que é capaz de replicação viral altamente eficiente e portanto que é útil na preparação de uma vacina retroviral. Em seu aspecto mais amplo, a presente invenção proporciona um retrovírus não citolítico em que a sequência sinal

natural da glicoproteína do envelope do vírus é modificada para ser não citolítica ou é substituída por uma sequência sinal não citolítica.

De acordo com uma forma de realização, a modificação da sequência sinal natural de uma glicoproteína do envelope de retrovírus resulta numa replicação do vírus mais eficiente, preferivelmente VIH. Em consequência, a presente invenção proporciona um VIH-1 recombinante não citolítico capaz de replicação altamente eficiente em que a NSS da glicoproteína do envelope do vírus é modificada suficientemente para prevenir dano celular pelo vírus, preferivelmente pela eliminação de aminoácidos carregados positivamente, inclusive mais preferivelmente, tal eliminação ou modificação resultando em não mais de um (1) e preferivelmente zero (0) aminoácidos carregados positivamente.

Em outra forma de realização, a substituição da sequência sinal natural resulta numa replicação mais eficiente de VIH. Em consequência a presente invenção proporciona um VIH-1 recombinante não citolítico capaz de replicação altamente eficiente em que a NSS da glicoproteína do envelope do vírus é substituída por uma sequência sinal não citolítica e mais eficiente, preferivelmente que contém não mais de um e preferivelmente zero aminoácidos carregados positivamente, mais preferivelmente sequência sinal de melitina (MSS) ou sequência sinal de IL-3 (ILSS).

De acordo com outra forma de realização, um retrovírus essencialmente não citolítico também é avirulento. Em consequência, a presente invenção proporciona um retrovírus não citolítico avirulento que compreende uma adição ou deleção de sequência de ácido nucleico que torna o vírus avirulento e em que a sequência sinal natural da glicoproteína do envelope do vírus é ou modificada ou substituída para proporcionar uma sequência sinal não citolítica.

Numa forma de realização preferida é proporcionado um retrovírus não citolítico avirulento que contém uma deleção suficiente do gene *nef* para tornar o vírus não patogénico, e em que a NSS da glicoproteína gp120 do envelope do vírus é modificada ou substituída para proporcionar uma sequência sinal mais eficiente.

De acordo com uma forma de realização específica da invenção é proporcionado um VIH-1 não citolítico avirulento capaz de replicação altamente eficiente, com deleção suficiente do gene *nef* para tornar o vírus não patogénico num hospedeiro normalmente susceptível e em que a NSS da glicoproteína gp120 do envelope do vírus é substituída por uma sequência sinal mais eficiente, preferivelmente MSS ou ILSS.

Em outro aspecto, a presente invenção proporciona uma vacina contra uma infecção retroviral que compreende um retrovírus recombinante não citolítico em que a NSS da glicoproteína do envelope do vírus é modificada para proporcionar uma NSS não citolítica ou é substituída por uma NSS não citolítica. O retrovírus recombinante pode

proporcionar protecção contra o retrovírus de tipo selvagem não obstante as modificações genéticas incorporadas no retrovírus recombinante, já que conterá os epítomos conformacionais necessários para gerar imunidade protectora. Preferivelmente, o retrovírus é VIH, mais preferivelmente todos os diferentes clados de VIH-1.

A presente invenção também inclui um método de prevenção de apoptose induzido por infecção retroviral que compreende administrar uma quantidade suficiente de antagonista para a NSS a um animal em necessidade do mesmo, preferivelmente um anticorpo ou molécula antisenso.

A presente invenção também inclui um método de prevenção ou tratamento de uma infecção retroviral que compreende administrar um retrovírus recombinante não citolítico, em que a NSS da glicoproteína do envelope do vírus é modificada para proporcionar uma NSS não citolítica ou é substituída por uma NSS não citolítica, a um animal em necessidade do mesmo.

A presente invenção além disso inclui um método de destruição de células referidas no presente documento como células "alvo", preferivelmente células de cancro, que compreende administrar um vírus recombinante, específico para as células alvo, que foram modificadas por meio de engenharia genética para conter a NSS de VIH-1, a um animal em necessidade do mesmo.

A presente invenção além disso inclui uma célula transfectada com um retrovírus recombinante da presente invenção.

Outras características e vantagens da presente invenção se tornarão aparentes a partir da seguinte descrição detalhada. Deve entender-se, contudo, que a descrição detalhada e os exemplos específicos embora indiquem formas de realização preferidas da invenção são dados como forma de ilustração somente, já que diversas mudanças e modificações dentro do espírito e escopo da invenção se tornarão aparentes a aqueles especialistas nesta área a partir desta descrição detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A invenção será descrita agora em relação aos desenhos nos quais:

A figura 1 é fotografias de exame microscópico de células SF2/insecto infectadas com baculovírus recombinante (AcNPV).

A figura 2 proporciona gráficos que ilustram os efeitos da sequência sinal env de VIH-1 sobre a morte celular.

A figura 3 mostra os resultados de electroforese em gel de agarose que proporcionam uma análise de fragmentação de ADN de células SF21 infectadas com AcNPV recombinante que expressa gp120 com sequências sinal diferentes.

A figura 4 mostra uma electroforese em gel de agarose que proporciona uma análise de fragmentação de ADN de células SF21 infectadas com baculovírus recombinante que expressa a glicoproteína G do vírus da estomatite vesicular (VSV-G) com ou sem a sequência sinal natural *env* de VIH-1.

A figura 5 é uma ilustração de uma construção de plasmídeo recombinante de proteína VSV-G sem a sequência sinal.

A figura 6 é uma ilustração de uma construção de gp120 de VIH-1 que contém a NSS.

A figura 7 é uma ilustração do plasmídeo pBSK VSV-G-NSS; este plasmídeo contém a sequência genética de proteína VSV-G com a sequência sinal natural da proteína *env* de VIH-1.

A figura 8 é uma ilustração de uma construção de plasmídeo recombinante em que o sítio de EcoRI-BamHI contém o fragmento subclonado de pNL4-3 no vector pBluescript SK.

A figura 9 é uma ilustração de uma construção de plasmídeo recombinante que contém um fragmento de 2245 pb clonado nos sítios de PstI+BamHI.

A figura 10 é uma ilustração de uma construção de plasmídeo recombinante que contém produtos de PCR digeridos com EcoRI e Pst-I (fragmento de 445 pb).

A Figura 11 é uma ilustração de um plasmídeo recombinante, construção que contém um oligonucleótido que codifica ou a sequência sinal de melitina ou a sequência sinal interleucina-3.

A figura 12 é uma ilustração de uma construção de plasmídeo recombinante que contém um fragmento de 421 pb isolado da sequência que codifica o gene *nef* nos sítios de Bam HI-XhoI do vector.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Retrovírus recombinante

Como mencionado anteriormente no presente documento, a presente invenção refere-se a um retrovírus não citolítico em que a sequência sinal natural (NSS) da glicoproteína gp120 do envelope do VIH-1 é modificada para ser essencialmente não citolítica ou é substituída por uma sequência sinal não citolítica. O termo "essencialmente não citolítico" como usado no presente documento significa que o retrovírus não danifica significativamente ou mata as células que infecta.

Numa forma de realização, a presente invenção proporciona um VIH-1 recombinante não citolítico capaz de replicação altamente eficiente em que a NSS da glicoproteína do envelope do vírus é modificada suficientemente para prevenir dano celular pelo vírus, preferivelmente pela eliminação de aminoácidos carregados positivamente, inclusive mais preferivelmente, tal eliminação ou modificação resulta em não mais de um (1) e preferivelmente zero (0)

aminoácidos carregados positivamente. Os aminoácidos carregados positivamente que podem ser modificados ou substituídos incluem lisina e arginina.

Em outra forma de realização, a substituição da sequência sinal natural resulta numa replicação mais eficiente de VIH. Em consequência a presente invenção proporciona um VIH-1 recombinante não citolítico capaz de replicação altamente eficiente em que a NSS da glicoproteína do envelope do vírus é substituída por uma sequência sinal não citolítica e mais eficiente. Numa forma de realização preferida, a substituição da NSS da glicoproteína do envelope do VIH-1 por ou a sequência sinal de melitina ou de IL-3 diminui a citotoxicidade do retrovírus. Como tal, a presente invenção inclui dentro do seu escopo a substituição da NSS por qualquer sequência sinal que torne o retrovírus não citolítico. Os inventores mostraram também que a substituição da NSS por sequências sinal de melitina ou de IL-3 resulta num maior nível de produção e secreção de gp120, além da citotoxicidade reduzida. Os inventores mostraram também que a substituição da NSS resulta em deleção parcial do gene *upu*. Estudos mostraram que o gene *upu* pode ser completamente deletado sem qualquer impacto mensurável sobre a habilidade do vírus para se replicar (James *et al.* AIDS Res. Human Retrovirus 10:343-350, 1994).

Em outra forma de realização, o retrovírus se torna avirulento. Numa forma de realização preferida, o vírus se torna avirulento pela deleção do gene *nef*. Em consequência, a presente invenção proporciona um retrovírus essencialmente não citolítico avirulento que

contém uma deleção suficiente do gene *nef* para tornar o vírus não patogénico e em que a sequência que codifica a glicoproteína gp120 do envelope do vírus é substituída por uma sequência sinal mais eficiente. Como usado no presente documento, "deleção suficiente" significa deleção de quantidade suficiente da sequência para prevenir a transcrição e deste modo a produção do produto proteico *nef*.

Numa forma de realização adicional, o retrovírus se torna avirulento, não citolítico e contém uma deleção suficiente do gene *nef* e do gene *vpu* para tornar o vírus não patogénico.

O retrovírus recombinante da presente invenção pode ser qualquer retrovírus incluindo VIH-1, VIH-2, VIS, HTLV-1. Preferivelmente o retrovírus é um vírus da imunodeficiência humana seleccionado de VIH-1 e VIH-2, mais preferivelmente, o retrovírus é VIH-1.

Os retrovírus recombinantes da presente invenção podem ser preparados usando técnicas conhecidas na técnica. Numa forma de realização, o retrovírus pode ser introduzido numa célula hospedeira sob condições adequadas para a replicação e expressão do retrovírus no hospedeiro. Em consequência, a presente invenção também proporciona uma célula transfectada com um retrovírus recombinante em que a sequência sinal natural da glicoproteína gp120 do envelope do vírus é modificada para proporcionar um vírus não citotóxico ou é substituída por uma sequência sinal não citolítica. A célula é preferivelmente um linfócito T, mais

preferivelmente uma célula T que não é derivada de uma linha celular transformada.

O retrovírus não citolítico e avirulento da presente invenção será extremamente útil para a prevenção e o tratamento de uma infecção retroviral já que o retrovírus pode ser produzido em grandes quantidades e numa forma que é não patogénica ao hospedeiro, preferivelmente o vírus da invenção será útil para o desenvolvimento de vacinas contra o VIH/SIDA para a prevenção e o tratamento de infecções por VIH. Em consequência, a presente invenção também proporciona um método de prevenção ou tratamento de uma infecção retroviral que compreende administrar uma quantidade eficaz de um retrovírus avirulento não citolítico recombinante morto da presente invenção a um animal em necessidade do mesmo. O termo "quantidade eficaz" como usado no presente documento significa uma quantidade eficaz e a dosagens e por períodos de tempo necessários para conseguir o resultado desejado. O termo "animal" como usado no presente documento inclui todos os membros do reino animal incluindo mamíferos, preferivelmente seres humanos.

Numa forma de realização preferida, a presente invenção proporciona um método de prevenção ou tratamento de uma infecção retroviral que compreende administrar uma quantidade eficaz de um retrovírus avirulento essencialmente não citolítico recombinante morto a um animal em necessidade do mesmo, em que a sequência sinal natural da glicoproteína do envelope do vírus, preferivelmente gp120, é modificada para

proporcionar uma sequência sinal não citolítica, preferivelmente o vírus se torna avirulento pela deleção do gene *nef*. De acordo com uma forma de realização preferida a modificação para proporcionar uma NSS não citolítica resulta em não mais de um aminoácido carregado positivamente na sequência NSS, mais preferivelmente zero aminoácidos carregados positivamente. O mais preferivelmente, o animal é um ser humano, preferivelmente o retrovírus é VIH-1.

Numa forma de realização preferida adicional, a presente invenção proporciona um método de prevenção ou tratamento de uma infecção retroviral que compreende administrar uma quantidade eficaz de um retrovírus avirulento não citolítico recombinante morto a um animal em necessidade do mesmo, em que a sequência sinal natural da glicoproteína do envelope do vírus, preferivelmente gp120, é substituída por uma sequência sinal não citolítica, preferivelmente o vírus se torna avirulento pela deleção do gene *nef*. O mais preferivelmente, o animal é um ser humano, preferivelmente o retrovírus é VIH-1.

De acordo com uma forma de realização preferida do método em que a NSS é substituída, a sequência sinal não citolítica é seleccionada do grupo que consiste na sequência de melitina e na sequência sinal de IL-3.

Vacinas

A presente invenção além disso inclui uma vacina que compreende uma quantidade eficaz de um retrovírus

não citolítico e um avirulento em que a sequência sinal natural da glicoproteína do envelope do vírus, preferivelmente gp120, é substituída por uma sequência sinal não citolítica e o vírus se torna avirulento pela deleção de uma porção suficiente do gene *nef*. O retrovírus pode ter também uma porção do gene *vpu* deletada como um resultado da substituição da NSS. Preferivelmente a sequência sinal não citolítica é seleccionada do grupo que consiste na sequência de melitina e na sequência sinal de IL-3.

De acordo com uma forma de realização, a modificação da sequência sinal natural de uma glicoproteína do envelope do retrovírus resulta numa replicação mais eficiente do vírus, preferivelmente VIH. Em consequência, a presente invenção proporciona um VIH-1 recombinante não citolítico capaz de replicação altamente eficiente em que a NSS da glicoproteína do envelope do vírus é modificada suficientemente para prevenir dano celular pelo vírus, preferivelmente pela eliminação de aminoácidos carregados positivamente, inclusive mais preferivelmente, tal eliminação ou modificação resulta em não mais de um (1) aminoácido carregado positivamente, mais preferivelmente não mais de zero (0) aminoácidos carregados positivamente.

Em outra forma de realização, a substituição da sequência sinal não citolítica resulta numa replicação mais eficiente de VIH. Em consequência a presente invenção proporciona uma vacina compreendida de um VIH-1 recombinante não citolítico capaz de replicação altamente eficiente em que a NSS da glicoproteína do

envelope do vírus é substituída por uma sequência sinal não citolítica e mais eficiente, preferivelmente que contém não mais de um aminoácido positivo, preferivelmente sequência sinal de melitina (MSS) ou sequência sinal de IL-3 (ILSS).

De acordo com outra forma de realização, um retrovírus essencialmente não citolítico é também avirulento, preferivelmente através da deleção do gene *nef*. Em consequência, a presente invenção proporciona uma vacina que compreende um retrovírus essencialmente não citolítico, avirulento que compreende uma adição ou deleção de sequência de ácido nucleico que torna o vírus avirulento e em que a sequência sinal natural da glicoproteína do envelope do vírus é ou modificada ou substituída para proporcionar uma sequência sinal essencialmente não citolítica.

Alternativamente, a vacina pode compreender uma quantidade eficaz de um retrovírus não citolítico e avirulento em que a sequência sinal natural da glicoproteína gp120 do envelope do vírus é modificada para reduzir o número de aminoácidos positivos a não mais de um aminoácido carregado positivamente, preferivelmente não mais de zero aminoácidos carregados positivamente e o vírus se torna avirulento pela deleção de uma porção suficiente do gene *nef*.

Em consequência, a presente invenção também inclui um método de prevenção ou tratamento de uma infecção retroviral que compreende administrar uma vacina da presente invenção a um animal em necessidade da mesma.

Como usado no presente documento, "vacina" inclui todas as vacinas profiláticas e terapêuticas. De acordo com uma forma de realização a vacina contém um retrovírus recombinante não citolítico e avirulento, em que a NSS da glicoproteína do envelope do vírus é modificada para proporcionar uma NSS não citolítica ou é substituída por uma NSS não citolítica e o vírus se torna avirulento pela deleção de uma porção suficiente do gene *nef*.

As composições de vacina da invenção são adequadas para administração a indivíduos numa forma biologicamente compatível *in vivo*. A expressão "forma biologicamente compatível adequada para administração *in vivo*" como usado no presente documento significa uma forma da substância a ser administrada em que quaisquer efeitos tóxicos são compensados pelos efeitos terapêuticos. As substâncias podem ser administradas a qualquer animal, preferivelmente seres humanos.

As vacinas da presente invenção podem conter adicionalmente diluentes, adjuvantes e/ou veículos adequados. Preferivelmente, as vacinas contêm um adjuvante que pode melhorar a imunogenicidade da vacina *in vivo*. O adjuvante pode ser seleccionado de muitos adjuvantes conhecidos na técnica, incluindo a porção de lípido-A de endotoxina de bactérias gram-negativas, dimicolato de trealose de micobactérias, o fosfolípido lisolecitina, brometo de dimetildioctadecilamónio (DDA), certos polímeros de bloco polioxipropileno-polioxietileno (POP-POE) lineares, hidróxido de alumínio e lipossomas. As vacinas podem incluir também citocinas

que são conhecidas por melhorar a resposta imune incluindo CM-CSF, IL-2, IL-12, TNF e IFN γ .

A dose da vacina pode variar de acordo com factores tais como o estado patológico, idade, sexo e peso do indivíduo, e a habilidade do anticorpo para provocar uma resposta desejada no indivíduo. A posologia pode ser ajustada para proporcionar a resposta terapêutica óptima. Por exemplo, várias doses divididas podem ser administradas diariamente ou a dose pode ser reduzida proporcionalmente como indicado pelas exigências da situação terapêutica. A dose da vacina pode variar também para proporcionar resposta de dose preventiva óptima dependendo das circunstâncias.

As vacinas podem ser administradas de uma maneira conveniente tal como por meio de injeção (subcutânea, intravenosa, intramuscular, etc.), administração oral, inalação, administração transdérmica (tal como pomada ou creme tópico, etc.) ou aplicações de supositório.

Prevenção de Apoptose

A presente invenção também inclui um método de prevenção da NSS de um retrovírus de exercer seus efeitos apoptóticos sobre uma célula, apoptose induzida por uma infecção retroviral. Em consequência, a presente invenção proporciona um método de prevenção ou inibição da apoptose que compreende administrar uma quantidade suficiente de antagonista para a NSS a um animal em necessidade do mesmo. O antagonista pode ser qualquer substância que possa inibir o gene da NSS ou seu produto

proteico referido no presente documento como "proteína de NSS", preferivelmente o antagonista é um anticorpo ou molécula antisenso.

Numa forma de realização, o antagonista é uma substância que inibe a proteína de NSS tal como um anticorpo específico para a proteína de NSS. Anticorpos contra a proteína de NSS podem ser preparados usando técnicas conhecidas na técnica tais como aquelas descritas por Kohler e Milstein, *Nature* 256, 495 (1975) e nas Patentes dos Estados Unidos números RE 32.011, 4.902.614, 4.543.439 e 4.411.993 (veja-se também *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKearn, e Bechtol (eds.), 1980, e *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow e Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Dentro do contexto da presente invenção, entende-se que anticorpos incluem anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, fragmentos de anticorpo (por exemplo, Fab e F(ab')₂) e parceiros de ligação produzidos recombinantemente. Consequentemente, a presente invenção proporciona um método de inibição dos efeitos da NSS de um retrovírus que compreende administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo que inibe a proteína de NSS.

Além de anticorpos, outros antagonistas ou ligandos que se unem à proteína de NSS e inibem seu funcionamento também podem ser usados. Ligandos de proteína de NSS podem ser identificados ensaiando uma amostra para péptidos que se unem à proteína de NSS. Qualquer sistema de ensaio ou método de teste que detecte interações

proteína-proteína pode ser usado incluindo co-imunoprecipitação, reticulação e pode ser usada co-purificação através de gradientes ou colunas cromatográficas. Amostras biológicas e bibliotecas comercialmente disponíveis podem ser testadas para péptidos que se unem a proteína de NSS. Por exemplo, pode ser usada proteína de NSS etiquetada ou proteína de NSS solúvel para sondar bibliotecas de visualização de fago. Além disso, os anticorpos que se unem à proteína de NSS podem ser usados para isolar outros péptidos com afinidade de união a proteína de NSS. Por exemplo, anticorpos etiquetados podem ser usados para sondar bibliotecas de visualização de fago ou amostras biológicas. Adicionalmente, uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína de NSS pode ser usada para sondar amostras biológicas ou bibliotecas para ácido nucleicos que codificam ligandos ou proteínas que se unem à proteína de NSS.

Em outra forma de realização, o antagonista de NSS é um oligonucleótido antisenso que inibe a expressão de proteína de NSS. Oligonucleótidos antisenso que são complementares a uma sequência de ácido nucleico de um gene de proteína de NSS podem ser usados nos métodos da presente invenção para inibir a proteína de NSS.

Consequentemente, a presente invenção proporciona um método de inibição dos efeitos da NSS de um retrovírus que compreende administrar uma quantidade eficaz de um oligonucleótido antisenso que é complementar a uma sequência de ácido nucleico de um

gene de proteína de NSS a um animal em necessidade do mesmo. Preferivelmente o retrovírus é VIH-1.

O termo oligonucleótido antisenso como usado no presente documento significa uma sequência de nucleótido que é complementar a seu alvo.

O termo "oligonucleótido" refere-se a um oligômero ou polímero de nucleótido ou monómeros de nucleósido que consistem em bases de ocorrência natural, açúcares e ligações entre açúcares (cadeia principal). O termo também inclui oligômeros modificados ou substituídos que compreendem monómeros de ocorrência não natural ou porções dos mesmos, que funcionam de maneira similar. Tais oligonucleótidos modificados ou substituídos podem se preferíveis com respeito às formas de ocorrência natural por causa de propriedades tais como captação celular melhorada ou estabilidade aumentada em presença de nucleases. O termo também inclui oligonucleótidos quiméricos que contêm dois ou mais regiões quimicamente distintas. Por exemplo, os oligonucleótidos quiméricos podem conter pelo menos uma região de nucleótidos modificados que confere propriedades benéficas (por exemplo, resistência a nuclease aumentada, captação aumentada em células), ou dois ou mais oligonucleótidos da invenção podem ser juntados para formar um oligonucleótido quimérico.

Os oligonucleótidos antisenso da presente invenção podem ser ácido ribonucleico ou desoxirribonucleico e podem conter bases de ocorrência natural incluindo adenina, guanina, citosina, timidina e uracilo. Os

oligonucleótidos podem conter também bases modificadas tais como xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil, 2-propil e outras alquil adeninas, 5-halo-uracilo, 5-halo-citosina, 6-aza-uracilo, 6-aza-citosina e 6-azatimina, pseudo-uracilo, 4-tiouracilo, 8-halo-adenina, 8-aminoadenina, 8-tiol-adenina, 8-tiolalquil-adeninas, 8-hidroxil-adenina e outras adeninas 8-substituídas, 8-halo-guaninas, 8-amino-guanina, 8-tiol-guanina, 8-tiolalquil-guaninas, 8-hidroxil-guanina e outras guaninas 8-substituídas, outros aza e desaza-uracilos, timidinas, citosinas, adeninas, ou guaninas, 5-trifluorometil-uracilo e 5-trifluoro-citosina.

Outros oligonucleótidos antisense da invenção podem conter heteroátomos de oxigênio, fósforo modificado na cadeia principal de fosfato, ligações entre açúcares de alquilos ou cicloalquilos de cadeia curta ou ligações entre açúcares heterocíclicas ou heteroatómicas de cadeia curta. Por exemplo, os oligonucleótidos antisense podem conter fosforotioatos, fosfotriésteres, fosfonatos metilo e fosforoditioatos. Numa forma de realização da invenção existem ligações de união fosforotioato entre as quatro de seis bases 3'-terminais. Em outra forma de realização uniões fosforotioato ligam todos os nucleótidos.

Os oligonucleótidos antisense da invenção podem compreender também análogos de nucleótido que podem ser mais adequados como reagentes terapêuticos ou experimentais. Um exemplo de um análogo de oligonucleótido é um ácido nucleico peptídico (PNA) em que a cadeia principal de fosfato da desoxirribose (ou

ribose) no ADN (ou ARN) é substituída por uma cadeia principal de poliamida que é similar a que é encontrada em péptidos (P.E. Nielsen, *et al.* Science 1991, 254, 1497). Análogos de PNA têm mostrado ser resistente a degradação por enzimas e ter vidas extensas *in vivo* e *in vitro*. Os PNA também se unem com mais força a uma sequência de ADN complementar devido à falta de uma repulsão de carga entre a fita de PNA e a fita de ADN. Outros oligonucleótidos podem conter nucleótidos que contêm cadeia principais de polímero, cadeia principais cíclicas, ou cadeia principais acíclicas. Por exemplo, os nucleótidos podem ter estruturas de cadeia principal de morfolino (patente dos Estados Unidos número 5.034.506). Oligonucleótidos podem conter também grupos tais como grupos repórter, um grupo para melhorar as propriedades farmacocinéticas de um oligonucleótido, ou um grupo para melhorar as propriedades farmacodinâmicas de um oligonucleótido antisenso. Oligonucleótidos antisenso podem ter também miméticos de açúcares.

As moléculas de ácidos nucleicos antisenso podem ser construídas usando síntese química e reacções de ligação enzimática usando procedimentos conhecidos na técnica. As moléculas de ácidos nucleicos antisenso da invenção, ou um fragmento das mesmas, podem ser sintetizadas quimicamente usando nucleótidos de ocorrência natural ou nucleótidos modificados de forma diversa desenhados para aumentar a estabilidade biológica das moléculas ou para aumentar a estabilidade física da dupla formada com ARNm ou o gene nativo, por exemplo, derivados de fosforotioato e nucleótidos substituídos por acridina. As sequências antisenso podem

ser produzidas biologicamente usando um vector de expressão introduzido em células em forma de um plasmídeo recombinante, fagómido ou vírus atenuado em que as sequências antisense são produzidas sob o controlo de uma região reguladora de alta eficiência, cuja actividade pode ser determinada pelo tipo de célula em que o vector é introduzido.

Além disso, a presente invenção também contempla um método para ensaiar uma substância que inibe a actividade da NSS de um retrovírus que compreende reagir um retrovírus que contém uma NSS com uma substância de teste, sob condições que permitem a inibição da NSS, ensaiando a habilidade do retrovírus de induzir apoptose e comparar com a habilidade de induzir apoptose obtida em ausência da substância de teste para determinar o efeito da substância sobre a NSS do retrovírus.

Apoptose em células de cancro

A presente invenção além disso inclui um método para matar ou destruir células alvo, preferivelmente células de cancro, que compreende administrar à célula ou às células, uma quantidade eficaz de um vírus recombinante, preferivelmente VSV ou qualquer outro vírus de ARN portador, específico para as células alvo, que contém, preferivelmente a NSS de VIH-1. Preferivelmente as células estão num animal em necessidade das mesmas, o mais preferivelmente num ser humano. Células, que são infectadas ou cancerosas, expressam marcadores específicos de célula para os quais um sítio de reconhecimento complementar pode ser

incorporado num vector adequado no qual a NSS de VIH-1 foi incorporada. Este enfoque foi tomado com vírus da estomatite vesicular (VSV) que foi modificado por meio de engenharia genética para incorporar os genes para CD4 e CXCR4 dirigindo deste modo o VSV modificado para infectar células infectadas por VIH-1 (Schnell, M.J. et al. *Célula* 90: 849-857 (1997)). Em consequência, a presente invenção proporciona um método para matar células alvo, tais como células de cancro, que compreende administrar um vírus recombinante, que contém NSS e um sítio de reconhecimento específico às células alvo, a um animal em necessidade do mesmo. Numa forma de realização, a NSS de VIH-1 é incorporada num vector similar a VSV modificado que foi dirigido a um tipo de célula de cancro específico baseado num antigénio de superfície de célula de cancro particular proporcionando deste modo o VSV com a habilidade de induzir apoptose nas células de cancro seleccionadas como alvo.

Os seguintes exemplos não limitantes são ilustrativos da presente invenção:

Exemplos

Exemplo 1

Construção de baculovírus recombinantes

A construção de baculovírus recombinantes que expressam gp120-NSS, gp120-MSS e gp120-ΔS de VIH-1 foi descrita previamente por Li et al. (*Virology* 204:266-278, 1994).

A construção de baculovírus recombinante que expressa glicoproteína (G) de VSV_{Ind} foi descrita previamente por Bailey et al. (Virology 169:323-331, 1989).

Construção de baculovírus recombinante que expressa proteína G de VSV_{Ind} com sequência sinal de env de VIH-1 (VSV-G-NSS):

Para substituir a sequência sinal de proteína G de VSV, os presentes inventores construíram em primeiro lugar VSV-G-ΔS por meio de PCR com dois iniciadores:

iniciador nº 1: 5'-GGC GGATCC GGATCA ACG TTC ACC ATA GTT-3'
(iniciador 5') **BamHI** **SphI** +1VSV-G

iniciador nº 2: complementar ao gene C-terminal de VSV-G
(iniciador 3') 5'GGC GGATCC TTA CTT TCC AAG TCG-3'
BamHI Códon de terminação

O plasmídeo pwK1 (que contém o gene G de comprimento total de VSV_{Ind}, e proporcionado gentilmente pelo Dr. Robert R. Wagner, Universidade de Virgínia, E.U.A.) foi usado como o molde e amplificado com o kit de amplificação Gene por 30 ciclos de PCR num termociclador Cetus de Perkin-Elmer (os ciclos foram 94°C, 1 min; 45°C, 2 min; 72°C, 3 min) a partir de 20 ng de pwK1 como o molde e 1,0 µM de cada iniciador.

Todos os iniciadores tinham sítios de BamHI na sua terminação 5' de modo que o fragmento de ADN de VSV-G-ΔS amplificado pode ser inserido no sítio de BamHI do plasmídeo, pBluescript SK VECTOR (Stratagene). O clone

em que a terminação 5' de VSV-G- Δ S em direcção ao promotor T7 foi seleccionado e digerido com enzimas de restrição SphI mais XhoI. O vector é mostrado na figura 5.

Amplificação da sequência sinal de VIH-1:

A sequência sinal de VIH-1 do gene *env* foi amplificada a partir de pBluescript-gp120-NSS por meio de PCR com os seguintes dois iniciadores:

Iniciador nº 1 5' - AAT ACG ACT CAC TAT - 3'
(iniciador T7)

Iniciador nº 2 5' - GGC ~~GCATGC~~ ACT ACA GAT CAT - 3'
(complementar a SphI
terminação c do
gene da sequência
sinal do VIH-1)

Isto é ilustrado na figura 6. O fragmento de ADN amplificado que contém sequência sinal de VIH-1 foi digerido com enzimas de restrição XhoI mais SphI, e inserido no vector digerido com XhoI e SphI, pBluescript VSV-G- Δ s. O plasmídeo resultante é designado como pBSK VSV-G-NSS, e o constructo foi confirmado adicionalmente por meio de sequenciamento de ADN. Isto é ilustrado na figura 7.

O fragmento de BamHI de VSV-G-NSS foi inserido no sítio de BamHI de um baculovírus pAcYM1 (Li *et al.* Virology 204:266-278, 1994), e um baculovírus recombinante que expressa VSV-G-NSS foi gerado por meio

de método de transfecção padrão (Li *et al.* Virology 204: 266-278, 1994).

Exemplo 2

Exame microscópico de células infectadas por baculovírus recombinantes

Células SF21 foram infectadas por AcNPV recombinante a uma m.o.i. de 5 UFP/célula e incubadas a 27°C por 48 h. As células infectadas foram examinadas por meio de microscópio de contraste de fase. Os resultados são mostrados na figura 1. (A) células infectadas por AcNPV de tipo selvagem; (B) células infectadas por vAcgp120-NS (rgp120 com a sequência sinal natural de VIH-1 mostrando lise celular); (C) células infectadas por vAcgp120-ΔS; (rgp120 sem a sequência sinal mostrando células intactas); (D) células infectadas por vAc8gp120-MS- (rgp120 com sequência sinal de melitina mostrando células intactas); (E) células infectadas por vAcVSV-G (proteína G de VSV mostrando células intactas); (F) células infectadas por vAcVSV-G-NS. (proteína G de VSV com a sequência de natural sinal de env de VIH-1 mostrando lise celular).

Os resultados acima demonstram que a sequência sinal de env de VIH-1 mata as células rapidamente.

Exemplo 3

Efeitos da sequência sinal de env de VIH-1 sobre a morte celular

Ensaio de azul de tripiano:

Células SF21 foram infectadas por AcNPV recombinante a uma m.o.i. de 5 UFP/Célula por 1 h, e o inóculo foi removido e incubado com o meio completo TNM-FH que contém 10% de soro fetal bovino (FBS). A 24, 48 e 72 h após a infecção, as células foram coradas com azul de tripiano (GIBCO, BRL) por 5 min e as células foram contadas ao microscópio e a percentagem de células mortas foi determinada pelo uso da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Células mortas (coradas)}}{\text{células viáveis (não coradas) + Células mortas}} \times 100 = \% \text{ de células mortas}$$

Ensaio de libertação de lactato desidrogenase (LDRA):

O LDRA foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Kit de detecção de citotoxicidade de Boehringer Mannheim).

Células SF21 foram infectadas por AcNPV recombinante a uma m.o.i. de 5 UFP/célula por 1 h, e o inóculo foi removido e incubado com meio completo a 27°C, o meio de cultura foi recolhido em intervalos regulares de 12 h e centrifugados a 12.000 rpm por 1 min. O sobrenadante da cultura foi diluído 10 vezes e 100 µl do sobrenadante foram incubados com 100 µl de mistura de reacção (kit de detecção de citotoxicidade) por 30 min a temperatura ambiente. A absorvância das amostras foi medida a 490 nm pela quantificação da coloração formazan formada pelo uso de um leitor de microplaca (ELISA) (Bio-Rad 550).

Os resultados dos ensaios de azul de tripano e libertação de lactato desidrogenase são ilustrados nas figuras 2A e 2B, respectivamente. Figura 2A; percentagem de células permeabilizadas pelo azul de tripano (células mortas) após a expressão de proteínas rgp120 ou VSV-G com sequências sinal diferentes. Figura 2B; ensaio de libertação de lactato desidrogenase (LDH). (Kit de detecção de citotoxicidade de Boehringer Mannheim). As quantidades de LDH libertadas das células SF21 infectadas com vírus recombinantes que expressam rgp120 ou VSV-G com sequências sinal diferentes foram medidas pela quantificação da coloração formazan formada em leitura de placas de ELISA a 490 nm.

Em conclusão rgp120 e VSV-G com a sequência sinal natural de env de VIH-1 matam as células muito mais rápido. As células sobrevivem muito mais tempo sem a sequência sinal natural de env de VIH-1 ou com sequência sinal de melitina. A sequência sinal natural de env de VIH-1 é responsável pela morte celular rápida.

Exemplo 4

Exame da apoptose:

Método de extracção de ADN total:

Células SF21 (3×10^6) foram infectadas por AcNPV recombinante a uma m.o.i. de 5 UFP/célula por 1 h. O inóculo foi removido e incubado com meio completo a 27°C por 48 h. As células foram sedimentadas a 2500 rpm por 10 min e extraídas com TSE (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1

mM, SDS a 1%, ao que se adicionou proteinase K a uma concentração final de 70 µg/ml). Então, as amostras foram incubadas por 2 h a 37°C, e ao final da incubação foi adicionado NaCl a uma concentração final de 1 M e então as amostras foram incubadas a 4°C durante a noite. O ADN foi extraído com fenol:clorofórmio (1:1) e com clorofórmio. Finalmente foi adicionado etanol (100%) para precipitar o ADN (15 min a 80°C) e o ADN precipitado foi sedimentado por meio de microcentrifugação a 12.000 rpm por 15 min. O sedimento de ADN foi lavado uma vez com etanol a 70% ressuspenso em TE (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) com ARNase A (50 µg/ml), submetido a electroforese em gel de agarose a 1,2% e corado com brometo de etídio. (N. Chejanovsky e E. Gershburg, Virology 209: 519-525, 1995). Os resultados são ilustrados na figura 3. ADN celular total (A) ou ADN de baixo peso molecular (B) foi extraído a 48 h após a infecção e analisado por meio de electroforese em gel de agarose a 1,2% em presença de brometo de etídio. Bandas M, marcador de ADN; bandas WT, células infectadas por AcNPV de tipo selvagem; bandas células infectadas com ΔS (rgp120 sem a sequência sinal); banda NSS, células infectadas por vAcgpl20-NS (rgp120 com a sequência sinal natural de env do VIH-1); Bandas MSS, células infectadas por vAcgpl20-MS (rgp120 com sequência sinal de melitina). Os resultados acima demonstram que a sequência sinal natural de env do VIH-1 induz apoptose.

Extracção de ADN fragmentado:

Células SF21 foram infectadas por vAcVSV-G (VSV-G) ou vAcVSV-G-NSS (VSV-G-NSS) a uma m.o.i. de 5 UFP/célula

e incubadas a 27°C por 48 horas. A 48 h após a infecção, as células SF21 (3×10^6) foram sedimentadas a 2500 rpm por 5 min e lisadas em solução que continha Tris HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM, e Triton X-100 a 0,5%, e centrifugadas a 12.000 rpm por 25 min numa microcentrífuga Eppendorf para sedimentar o ADN cromossômico. O sobrenadante foi digerido com 0,1 mg de ARNase A por ml a 37°C por 1 h e então por 2 h com 1 mg proteinase K por ml a 50°C em presença de SDS a 1%, extraído com fenol e clorofórmio, precipitado com etanol frio. O precipitado foi ressuspenso em TE e submetido a electroforese em gel de agarose a 11,5% que continha 5 µg de brometo de etídio por ml. O ADN foi visualizado por meio de transiluminação UV. (Rosario Leopardi e Bernard Roizman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9583-9587, 1996).

Os resultados são mostrados na figura 3, painel B e figura 4, painel B.

Exemplo 5

Construção de VIH-1 recombinante que contém deleção parcial de *vpu* e *nef* e substituição de NSS

1. Construção de plasmídeo pNL4-3 que contém a substituição de NSS (com MSS, IL-3 ou quaisquer outras sequências sinal) e deleção de *vpu*.

Um clone ADN proviral de VIH-1 infeccioso, pNL4-3 (proporcionado pelo Dr. Malcolm Martin através do programa de reagente de referência e pesquisa da SIDA

"AIDS Research and Reference Reagent program", Division of AIDS, NIAID, NIH, Adachi *et al*, J. Virol. 59:284-291, 1986), contém dois sítios de enzima de restrição únicos; EcoRI (posição 5744) e BamHI (posição 8466). A região codificante do gene *env* começa desde a posição 6221 e termina na posição 8785. Para substituir a sequência sinal natural de VIH-1 *env* com melitina, IL-3 ou quaisquer outras sequências sinal secretoras de proteína, o fragmento de EcoRI-BamHI de pNL4-3 é isolado a partir de gel de agarose e subclonado no sítio de EcoRI-BamHI do vector pBluescript SK tal como é ilustrado na figura 8. A partir deste produto, quatro iniciadores são desenhados tal como segue:

Iniciador nº 1 (Directo):

5'-GGC GAATTC TGCAACAAC TGC TG -3'

EcoRI

iniciador nº 2 (Reverso):

5'-GGC CTG CAG TCA TTA GGC ACT GTC TTC TGC TCT TTC -3'

PstI Códons de terminação

iniciador nº 3 (Directo):

5'-GGC CTG CAG CCA TGG ACA GAA AAA TTG TTG GTC ACA GTC-3'

PstI NcoI

Iniciador nº 4 (Reverso):

5'-GGC GGATCC GTT CAC TAA TCG AAT GG-3'

BamHI

São usados pBSK-env como molde mais os iniciadores nº 1 e nº 2 e é realizado PCR para amplificar a porção esquerda da região env, fragmento de 477 pb. Similarmente, os iniciadores nº 3 e nº 4 são empregados para amplificar a porção direita de env, 2245 pb. O produto de PCR de EcoRI-PstI (fragmento de 477 pb) foi digerido com EcoRI + PstI enquanto o produto de PCR de PstI-BamHI (fragmento de 2245 pb) foi cortado com PstI + BamHI. Então, o fragmento de 2245 pb digerido com PstI-BamHI foi clonado nos sítios de PstI + BamHI do vector pBSK tal como é mostrado na figura 9.

Depois disto, o pBSK-2245 foi digerido com EcoRI + PstI e ligado com os produtos de PCR digeridos de EcoRI + PstI (fragmento de 445 pb) resultando no plasmídeo pBSK-env-ΔS, tal como é mostrado na figura 10.

O plasmídeo pBSK-env-ΔS foi digerido com PstI + NcoI e então ligado com o oligonucleótido sintético que codifica MSS, sequências sinal de IL-3 ou quaisquer outras sequências sinal desejadas. Este oligonucleótido sintético contém um sítio de PstI na extremidade 5' e um sítio de NcoI na extremidade 3'. Antes da ligação no vector, estes oligonucleótidos de dupla fita em primeiro lugar foram digeridos com PstI + NcoI.

A. Oligonucleótido sintético que codifica sequência sinal de melitina (somente o sentido positivo é mostrado):

PstI
5'-GGC CTG CAG ATG AAA TTC TTAGTC AAC GTT GCC
CTT GTT TTT ATG GTC GTG TACATT TCT TAC
ATC TAT GCG GAT CCATGG GCC -3'
NcoI

Oligonucleótido sintético que codifica sequência
sinal de interleucina-3: (somente o sentido positivo é
mostrado):

5'-GGC CTG CAG ATG CTG CTC CTG CTC CTG ATG CTC
TTC CAC GGA CTC CAA GCT TCA ATC AGT GGC GAT
CCATGG GCC -3'
NcoI

O plasmídeo recombinante resultante é mostrado na figura 11.

Após o sequenciamento para verificar a modificação correcta, o plasmídeo foi digerido com EcoRI + BamHI para isolar o fragmento de EcoRI - BamHI, que foi clonado de novo nos sítios de EcoRI-BamHI do vector de ADN proviral de pNL4-3. O plasmídeo resultante é designado pHIV-1-MSS (ou pHIV-1-IL3SS).

Além disso, durante a construção acima, substituiu-se a NSS por não somente MSS ou sequência sinal de IL-3, mas também cria-se deleção parcial do gene *vpu*. O *vpu* codifica 82 aa e sua extremidade 3' sobrepõe-se com a sequência sinal do gene *env* do VIH-1, aproximadamente 28 aa. Contudo, está num marco de leitura diferente (marco de leitura -1). Estudos mostraram que a deleção dos

genes *vpu* ou *nef* não altera a replicação do vírus em ou CMSP de chimpanzés, CMSP humanas, ou na linha híbrida de células B/T CEMx174 (James *et al*, AIDS Res. Human Retrovirus 10:343-350, 1994). Portanto, durante a amplificação por meio de PCR do fragmento de 455 pb da porção esquerda de *env* com os iniciadores nº 1 e nº 2, dois códons de terminação foram adicionados justo diante do códon de iniciação do gene *env* que resulta na deleção de 28 aa de *vpu* (veja-se o iniciador nº 2).

2 Construção de plasmídeo que contém deleção de *nef*.

A sequência codificante do gene *nef* inicia desde a posição 8787 e termina na posição 9407 em clone de ADN proviral pNL4-3. Existem também dois sítios de enzima de restrição únicos; o sítio de BamHI na posição 8466 no gene *env* e sítio de XhoI na posição 8887 no gene *nef*. Para fazer a deleção do gene *nef*, o plasmídeo VIH-1 MSS (ou IL-3SS) foi digerido com BamHI e XhoI. O fragmento resultante de 421 pb de BamHI-XhoI foi isolado e subclonado nos sítios de BamHI-XhoI do vector pBSK tal como é mostrado na figura 12. Dois iniciadores foram desenhados:

BamHI
iniciador nº 5: 5'-GCC GGATCC TTAGCACTTATCTGG-3'
(Directo)

XhoI
iniciador nº 6: 5'-GCC CTCGAG TCA TTA ATA CTG CTC CCA CCC-3'
Códons de terminação

O gene *nef* codifica 260 aa de acordo com o presente desenho. Dois códons de terminação foram inseridos no sítio de XhoI que resulta no *nef* que codifica somente 33

aa. Após a amplificação por meio de PCR e digestão com BamHI + XhoI, este fragmento de ADN de PCR de 421 pb foi clonado de novo dentro do vector BamHI-XhoI pHIV-1-MSS (ou IL-3SS). O plasmídeo recombinante resultante contém a substituição de NSS e deleção parcial de *vpu* e *nef*, que é usado para o teste de vacina.

Embora a presente invenção tenha sido descrita com referência ao que são considerados actualmente os exemplos preferidos, deve-se entender que a invenção não está limitada aos exemplos revelados. Ao contrário, a invenção pretende cobrir diversas modificações e arranjos equivalentes incluídos dentro do espírito e escopo das reivindicações adjuntas.

Lisboa, 7 de Agosto de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Vírus da imunodeficiência humana 1 (VIH-1) recombinante não citolítico **caracterizado por** a sequência sinal natural (NSS) da glicoproteína do envelope do vírus ser modificada pela eliminação de aminoácidos carregados positivamente para proporcionar uma sequência sinal não citolítica ou **por** a NSS ser substituída por ou uma sequência sinal de melitina (MSS) ou uma sequência sinal de IL-3 (ILSS).

2. Retrovírus recombinante não citolítico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a sequência sinal não citolítica modificada ser modificada para conter não mais de um aminoácido carregado positivamente.

3. Retrovírus recombinante não citolítico, de acordo com ou a reivindicação 1 ou a 2, **caracterizado por** a sequência sinal não citolítica modificada ser modificada para conter zero aminoácidos carregados positivamente.

4. Retrovírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado por** o retrovírus se tornar avirulento pela deleção do gene *nef*.

5. Vacina **caracterizada por** incorporar o retrovírus de qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

6. Uso de um VIH-1 recombinante não citolítico **caracterizado por** a NSS da glicoproteína do envelope do vírus ser substituída por ou uma sequência sinal de

melitina (MSS) ou uma sequência sinal de IL-3 (ILSS) para o fabrico de uma preparação de vacina para a prevenção ou o tratamento de uma infecção retroviral.

7. Uso de um VIH-1 recombinante não citolítico **caracterizado por** a NSS da glicoproteína do envelope de vírus ser modificada pela eliminação de aminoácidos carregados positivamente para proporcionar uma NSS não citolítica para o fabrico de uma preparação de vacina para a prevenção ou o tratamento de uma infecção retroviral.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado por** a modificação para proporcionar uma NSS não citolítica resulta em não mais de um aminoácido carregado positivamente na sequência NSS.

9. Uso, de acordo com ou a reivindicação 7 ou a 8, **caracterizado por** a modificação para proporcionar uma NSS não citolítica resulta em zero aminoácidos carregados positivamente.

10. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, **caracterizado por** o vírus se tornar avirulento pela deleção do gene *nef*.

11. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 10, **caracterizado por** a preparação de vacina ser para o tratamento de infecção por VIH.

12. Vacina que compreende um VIH-1 recombinante não citolítico **caracterizada por** a NSS da glicoproteína do

envelope do vírus ser substituída por ou uma sequência sinal de melitina (MSS) ou uma sequência sinal de IL-3 (ILSS).

13. Vacina que compreende um VIH-1 recombinante não citolítico **caracterizada por** a NSS da glicoproteína do envelope de retrovírus ser modificada pela eliminação de aminoácidos carregados positivamente para proporcionar uma NSS não citolítica.

14. Vacina, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizada por** a sequência sinal natural ser modificada para reduzir o número de aminoácidos carregados positivamente a não mais de um aminoácido carregado positivamente.

15. Vacina, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizada por** o número de aminoácidos carregados positivamente ser zero.

16. Vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 15, **caracterizada por** o retrovírus se tornar avirulento pela deleção do gene *nef*.

17. Vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 16, **caracterizada por** compreender também um adjuvante.

18. Vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 17, **caracterizada por** ser para o tratamento de infecção por VIH.

19. Uso de um VSV recombinante que contém NSS de uma glicoproteína do envelope de VIH-1 e um sítio de reconhecimento específico para uma célula alvo de cancro **caracterizado por** ser para o fabrico de um medicamento para o tratamento de cancro.

20. Uso de um oligonucleótido antisense que é complementar a uma sequência de ácido nucleico para uma NSS do gene da glicoproteína do envelope **caracterizado por** ser para o fabrico de um medicamento para o tratamento de uma infecção retroviral.

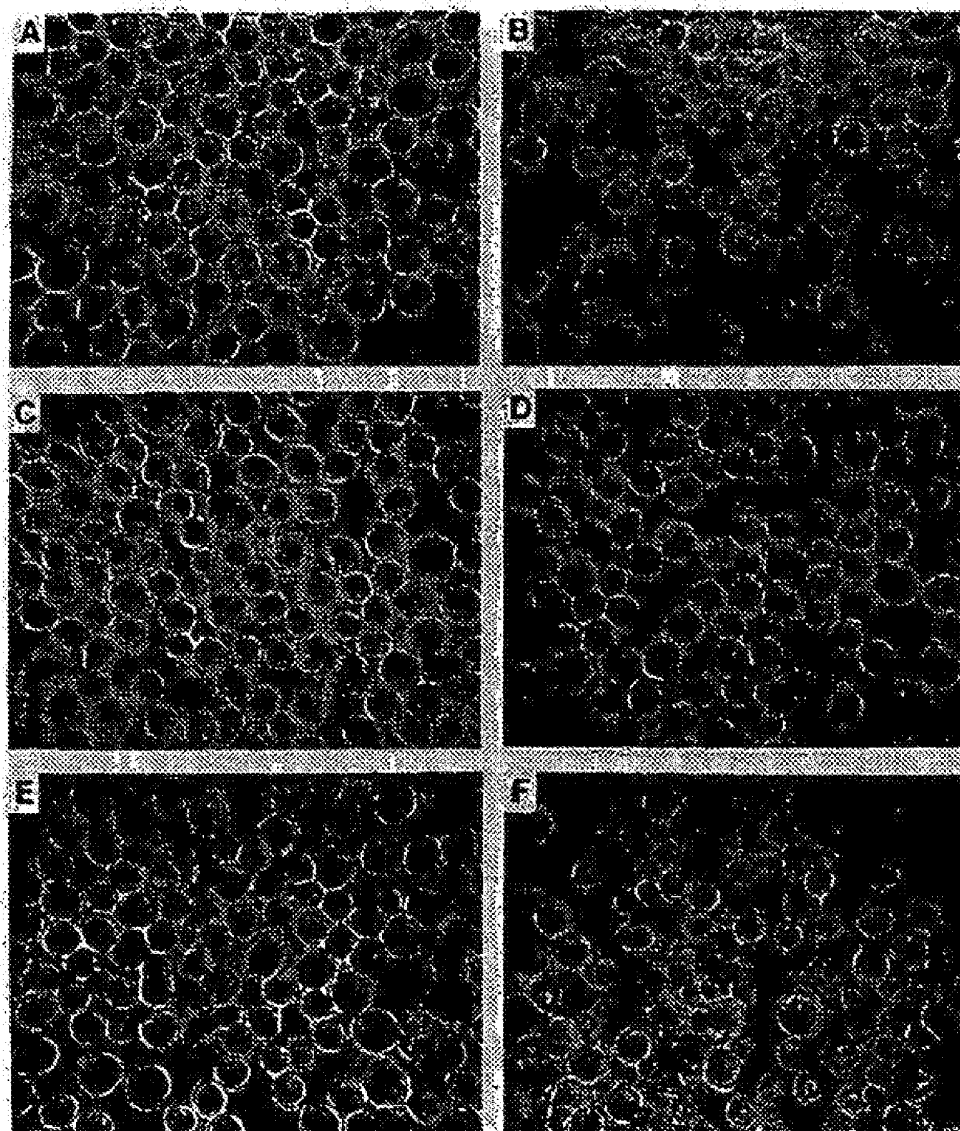
21. Uso, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado por** a infecção retroviral ser infecção por VIH.

Lisboa, 7 de Agosto de 2009

RESUMO**VACINA CONTRA O VIH**

É proporcionada uma nova vacina contra o VIH. Em particular, a vacina compreende um VIH recombinante avirulento e não citolítico em que a NSS da glicoproteína do envelope do vírus é substituída por uma sequência sinal não citolítica e o gene *nef* do vírus é deletado o que torna o vírus avirulento.

FIGURA 1



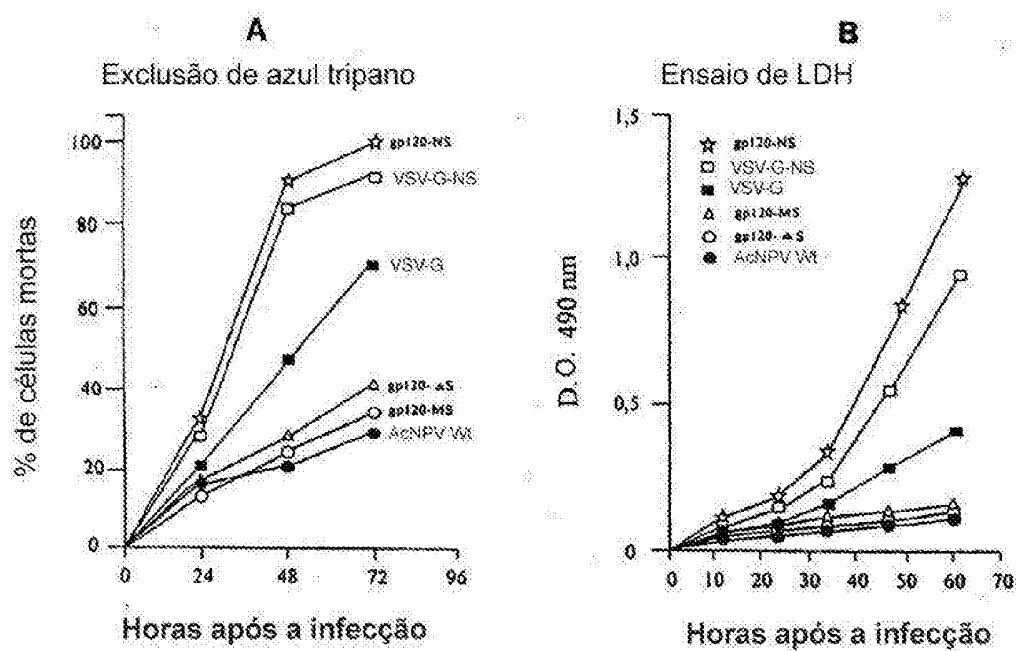


FIGURA 2

FIGURA 3

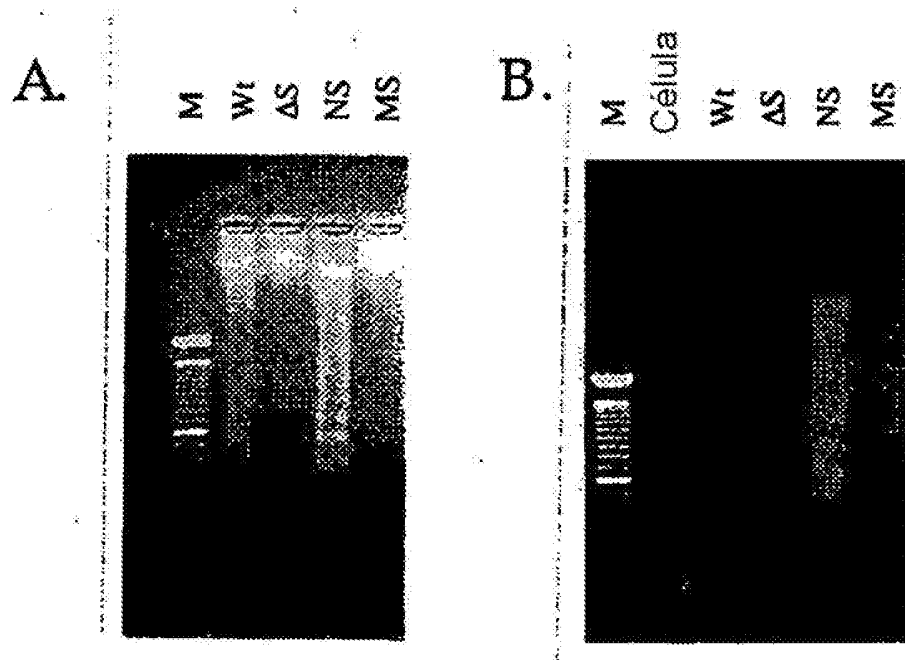


FIGURA 4

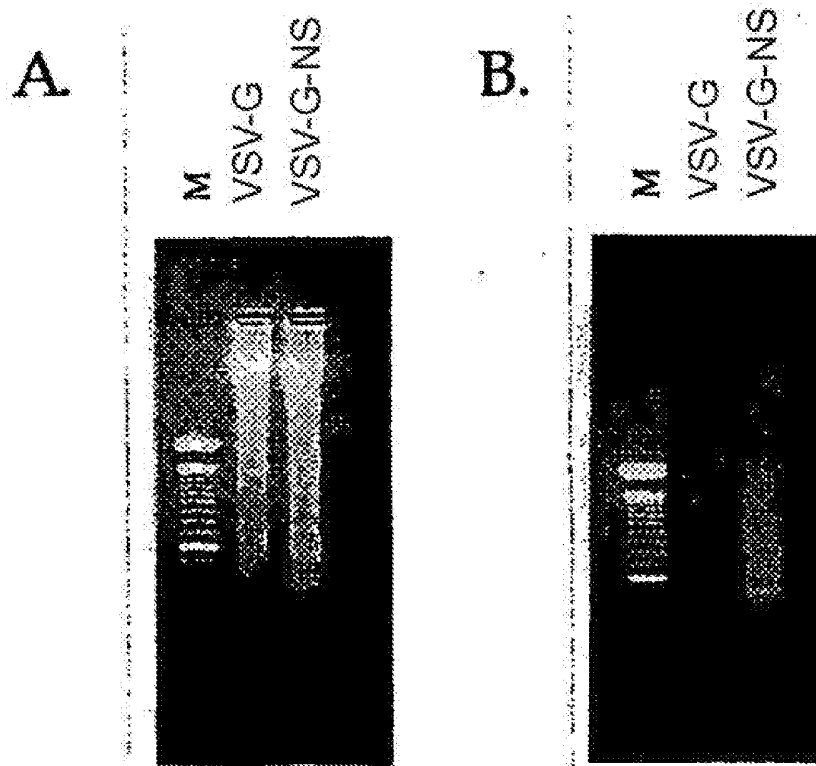


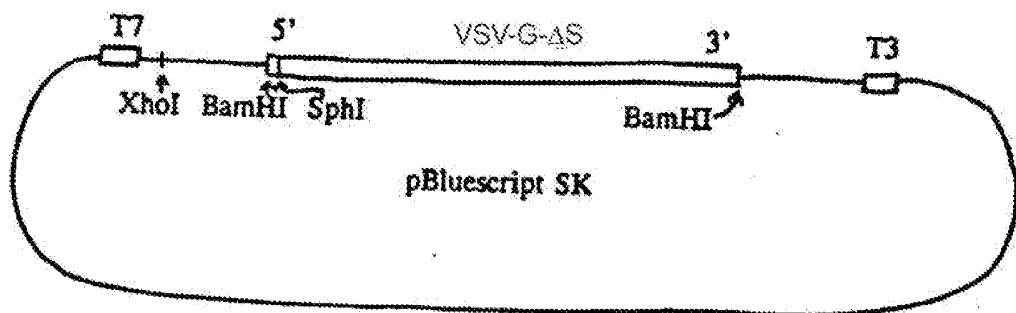
FIGURA 5

FIGURA 6

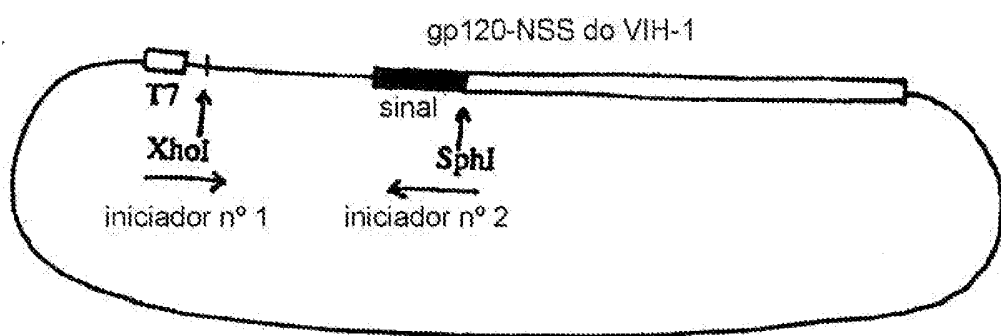


FIGURA 7

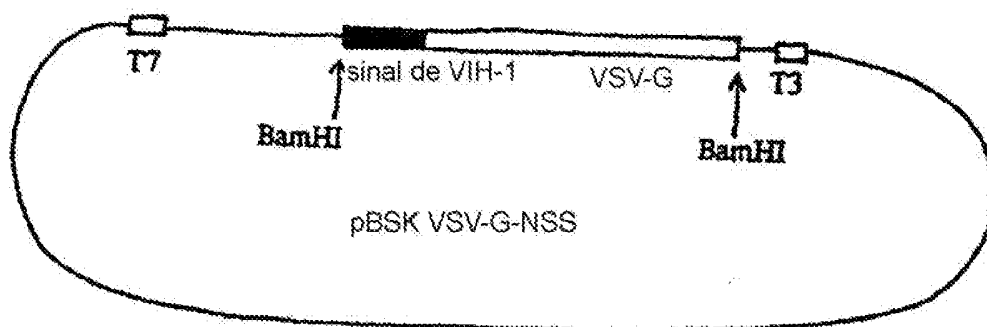


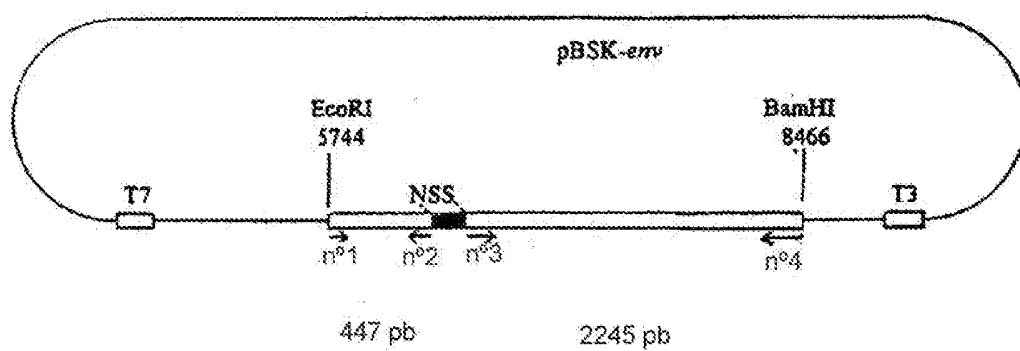
FIGURA 8

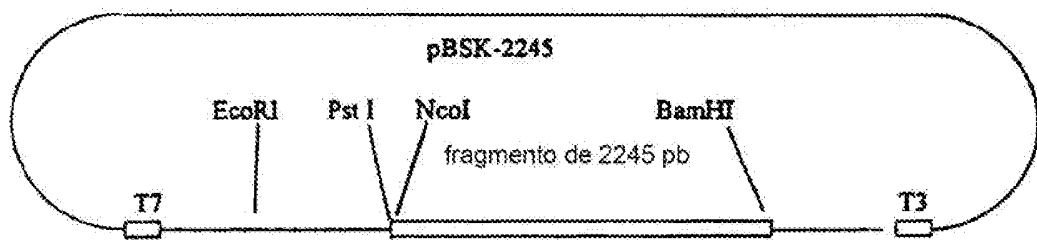
FIGURA 9

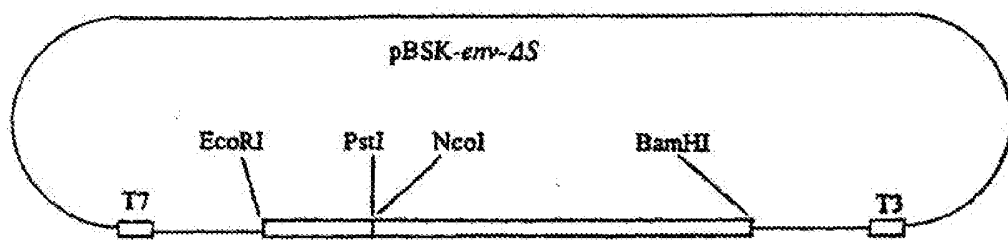
FIGURA 10

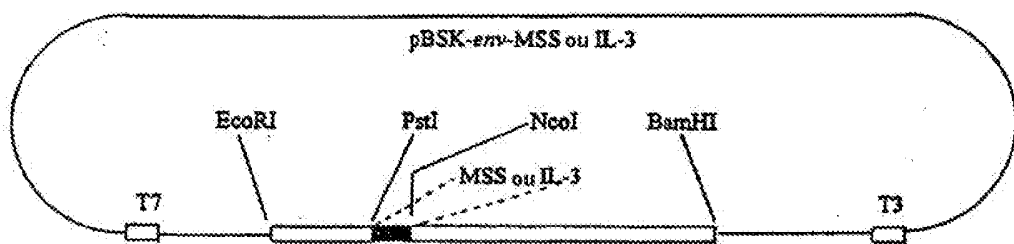
FIGURA 11

FIGURA 12