



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

(11) PI 0308103-6 B1



(22) Data do Depósito: 28/02/2003

(45) Data de Concessão: 19/02/2019

(54) Título: VACINA DE DNA EFICAZ PARA DESPERTAR UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA CÉLULAS ENDOTELIAIS PROLIFERANTES, USO DE UMA CONSTRUÇÃO DE DNA QUE CODIFICA OPERACIONALMENTE UMA PROTEÍNA DE RECEPTOR DE VEGF E UM VEÍCULO FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DESTA E ARTIGO DE MANUFATURA

(51) Int.Cl.: A61K 39/00; A61K 48/00; C12N 1/21; C12N 15/12; C12N 15/70; (...).

(30) Prioridade Unionista: 02/03/2002 US 10/090.183.

(73) Titular(es): THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE.

(72) Inventor(es): RALPH A. REISFELD; RONG XIANG; ANDREAS G. NIETHAMMER.

(86) Pedido PCT: PCT US2003006256 de 28/02/2003

(87) Publicação PCT: WO 2003/073995 de 12/09/2003

(85) Data do Início da Fase Nacional: 31/08/2004

(57) Resumo: "VACINA DE DNA CONTRA CÉLULAS ENDOTELIAIS PROLIFERANTES E MÉTODOS DE USO DESTA". Uma vacina de DNA eficaz para inibição de proliferação de célula endotelial que compreende uma construção de DNA que codifica operacionalmente uma proteína de receptor de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Essa invenção fornece vacinas de DNA que codificam receptor-2 de VEGF (KDR, ID. DE SEQ. Nr: 2), receptor-1 de VEGF (Flt-1, ID. DE SEQ. Nr: 4), ou Flk-1 (o homólogo murídeo de KDR, ID. DE SEQ. Nr: 6), seqüências de DNA IDS. DE SEQ. Nrs: 1, 3, e 5 respectivamente, bem como métodos de uso de tal vacina de DNA para inibir proliferação de célula vascular endotelial no microambiente do tumor. É obtida anti-angiogênese e subsequente diminuição do crescimento e disseminação de tumor.

VACINA DE DNA EFICAZ PARA DESPERTAR UMA RESPOSTA IMUNE
CONTRA CÉLULAS ENDOTELIAIS PROLIFERANTES, USO DE UMA
CONSTRUÇÃO DE DNA QUE CODIFICA OPERACIONALMENTE UMA
PROTEÍNA DE RECEPTOR DE VEGF E UM VEÍCULO FARMACEUTICAMENTE
ACEITÁVEL DESTA E ARTIGO DE MANUFATURA

Direitos Governamentais

[001] Essa invenção foi feita com apoio governamental sob o Contrato No. 5-70373-COLON pelo "National Institutes of Health". O governo tem certos direitos na invenção.

Campo Da Invenção

[002] Essa invenção se relaciona a vacinas de ácido desoxirribonucleico (DNA) que codificam moléculas adequadas eficazes para despertar uma resposta imune contra células endoteliais proliferantes. Mais particularmente essa invenção se relaciona a vacinas de DNA que codificam o receptor de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Essa invenção também se relaciona a métodos de uso da vacina de DNA para inibir proliferação de célula vascular endotelial, crescimento de tumor, e angiogênese.

Fundamentos Da Invenção

[003] Vacinas foram utilizadas para fornecer uma proteção de longo prazo contra inúmeras condições de doença por administração muito limitada de um agente profilático que estimula o sistema imune de um organismo a destruir patógenos de doença antes que eles possam proliferar e causar um efeito patológico. Várias abordagens para vacinas e vacinações são descritas em Bernard R. Glick e Jack J. Pasternak, *Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA*, Segunda Edição, ASM Press pp. 253-276 (1998).

[004] Vacinação é um meio de induzir o sistema imune do próprio corpo a perseguir e destruir um agente infeccioso antes que ele cause uma resposta patológica. Tipicamente, vacinas são agentes infecciosos vivos, mas atenuados, (vírus ou bactérias) ou uma forma morta do agente. Uma vacina que consiste em uma bactéria ou vírus vivo deve ser não-patogênica. Tipicamente, uma cultura bacteriana ou viral é atenuada (enfraquecida) por tratamento físico ou químico. Embora o agente seja avirulento, ele ainda pode despertar uma resposta imune em um indivíduo tratado com a vacina.

[005] Uma resposta imune é despertada por antígenos, sejam macromoléculas específicas, ou um agente infeccioso. Esses antígenos são geralmente proteínas, polissacarídeos, lipídeos, ou glicolipídeos, que são reconhecidos como "estranhos" por linfócitos conhecidos como células B e células T. A exposição a ambos os tipos de linfócitos a um antígeno desperta uma divisão celular rápida e resposta de diferenciação, resultando na formação de clones dos linfócitos expostos. Células B produzem células plasmáticas, as quais, por sua vez, produzem proteínas chamadas anticorpos (Ab), os quais se ligam seletivamente aos antígenos presentes no agente infeccioso, neutralizando ou inativando assim o patógeno (imunidade humoral). Em alguns casos, a resposta de célula B requer a assistência de células T auxiliares CD4.

[006] O clone de célula T especializado que se forma em resposta à exposição ao antígeno é um linfócito T citotóxico (CTL), que é capaz de se ligar aos, e eliminar patógenos e tecidos que apresentam o antígeno (imunidade

mediada por célula ou imunidade celular). Em alguns casos, uma célula de apresentação de antígeno (APC) tal como uma célula dendrítica, irá envelopar um patógeno ou outra célula estranha por endocitose. A APC então processa os antígenos das células, e apresenta esses antígenos na forma de um complexo de histocompatibilidade molécula:peptídeo ao receptor de célula T (TCR) em CTLs, estimulando dessa forma uma resposta imune.

[007] Imunidade humoral caracterizada pela formação de anticorpos específicos é geralmente mais eficaz contra infecções bacterianas agudas e infecções de repetição por vírus, enquanto imunidade mediada por célula é mais eficaz contra infecção viral, infecção bacteriana intracelular crônica, e infecção fúngica. Imunidade celular também é conhecida por proteger contra cânceres e é responsável por rejeição de transplantes de órgão.

[008] Anticorpos para antígenos de infecções anteriores permanecem detectáveis no sangue por períodos de tempo muito longos, gerando assim um meio de determinação de exposição anterior a um patógeno. Mediante re-exposição ao mesmo patógeno, o sistema imune eficazmente evita re-infecção pela eliminação do agente patogênico antes que ele possa proliferar e produzir uma resposta patogênica.

[009] A mesma resposta imune que seria despertada por um patógeno também pode algumas vezes ser produzida por um agente não-patogênico que apresenta o mesmo antígeno que o patógeno. Dessa forma, o indivíduo pode ser protegido contra exposição subsequente ao patógeno sem ter previamente lutado contra uma infecção.

[010] Nem todos os agentes infecciosos podem ser

prontamente cultivados e inativados, como é necessário para formação de vacina, entretanto. Técnicas modernas de DNA recombinante permitiram o projeto de novas vacinas para tentar superar essa limitação. Podem ser criados agentes que são desprovidos dos genes patogênicos, permitindo desse modo que seja usada uma forma viva, avirulenta do organismo como uma vacina. Também é possível projetar um organismo relativamente não-patogênico tal como *E. coli* para apresentar os antígenos de superfície da célula de um transportador patogênico. O sistema imune de um indivíduo tratado com um transportador como este é "enganado" na formação de anticorpos para o patógeno. As proteínas antigênicas de um agente patogênico podem ser projetadas e expressas em uma espécie não-patogênica e as proteínas antigênicas podem ser isoladas e purificadas para produzirem uma "vacina de subunidade". Vacinas de subunidade têm a vantagem de serem estáveis, seguras, e quimicamente bem definidas; no entanto, sua produção pode ter um custo proibitivo.

[011] Uma nova abordagem para vacinas surgiu nos últimos anos, denominada de forma ampla imunização genética. Nessa abordagem, um gene que codifica um antígeno de um agente patogênico é operacionalmente inserido em células no indivíduo a ser imunizado. As células tratadas são transformadas e produzem as proteínas antigênicas do patógeno. Esses antígenos produzidos *in vivo* desencadeiam então a resposta imune desejada no hospedeiro. O material genético utilizado em tais vacinas genéticas pode ser uma construção tanto de DNA quanto de RNA. Frequentemente o polinucleotídeo que codifica o antígeno é introduzido em

combinação com outras seqüências promotoras de polinucleotídeo para aumentar a inserção, replicação, ou expressão do gene.

[012] Vacinas de DNA que codificam genes de antígeno podem ser introduzidas nas células hospedeiras do indivíduo por vários sistemas de expressão. Esses sistemas de expressão incluem sistemas de expressão procarióticos, de mamífero, e de levedura. Por exemplo, uma abordagem é utilizar um vetor viral, tal como um vírus de vacínia que incorpora o novo material genético, para inocular as células hospedeiras. Alternativamente, o material genético pode ser incorporado em um vetor ou pode ser liberado diretamente para as células hospedeiras como um polinucleotídeo "desnudo", ou seja, simplesmente como DNA purificado. Além disso, o DNA pode ser transfectado de forma estável em bactérias atenuadas tal como *Salmonella typhimurium*. Quando um paciente é vacinado oralmente com a *Salmonella* transformada, as bactérias são transportadas até as placas de Peyer no intestino (ou seja, tecidos linfóides secundários), os quais então estimulam uma resposta imune.

[013] Vacinas de DNA fornecem uma oportunidade para imunizar contra estados de doença que não são causados por patógenos tradicionais, tais como doenças genéticas e câncer. Tipicamente, em uma vacina genética para câncer, antígenos para um tipo específico de célula tumoral devem ser isolados e então introduzidos na vacina. Uma vacina geral eficaz contra inúmeros cânceres pode assim levar ao desenvolvimento de numerosas vacinas individuais para cada tipo de célula de câncer contra o qual se deseja imunizar.

[014] Uma abordagem geral para tratamento de tumores envolve a administração de compostos de inibição de angiogênese para pacientes com tumores em crescimento. Angiogênese é o processo pelo qual novos capilares e vasos sanguíneos se formam. Angiogênese é importante no desenvolvimento embriônico, crescimento de tecido, reparo de tecido, e regeneração de tecido. Em adição a esses processos normais e essenciais, angiogênese também está envolvida em muitos processos patológicos anormais tais como crescimento de tumor, metástase de tumor, e doenças vasculares oculares tal como retinopatia diabética.

[015] Angiogênese envolve inúmeros processos interdependentes, incluindo (a) ativação de células endoteliais vasculares, (b) decomposição de proteínas da matriz celular por células endoteliais que expressam atividade de protease, (c) migração de células endoteliais para locais de crescimento potencial, (d) proliferação de células endoteliais e (e) formação de tubo por diferenciação de células endoteliais. Cada um desses processos é afetado por várias substâncias promotoras tais como fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), e fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF). Os fatores de crescimento vascular endotelial (coletivamente VEGF) desempenham um papel crucial no crescimento e diferenciação de célula endotelial. VEGF atua se ligando às tirosina quinases receptoras de proteína presentes nas membranas da célula endotelial, as quais por sua vez iniciam uma cascata de reações de transdução de sinal que estimula o crescimento celular.

[016] A inibição de angiogênese patológica foi proposta como um tratamento para tumores. Veja, por exemplo, Folkman *et al. Science*, 221, 719, (1983). O conceito básico de tal tratamento é que, uma vez que tumores requerem vascularização para crescer, a inibição de formação de vaso sanguíneo, através da administração de compostos de inibição de angiogênese, irá evitar o crescimento de tumor ao privar o tumor de seu suprimento sanguíneo. Uma desvantagem dessa abordagem é que inibidores de angiogênese devem ser administrados de forma relativamente contínua para evitar o crescimento de tumor. Uma cessação na liberação do inibidor pode levar ao ressurgimento de crescimento do tumor. Uma vacina eficaz na inibição da angiogênese seria um agente preventivo atraente contra formação de tumor.

[017] Há uma necessidade contínua por uma vacina geralmente eficaz para imunização contra angiogênese, que também pode inibir o crescimento de vários tumores sem a necessidade de um direcionamento para antígenos tumorais específicos. A presente invenção satisfaz essa necessidade.

Sumário Da Invenção

[018] Uma vacina de DNA eficaz para inibição de proliferação de célula endotelial compreende uma construção de DNA que operacionalmente codifica uma proteína de receptor de VEGF. A vacina de DNA compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína receptora para VEGF, tais como VEGFR-2 (KDR; ID. DE SEQ. N°: 2), VEGFR-1 (Flt-1; ID. DE SEQ. N°: 4), e Flk-1 (ID. DE SEQ. N°: 6; o homólogo murídeo de KDR), por exemplo, seqüências de DNA ID. DE SEQ. N°: 1, ID. DE SEQ. N°: 3, e ID. DE SEQ. N°:5,

respectivamente. A vacina pode compreender um ácido nucléico linear tal como uma construção de DNA purificada, ou uma construção de DNA incorporada em um vetor de plasmídeo. As vacinas de DNA da presente invenção estimulam a formação de CTLs ativas contra células endoteliais proliferantes que superexpressam VEGFR-2.

[019] Células endoteliais formam o revestimento interno do tecido vascular de mamífero. A proliferação de células endoteliais é um processo-chave em angiogênese. As vacinas da presente invenção fornecem um método para a produção de inibição de longo prazo de angiogênese em um organismo tratado com a vacina por despertar uma resposta imune contra células endoteliais proliferantes. Células endoteliais não-proliferantes, tais como os revestimentos internos de vasos sangüíneos estabelecidos, não apresentam quantidades significativas de antígenos de receptor de VEGF e dessa forma permanecem substancialmente não-afetadas pelas CTLs que são produzidas em resposta à vacina.

[020] Em um aspecto do método da presente invenção, uma vacina de DNA é utilizada para fornecer inibição de longo prazo de proliferação de célula endotelial em um paciente vacinado. Em uma modalidade do método, uma vacina de DNA que compreende uma construção de polinucleotídeo que codifica operacionalmente uma proteína de receptor de VEGF é administrada oralmente a um paciente que necessita de inibição de proliferação de célula endotelial em uma quantidade que é suficiente para despertar uma resposta imune contra células endoteliais proliferantes.

[021] A presente invenção também fornece um método de inibição de angiogênese em um paciente vacinado com uma

vacina de DNA. Em uma modalidade do método como esta, uma quantidade que desperta uma resposta imune de uma vacina que inclui uma construção de DNA que codifica operacionalmente uma proteína de receptor de VEGF é administrada a um paciente que sofre de uma doença relacionada a angiogênese.

[022] Em ainda outro aspecto do método da presente invenção, o crescimento de tumor é inibido pela vacinação de um paciente com uma vacina de DNA. Em uma modalidade do método como esta, uma quantidade eficaz que desperta uma resposta imune de uma vacina que compreende uma construção de DNA que codifica operacionalmente uma proteína de receptor de VEGF é administrada a um paciente que tem um tumor em crescimento. A vacinação resulta em interrupção do crescimento do tumor. A destruição de células endoteliais proliferantes pelo sistema imune do paciente evita vascularização do tumor, essencialmente interrompendo a nutrição do tumor até a morte.

[023] Nas modalidades do método da presente invenção, as vacinas de DNA podem ser administradas de forma enteral, tal como por administração oral, ou de forma parenteral, tal como por injeção ou infusão intravenosa.

[024] As vacinas da presente invenção são úteis para tratamento e prevenção de inúmeros estados de doença. Por exemplo, um paciente que sofre de um câncer, retinopatia diabética, e semelhantes, pode se beneficiar de imunização pelas vacinas da presente invenção.

Breve Descrição Dos Desenhos

[025] Nos Desenhos, FIGURA 1 revela a sequência de DNA que codifica KDR humana, ID. DE SEQ. N°: 1.

[026] FIGURA 2 revela a sequência de proteína de KDR humana, ID. DE SEQ. N°: 2.

[027] FIGURA 3 revela a sequência de DNA que codifica Flt-1 humana, ID. DE SEQ. N°: 3.

[028] FIGURA 4 revela a sequência de proteína de Flt-1 humana, ID. DE SEQ. N°: 4.

[029] FIGURA 5 revela a sequência de DNA que codifica Flk-1 de camundongo, ID. DE SEQ. N°: 5.

[030] FIGURA 6 revela a sequência de proteína de Flk-1 humana, ID. DE SEQ. N°: 6.

[031] FIGURA 7 é uma representação pictórica de pulmões de camundongo tendo vários níveis de cobertura de tumor variando de cobertura >50% (rotulado 3) até cobertura <10% (rotulado 1).

[032] FIGURA 8 é uma representação gráfica de dados que demonstram que camundongos vacinados com uma vacina de DNA da invenção (linha negra espessa, sólida) e atacados por injeção intravenosa de células de carcinoma de cólon CT-26, exibiram mortalidade significativamente reduzida em relação a dois grupos de controle de camundongos (camundongos não vacinados: linha fina sólida; vacina de controle: linha pontilhada).

[033] FIGURA 9 é uma representação gráfica de dados que demonstram a supressão de crescimento tumoral de carcinoma de pulmão de Lewis D121 em camundongos vacinados com uma vacina de DNA da invenção (pcDNA3.1-FLK-1) em relação a dois grupos de controle de camundongos.

[034] FIGURA 10 é uma representação gráfica de dados que demonstram a supressão de crescimento tumoral de melanoma B16 em camundongos vacinados com uma vacina de DNA

da invenção (●) em relação a um grupo de controle (○).

[035] FIGURA 11 é uma representação gráfica de dados que demonstram a supra-regulação de células T CD8⁺ CD25⁺, CD69⁺, e CD2⁺ positivas em camundongos vacinados com uma vacina de DNA da invenção em relação a um grupo de controle de camundongos.

Descrição Detalhada De Modalidades Proferidas

[036] Uma vacina de DNA eficaz para inibição de proliferação celular endotelial compreende uma construção de DNA que operacionalmente codifica uma proteína de receptor de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). O termo "construção de DNA" como aqui usado e nas reivindicações em apêndice significa uma estrutura sintética de DNA que pode ser transcrita em células-alvo. A construção pode compreender um ácido nucléico linear tal como um DNA purificado, ou preferivelmente, DNA incorporado em um vetor de plasmídeo. O DNA também pode ser incorporado em um vetor viral ou bacteriano, preferivelmente um vetor viral ou bacteriano atenuado que é não-patogênico. DNAs adequados são aqueles que codificam uma proteína de receptor de VEGF tais como VEGFR-2 (KDR; ID. DE SEQ. N°: 2), VEGFR-1 (Flt-1; ID. DE SEQ. N°: 4), e Flk-1 (ID. DE SEQ. N°: 6), por exemplo, seqüências de DNA ID. DE SEQ. N°: 1, ID. DE SEQ. N°: 3, e ID. DE SEQ. N°:5, respectivamente.

[037] Cinco subtipos de VEGF foram identificados, incluindo VEGF-1 (também conhecido como VEGF-A), VEGF-2 (também conhecido como VEGF-C), VEGF-B, VEGFD e VEGF-E. Veja, por exemplo, Patente U.S. No. 6.235.713 para Achen *et al.* e referências nela citadas. Receptores de VEGF são proteína-tirosina quinases específicas para células

endoteliais. Várias proteína-tirosina quinases receptoras que são específicas para células endoteliais foram identificadas, incluindo Flt-1 (receptor 1 de VEGF; VEGFR-1), KDR (VEGFR-2), Flk-1 (o homólogo murídeo de KDR), Flt-4 (VEGFR-3), Tie, Tie-2 e Tek, vários dos quais são receptores VEGF.

[038] As vacinas de DNA da presente invenção estimulam formação de CTLs que são ativas contra células endoteliais proliferantes, que superexpressam VEGFR-2. Devido ao fato de receptores de VEGF serem somente expressos substancialmente em células endoteliais proliferantes, uma CTL que se forma em resposta à vacina irá visar substancialmente somente tecidos onde estiver ocorrendo angiogênese ativa (por exemplo, vascularização). Células endoteliais não-proliferantes, tais como os revestimentos internos de vasos sanguíneos estabelecidos, são substancialmente desprovidas de antígenos de receptor de VEGF e portanto não são afetadas por uma CTL produzida pela vacina.

[039] Em uma modalidade preferida, a vacina de DNA compreende uma sequência de polinucleotídeo que operacionalmente codifica uma proteína de receptor de VEGF. Essa vacina pode promover ativação de células T puras, tanto diretamente quanto indiretamente, através da intervenção de células dendríticas.

[040] Como aqui usado, o termo "imunidade" se refere à proteção imunológica de longo prazo contra a forma virulenta do agente infeccioso ou antígeno de tumor. O termo "imunização" se refere à exposição profilática a um antígeno de um agente patogênico derivado de uma fonte não-

virulenta, o que resulta em imunidade para o patógeno no indivíduo tratado.

[041] Uma construção de DNA da presente invenção preferivelmente compreende sequência de nucleotídeo que codifica uma proteína de receptor de VEGF operacionalmente ligada a elementos reguladores necessários para expressão de gene.

[042] Construções de DNA preferivelmente incluem elementos reguladores necessários para expressão de nucleotídeos. Tais elementos incluem, por exemplo, um promotor, um códon de iniciação, um códon de parada, e um sinal de poliadenilação. Além disso, intensificadores são freqüentemente necessários para expressão de uma sequência que codifica uma proteína imunogênica-alvo. Como são conhecidos na técnica, esses elementos estão preferivelmente operacionalmente ligados à sequência que codifica a proteína desejada. São selecionados preferivelmente elementos reguladores que sejam operáveis nas espécies às quais eles devem ser administrados.

[043] Códon de iniciação e códon de parada são preferivelmente incluídos como parte de uma sequência de nucleotídeo que codifica a proteína de receptor de VEGF em uma vacina genética da presente invenção. Os códon de iniciação e terminação devem estar em estrutura com a sequência codificadora.

[044] Promotores e sinais de poliadenilação incluídos em uma vacina da presente invenção são selecionados preferivelmente para serem funcionais dentro das células do indivíduo a ser imunizado.

[045] Exemplos de promotores úteis nas vacinas da

presente invenção, especialmente na produção de uma vacina genética para humanos, incluem, mas não estão limitados a, promotores de Vírus de Símio 40 (SV40), promotor de Vírus de Tumor Mamário do Camundongo (MMTV), promotor de Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) tal como o promotor de Repetição de Terminal Longo de HIV (LTR), vírus de Moloney, Citomegalovírus (CMV) tal como o promotor imediato precoce de CMV, Vírus de Epstein Barr (EBV), Vírus do Sarcoma de Rous (RSV), bem como promotores de genes humanos tais como de actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana, e metalotioneína humana.

[046] Exemplos de sinais de poliadenilação úteis nas vacinas da presente invenção, especialmente na produção de uma vacina genética para humanos, incluem mas não estão limitados a sinais de poliadenilação de SV40 e sinais de poliadenilação de LTR.

[047] Em adição aos elementos reguladores necessários para expressão de DNA, outros elementos também podem ser incluídos na molécula de DNA. Tais elementos adicionais incluem intensificadores. O intensificador pode ser, por exemplo, actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana, e intensificadores virais tais como aqueles de CMV, RSV e EBV.

[048] Sequências reguladoras e códons são geralmente espécie-dependentes dessa forma, a fim de maximizar a produção de proteína, as sequências reguladoras e códons são selecionados preferivelmente para serem eficazes na espécie a ser imunizada. Aquele de conhecimento comum da técnica pode produzir construções de DNA que sejam funcionais em uma certa espécie de indivíduo.

[049] As construções de DNA das presentes vacinas podem ser DNA “desnudo” como definido em Restifo et al. *Gene Therapy* 7, 89-92 (2000), cuja revelação pertinente é incorporada por referência. Alternativamente, o DNA pode estar operacionalmente incorporado em um vetor. Vetores de liberação úteis incluem microcápsulas biodegradáveis, complexos imunoestimulantes (ISCOMs) ou lipossomos, e vetores vivos atenuados geneticamente projetados tais como vírus ou bactérias.

[050] Exemplos vetores bacterianos vivos atenuados adequados incluem *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Shigella*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bacille Calmette-Guerin* (BCG), *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter*, ou qualquer outro vetor bacteriano adequado, como é conhecido na técnica. Métodos de transformação de vetores bacterianos vivos com uma construção exógena de DNA são bem descritos na técnica. Veja, por exemplo, Joseph Sambrook e David W. Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001).

[051] Vetores virais preferidos incluem Bacteriófagos, Herpes vírus, Adenovírus, vírus da Pólio, vírus da Vacínia, e Avipox. Métodos de transformação de vetor viral com uma construção exógena de DNA também são bem descritos na técnica. Veja Sambrook e Russell, acima.

[052] Vetores de lipossomo são vesículas unilamelares ou multilamelares, que têm uma porção da membrana formada de material lipofílico e uma porção aquosa interior. A porção aquosa é usada na presente invenção para conter o material de polinucleotídeo a ser liberado à célula-alvo.

Prefere-se geralmente que os materiais que formam o lipossomo tenham um grupo catiônico, tal como um grupo de amônio quaternário, e um ou mais grupos lipofílicos, tais como grupos alquil saturados ou não-saturados tendo cerca de 6 a cerca de 30 átomos de carbono. Um grupo de materiais adequados é descrito na Publicação de Patente Européia No. 0187702, e adicionalmente discutido na Patente U.S. No. 6.228.844 para Wolff *et al.*, cujas revelações pertinentes são incorporadas por referência. Muitos outros compostos de lipídeo catiônicos formadores de lipossomo adequados são descritos na literatura. Veja, por exemplo, L. Stamatatos, *et al.*, *Biochemistry* 27: 3917-3925 (1988); e H. Eibl, *et al.*, *Biophysical Chemistry* 10: 261-271 (1979). Alternativamente, uma microesfera tal como uma microesfera de polilactida-glicolida biodegradável pode ser utilizada. Uma construção de ácido nucléico é encapsulada ou de outra forma agregada em complexo com o lipossomo ou microesfera para liberação do ácido nucléico para um tecido, como é conhecido na técnica.

[053] Os aspectos do método da presente invenção compreendem a etapa de administração de polinucleotídeos de DNA ao tecido de um mamífero, tal como um humano. Em algumas modalidades preferidas, os polinucleotídeos de DNA são administrados de forma oral, intramuscular, intranasal, intraperitonal, subcutânea, intradérmica, ou tópica.

[054] Em um aspecto do método da presente invenção, uma vacina de DNA pode ser utilizada para fornecer inibição de longo prazo de proliferação de célula endotelial em um paciente tratado com a vacina. Em uma modalidade preferida do método, uma vacina de DNA que compreende uma construção

de polinucleotídeo que codifica operacionalmente uma proteína de receptor de VEGF é administrada a um mamífero que necessita de inibição de proliferação de célula endotelial, em uma quantidade que seja suficiente para despertar uma resposta imune contra células endoteliais proliferantes.

[055] A presente invenção também fornece um método de inibição de angiogênese em um mamífero tratado com a vacina de DNA. Em uma modalidade do método como esta, uma vacina que compreende uma construção de DNA que codifica operacionalmente uma proteína de receptor de VEGF é administrada a um mamífero que sofre de uma doença relacionada a angiogênese, em uma quantidade suficiente para despertar uma resposta imune contra células endoteliais proliferantes.

[056] Em ainda outro aspecto do método da presente invenção, é inibido o crescimento de tumor por tratamento de um mamífero com uma vacina de DNA. Em uma modalidade do método como esta, uma quantidade que desperta uma resposta imune de uma vacina que compreende uma construção de DNA que codifica operacionalmente uma proteína de receptor de VEGF é administrada a um mamífero que tem um tumor em crescimento. O tratamento com a vacina resulta em interrupção do crescimento do tumor pela imunização do mamífero contra células endoteliais proliferantes. A destruição de células endoteliais proliferantes pelo sistema imune do mamífero evita, ou pelo menos minimiza a vascularização do tumor.

[057] Nas modalidades do método da presente invenção, as vacinas podem ser administradas de forma enteral, tal

como por administração oral, ou por injeção intramuscular. Preferivelmente, o mamífero tratado com a vacina da invenção é um humano. Um paciente que sofre de câncer, tal como carcinoma de pulmão ou cólon, ou tumores de próstata, retinopatia diabética, e semelhantes, pode ser beneficiar da imunização pelas vacinas da presente invenção.

[058] Vacinas da presente invenção são formuladas preferivelmente com veículos ou excipientes farmacologicamente aceitáveis tais como água, solução salina, dextrose, glicerol, e semelhantes, e combinações destes. As vacinas também podem conter substâncias auxiliares tais como agentes umidificadores, agentes emulsificantes, tampões, e semelhantes.

[059] As vacinas da presente invenção são administradas preferivelmente oralmente a um mamífero, tal como um humano, como uma solução ou suspensão em um veículo farmacologicamente aceitável, em uma concentração de DNA na faixa de cerca de 1 a cerca de 10 microgramas por mililitro. A dosagem apropriada irá depender do indivíduo a ser vacinado, e em parte do julgamento do profissional médico que administra ou solicita a administração da vacina.

[060] As vacinas da presente invenção podem ser empacotadas em recipientes adequadamente esterilizados tais como ampolas, garrafas, ou frascos, em forma tanto de multidoses quanto de dosagem unitária. Os recipientes são preferivelmente hermeticamente selados após serem preenchidos com uma preparação da vacina. Preferivelmente, as vacinas são empacotadas em um recipiente que tem um rótulo nele afixado, cujo rótulo identifica a vacina, e

contém uma informação em uma forma prescrita por uma agência do governo tal como a "United States Food e Drug Administration" que reflete aprovação da vacina sob leis apropriadas, informação de dosagem, e semelhantes. O rótulo preferivelmente contém informação sobre a vacina que é útil para um profissional da saúde que administra a vacina a um paciente. O pacote também contém preferivelmente materiais informativos impressos relacionados à administração da vacina, instruções, indicações, e quaisquer avisos exigidos necessários.

[061] Preferivelmente, as vacinas para a presente invenção compreendem construções de DNA que codificam uma ou mais proteínas de receptor de VEGF, tal como tirosina quinase que são específicas para células endoteliais, incluindo, por exemplo, Flt-1, KDR, Flk-1, e homólogos funcionais destas. Os homólogos funcionais preferivelmente compartilham pelo menos cerca de 80% de homologia com as proteínas de receptor de VEGF anteriormente mencionadas.

[062] As seqüências de aminoácidos de proteínas de receptor de VEGF foram reveladas na técnica, assim como também foram reveladas as seqüências de ácido nucléico que codificam essas proteínas. A seqüência de ácido nucléico que codifica KDR (FIG. 1, ID. DE SEQ. N°: 1), e sua seqüência de proteína correspondente (FIG. 2, ID. DE SEQ. N°: 2) foram publicadas por Yu et al., na base de dados EMBL do "European Bioinformatics Institute", "Wellcome Trust Genome Campus", Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK (número de acesso no EMBL é EMBL:AF063658), cuja revelação é aqui incorporada por referência. A seqüência de ácido nucléico que codifica Flt-1 (FIG. 3, ID. DE SEQ. N°: 3), e

sua sequência de proteína correspondente (FIG. 4, ID. DE SEQ. N°: 4) foram publicadas por Yu *et al.*, na base de dados *EMBL* do "European Bioinformatics Institute", "Wellcome Trust Genome Campus", Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK (número de acesso no EMBL é EMBL:AF063657), cuja revelação é aqui incorporada por referência. A sequência de ácido nucléico que codifica Flk-1, e sua sequência de proteína correspondente foram publicadas por Mathews *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88: 9026-9030, e as estruturas foram corrigidas por Quinn *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 90: 7533-7537, cujas revelações relevantes são aqui incorporadas por referência. A sequência de DNA corrigida de Flk-1 é fornecida na FIG 5 como ID. DE SEQ. N°: 5, e a sequência de proteína corrigida de Flk-1 é fornecida na FIG. 6 como ID. DE SEQ. N°:6.

[063] Devido à degeneração inerente do código genético, outras sequências de DNA que codificam substancialmente a mesma sequência de aminoácido ou uma sequência de aminoácido funcionalmente equivalente para proteínas de receptor de VEGF tais como KDR, Flk-1 e Flt-1, podem ser usadas na prática da invenção. Tais sequências de DNA incluem aquelas que são também capazes de hibridizar para as sequências de receptor de VEGF. Preferivelmente os homólogos funcionalmente equivalentes do DNA da proteína de receptor de VEGF compartilham pelo menos cerca de 80% de homologia com o DNA que codifica as proteínas de receptor de VEGF anteriormente mencionadas.

[064] Sequências de DNA alteradas que podem ser usadas de acordo com a invenção incluem deleções, adições ou substituições de diferentes resíduos de nucleotídeo que

resultam em uma seqüência que codifica o mesmo produto de gene ou um produto de gene funcionalmente equivalente. O próprio produto de gene pode conter deleções, adições ou substituições de resíduos de aminoácido dentro das seqüências de receptor de VEGF, que resultam em uma mudança silenciosa, produzindo dessa forma proteínas de receptor de VEGF funcionalmente equivalentes. Tais substituições de aminoácido podem ser feitas com base na similaridade em polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, e/ou na natureza anfipática dos resíduos envolvidos. Por exemplo, aminoácidos negativamente carregados incluem ácido aspártico e ácido glutâmico; aminoácidos positivamente carregados incluem lisina e arginina; aminoácidos com grupos principais polares não-carregados que têm valores de hidrofiliabilidade similares incluem os seguintes: leucina, isoleucina, valina; glicina, alanina; asparagina, glutamina; serina, treonina; fenilalanina, tirosina. Como aqui usado, um receptor de VEGF funcionalmente equivalente se refere a um receptor que se liga a VEGF ou fragmentos desta, mas não necessariamente com a mesma afinidade de ligação de sua contraparte KDR, Flk-1 ou Flt-1 nativas.

[065] As seqüências de DNA da invenção podem ser projetadas a fim de alterar a seqüência codificadora de receptor de VEGF por várias finalidades incluindo, mas não limitadas a, alterações que modificam o processamento e expressão do produto de gene. Por exemplo, podem ser introduzidas mutações usando técnicas que são bem conhecidas na técnica, por exemplo mutagênese sítio-dirigida, para inserir novos sítios de restrição, para

alterar padrões de glicosilação, fosforilação, etc.

[066] Flk-1 de camundongo (ID. DE SEQ. N°: 6) compartilha uma homologia de aproximadamente 85% com KDR humana (ID. DE SEQ. N°: 2) e desempenha um papel homólogo na fisiologia do camundongo ao papel de KDR em humanos. Na verdade, VEGFR-2 é freqüentemente referida como KDR/Flk-1, refletindo a íntima analogia entre esses dois homólogos de receptor de VEGF. Por essa razão, o tratamento de camundongos com uma vacina de DNA da invenção, que codifica Flk-1 (por exemplo, DNA ID. DE SEQ. N°: 5) foi escolhido como um modelo adequado para vacinas humanas de DNA que codifica KDR.

[067] Os seguintes exemplos são fornecidos para ilustrar adicionalmente as características e modalidades da presente invenção, e não visam ser limitantes.

Materiais, Métodos e Exemplos.

Materiais.

[068] Camundongos C57/BL/6J e Balb/C foram obtidos das instalações de criação do "Scripps Research Institute". As linhas murídeas de célula tumoral usadas para avaliação incluem a linha de célula de melanoma B16 e a linha de célula de carcinoma de cólon CT26, todas as quais tendo sido obtidas do Dr. I. J. Fidler, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX. A linha de célula de câncer de pulmão de Lewis D121 murídea foi obtida da Dr. Lea Eisenbach, Weizmann Institute, Rehovot, Israel. O DNA que codifica Flk-1 foi gentilmente fornecido por Dr. Lemischka (Princeton University, Princeton, NJ), e foi clonado no vetor de expressão eucariótico pcDNA3.1 fornecido por Invitrogen, Huntsville, Alabama, usando os sítios de

restrição KpnI e XbaI. Uma cepa atenuada de *Salmonella typhimurium* foi fornecida por B.A.D. Stocker (Stanford University, Stanford, CA). Anticorpos foram obtidos de BD Biosciences, Bedford, MA. Suplemento de cultura T-STIM foi obtido de BD Biosciences, Bedford, MA. Isotiocianato de fluoresceína (FITC) e R-Ficoeritrina (PE) foram obtidos de Molecular Probes, Eugene, OR. Anticorpos rotulados com FITC e rotulados com PE foram preparados de acordo com os protocolos recomendados do fabricante.

EXEMPLO 1. Preparação de uma Vacina de DNA Que Codifica Flk-1.

[069] O vetor pcDNA3.1 contendo DNA de Flk-1 (ID. DE SEQ. N°: 5; cerca de 10 pg a cerca de 0,1 µg de pDNA) foi eletroporado em *Salmonella typhimurium* atenuada recentemente preparada, utilizando um "Bio-Rad Pulser" em 2,5 kV, 25 µF, e 200 Ohm de acordo com os procedimentos recomendados do fabricante. *Salmonella* contendo o vetor foram selecionadas em placas contendo ampicilina. As colônias foram escolhidas no dia seguinte e cultivadas de um dia para o outro em caldo LB (EM Science, Gibbstown, NJ) com ampicilina adicionada. As bactérias foram isoladas e lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS). As bactérias lavadas foram então suspensas em meio PBS em uma concentração de cerca de 1×10^9 *Salmonella* recombinantes por mililitro de PBS, para formar uma solução de vacina para uso posterior. A vacina foi estocada em ampolas seladas até serem usadas. Uma "vacina de controle" consistindo em *Salmonella* transformada com o vetor pcDNA3.1 isoladamente (sem DNA de Flk-1) também foi preparada de acordo com o mesmo procedimento. O DNA de plasmídeo foi

estocado em cerca de -80°C antes da transformação da *Salmonella*.

EXEMPLO 2. Vacinação de Camundongos com uma Vacina de DNA Que Codifica Flk-1.

[070] Camundongos Balb/C (cerca de 6 camundongos por grupo de tratamento) foram vacinados com a vacina de DNA do Exemplo 1 (cerca de 1×10^8 *Salmonella* recombinantes em cerca de 100 μL de PBS) por engorda oral, três vezes em intervalos de duas semanas. Outro grupo de camundongos foi vacinado com vacina de controle (consistindo em *Salmonella* atenuada contendo o vetor vazio) de acordo com a mesma programação que os camundongos vacinados com a vacina da invenção.

EXEMPLO 3. Avaliação de Resistência de Tumor de Camundongos Vacinados.

[071] Cerca de duas semanas após a terceira vacinação, camundongos Balb/C do Exemplo 2 (cerca de 6 camundongos por grupo de tratamento) foram atacados com cerca de 1×10^5 células de melanoma B16 (de forma subcutânea), cerca de 1×10^5 células de carcinoma de pulmão de Lewis D121 (de forma subcutânea), ou cerca de $7,5 \times 10^4$ células de carcinoma de cólon CT26 (de forma intravenosa). Os tumores de pulmão de Lewis subcutâneos foram removidos cirurgicamente após cerca de duas semanas de crescimento para permitir disseminação espontânea para o pulmão. Crescimento subcutâneo de tumor foi medido em duas dimensões a cada dois dias, e o volume do tumor foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\text{volume} = (\text{largura}^2) (\text{comprimento} \div 2)$$

para cada tumor. A quantidade de metástase espontânea de D121 para os pulmões foi avaliada cerca de 30 dias após

remoção do tumor subcutâneo primário. Os camundongos foram sacrificados e necropsiados, e as cargas de tumor dos pulmões foram avaliadas de acordo com a percentagem da superfície do pulmão que estava coberta por tumor e pontuadas como "0" para sem tumor, "1" para menos do que cerca de 20% de cobertura do tumor, "2" para cerca de 20 a cerca de 30% de cobertura do tumor, e "3" para mais do que cerca de 50% de cobertura do tumor. FIG. 7 mostra figuras de pulmões de três camundongos atacados com células de carcinoma de pulmão de Lewis D121. O pulmão inferior foi pontuado como 1, enquanto que os dois pulmões superiores foram pontuados 3, tendo uma grande proporção da superfície do pulmão coberta por tumores. Aos animais que morreram antes da avaliação de 30 dias foi dada uma pontuação "+".

[072] Os resultados dessas avaliações são fornecidos nas Tabelas 1-4, e nas FIGS. 8-10, discutidas em detalhes abaixo.

Tabela 1. Metástase de Tumor em Camundongos Balb/C
Atacados com Células de Carcinoma de Lewis D121.

Grupo de Vacinação de Camundongo	Pontuações Metastastáticas
Controle - vacinação com	
<i>Salmonella</i> não-transformada	3, 3, 3, 3, +, +
Controle - vacinação com vacina	
de controle (contendo vetor vazio)	3, 3, 3, 3, +, +
Vacinação com Vacina de DNA do	
Exemplo 1 (contendo Flk-1)	0, 0, 1, 1, 1, 2, 2

[073] Os camundongos Balb/C que foram atacados por injeção intravenosa de células de carcinoma de cólon CT-26

foram avaliados quanto à mortalidade ao longo de um período de cerca de 63 dias (7 semanas). A informação de mortalidade está apresentada na Tabela 2 abaixo, e ilustrada graficamente na FIG. 8.

[074] Na FIG. 8, o % de sobrevivência de camundongos tratados com a vacina da invenção do Exemplo 1 é indicado pela linha sólida, espessa, em 100% de sobrevivência. O % de sobrevivência de camundongos sem vacinação atacados com a célula C26 está indicado pela linha fina, sólida, enquanto que o % de sobrevivência dos camundongos tratados com a vacina de controle (sem DNA de Flk-1) está indicado pela linha pontilhada.

Tabela 2. Supressão de Mortalidade em Camundongos Balb/C
Imunizados Com a Vacina do Exemplo 1 e Atacados com
Carcinoma CT 26.

	% Sobreviv.	% Sobreviv.	% Sobreviv.
Tratamento	no Dia 30	no Dia 36	no Dia 63
Controle,			
Sem Vacina	50	0	0
Vacina de Controle	33	0	0
Vacina do Ex. 1	100	100	100

[075] A supressão de crescimento do tumor primário (subcutâneo) em camundongos Balb/C atacados com D121 foi avaliada por determinação de volume do tumor primário no dia 14 após ataque. Resultados são apresentados na Tabela 3 abaixo, e ilustrados graficamente na FIG. 9.

[076] Na FIG. 9, a primeira barra, rotulada "PBS" indica camundongos que não foram vacinados, a barra do meio, rotulada "vetor vazio" indica camundongos tratados com a vacina de controle, e a terceira barra, rotulada

“pcDNA3.1-FLK1” indica camundongos imunizados com a vacina da invenção do Exemplo 1.

Tabela 3. Supressão de Tumor Subcutâneo de Carcinoma D121 em Camundongos Balb/C Imunizados Com a Vacina do Exemplo 1.

Tratamento	Volume do Tumor	Desvio
	mm ³	Padrão
Controle Sem Vacina	665	227
Vacina de Controle	641	157
Vacina do Ex. 1	183	35

[077] A supressão de crescimento de tumor subcutâneo de melanoma B16 foi avaliada por monitoramento do volume do tumor subcutâneo ao longo de um período de cerca de 17 dias após ataque do tumor. Resultados são apresentados na Tabela 4 e ilustrados graficamente na FIG. 10 abaixo. In FIG. 10, dados do volume médio do tumor indicados por (●) representam camundongos imunizados com a vacina da invenção do Exemplo 1, enquanto que os dados indicados por (○) indicam camundongos tratados com a vacina de controle.

Tabela 4. Supressão de Tumor Subcutâneo de Melanoma B16 em Camundongos Balb/C Imunizados Com a Vacina do Exemplo 1.

Tratamento	Volume do Tumor (mm ³) no Dia			
	0	9	14	17
Vacina de Controle	0	907	1273	4213
Vacina do Ex. 1	0	447	462	1063
% de Supressão de Tumor	---	51%	64%	75%

EXEMPLO 4. Supra-regulação de CD25, CD69 e CD2 Marcadores de Ativação em Esplenócitos (Células T CD8+) de Camundongos Vacinados.

[078] Camundongos C5/7BL/6J (cerca de 4 camundongos por grupo de tratamento) foram vacinados com a vacina de DNA do Exemplo 1 e com a vacina de controle (nenhuma Flk-1) como descrito no Exemplo 2. Os esplenócitos foram isolados do grupo de camundongos imunizados e do grupo de camundongos de controle cerca de seis semanas após a terceira vacinação. As células de esplenócito foram cultivadas por 24 horas juntamente com células de uma linha de célula de melanoma B16 transduzida para expressar Flk-1 e com células B16 não-transformadas em meio de célula T (cerca de 5 mL por cultura) contendo cerca de 4% por volume de suplemento de cultura TSTIM (Cat. # 354115, BD Biosciences, Bedford, MA). As células foram então coradas com anticorpo CD8+ conjugado a FITC e anticorpos conjugados a PE de CD25, CD69, e CD2. As suspensões de células foram avaliadas usando um rastreador Becton Dickinson FAC para determinar a percentagem de células T CD8 + positivas para CD25 e CD69 para cada combinação esplenócito/ célula de melanoma B16. Os resultados são apresentados na Tabela 5 e são ilustrados graficamente na FIG. 11.

Tabela 5. Supra-regulação de Marcadores de Ativação CD25, CD69 e CD2 em Esplenócitos De Camundongos Vacinados

	% de CD25	% de CD69	% de CD2
Tratamento	positivas	positivas	fluores- cência
			Média

Células B16-Flk-1

Vacina de Controle + Células B16	9	18	570 mfu
vacina de DNA + Células B16-Flk-1	12	29	550 mfu
vacina de DNA +	21	35	700 mfu

mfu = unidades de fluorescência média.

[079] Os resultados fornecidos nas Tabelas 1-5 e FIGS. 8-11 demonstram que a vacina de DNA do Exemplo 1, que compreende um DNA que codifica Flk-1, o análogo murídeo de KDR, pode imunizar eficazmente camundongos contra várias células de câncer formadoras de tumor. Embora sem se ligar a uma teoria, acredita-se que a vacina atue por inibição de angiogênese no tumor, ou seja, evitando a formação de novos vasos sanguíneos e efetivamente matando o tumor por falta de nutrição.

[080] Os dados na Tabela 1 demonstram que a vacina da invenção do Exemplo 1 leva à supressão de metástase de tumor para os pulmões de camundongos atacados com carcinoma de pulmão de Lewis D121. Nenhum dos camundongos imunizados com a vacina do Exemplo 1 morreu, e todos tiveram menos do que cerca de 50% de cobertura do tumor nos pulmões (2 tiveram <20%). Em contraste, dois camundongos morreram de cada grupo de controle e todos os camundongos restantes tiveram mais do que cerca de 50% de cobertura do tumor nos pulmões.

[081] A vacina da invenção do Exemplo 1 também diminuiu significativamente a mortalidade de camundongos Balb-C que foram atacados de forma intravenosa por células de carcinoma de cólon CT-26, como demonstrado pelos dados na Tabela 2 e FIG. 8. Todos os camundongos imunizados com a

vacina do Exemplo 1 sobreviveram todo o período de observação de 63 dias após ataque. Nos grupos de controle, no entanto, todos os camundongos morreram por volta do dia 36 pós-ataque.

[082] Como demonstrado pelos dados na Tabela 3 e FIG. 9, crescimento tumoral subcutâneo de carcinoma de pulmão de Lewis D121 foi suprimido por imunização com a vacina da invenção do Exemplo 1 por um fator de cerca de 4,3 a cerca de 4,5, em relação aos grupos de controle de camundongo tratados sem qualquer vacina ou a vacina de controle.

[083] Similarmente, como mostrado na Tabela 4 e FIG. 10, crescimento de tumor subcutâneo de melanoma B16 foi suprimido por um fator de cerca de 4 em camundongos imunizados com a vacina da invenção do Exemplo 1, em relação ao crescimento de tumor no grupo de controle.

[084] Os dados na Tabela 5 e FIG. 11 mostram que esplenócitos isolados de camundongos C57/BL/6J vacinados com a vacina de DNA do Exemplo 1 exibiram uma supra-regulação de marcadores de ativação CD2, CD25 e CD69 em relação ao grupo de controle de camundongos, quando cultivados com células de melanoma B16 transformadas para apresentar antígeno Flk-1.

[085] Numerosas variações e modificações das modalidades acima descritas podem ser efetuadas sem se afastar do espírito e escopo das características inéditas da invenção. Deve-se entender que nenhuma limitação com relação às modalidades específicas aqui ilustradas é desejada ou deve ser deduzida. Visa-se, evidentemente, englobar pelas reivindicações em apêndice todas essas modificações como incluídas dentro do escopo das

reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Vacina de DNA eficaz para despertar uma resposta imune contra células endoteliais proliferantes caracterizada pelo fato de que consiste em uma construção de DNA que codifica operacionalmente uma proteína de receptor de VEGF em um veículo farmacêuticamente aceitável,

em que a construção de DNA é selecionada a partir do grupo consistindo em uma sequência de polinucleotídeo possuindo a sequência da SEQ ID NO°: 1 e operacionalmente codificando a proteína de receptor VEGF VEGFR-2 possuindo a sequência da SEQ ID NO°: 2; a sequência de polinucleotídeo possuindo a sequência da SEQ ID NO°: 5 e operacionalmente codificando a proteína de receptor VEGF Flk-1 possuindo a sequência da SEQ ID NO°: 6;

em que o veículo farmacêuticamente aceitável é selecionado a partir de água, solução salina, dextrose, glicerol ou combinações destes;

e a construção de DNA é operacionalmente incorporada em um vetor de *Salmonella typhimurium* ou *Salmonella typhi* atenuado.

2. Uso de uma construção de DNA que codifica operacionalmente uma proteína de receptor de VEGF e um veículo farmacêuticamente aceitável desta, caracterizado pelo fato de ser para preparar uma vacina de DNA para inibição do crescimento de tumor em um mamífero,

em que a construção de DNA é selecionada a partir do grupo consistindo em uma sequência de polinucleotídeo possuindo a sequência da SEQ ID NO°: 1 e operacionalmente codificando a proteína de receptor VEGF VEGFR-2 possuindo a sequência da SEQ ID NO°: 2; a sequência de polinucleotídeo

possuindo a sequência da SEQ ID NO°: 5 e operacionalmente codificando a proteína de receptor VEGF Flk-1 possuindo a sequência da SEQ ID NO°: 6;

em que o veículo farmacêuticamente aceitável é selecionado a partir de água, solução salina, dextrose, glicerol ou combinações destes;

e a construção de DNA é operacionalmente incorporada em um vetor de *Salmonella typhimurium* ou *Salmonella typhi* atenuado.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o mamífero é um humano.

4. Artigo de manufatura caracterizado pelo fato de que compreende a vacina, como definida na reivindicação 1, empacotada em um recipiente estéril, hermeticamente selado, o recipiente tendo um rótulo a ele afixado, o rótulo abrigando material impresso que identifica a vacina e que fornece informação útil a um indivíduo sobre administrar a referida vacina a um paciente.

FIGURA 1**KDR HUMANA, DNA, CÓDONS 1 - 4071**

SEQ. ID NO.: 1.

atggagagca aggtgctgct ggcgcgtcgcc ctgtggctct gcgtggagac ccgggcccgc	60
tctgtgggtt tgcctagtgt ttctcttgat ctgccaggc tcagcataca aaaagacata	120
cttacaatta aggctaatac aactcttcaa attacttgca ggggacagag ggacttgagc	180
tggctttggc ccaataatca gagtggcagt gagcaaagg tggaggtgac tgaagtgcagc	240
gatggcctct tctgtaagac actcacaatt ccaaaagtga tcggaaatga cactggagcc	300
tacaagtgtc tctaccggga aactgacttg gcctcggta tttatgtcta tgttcaagat	360
tacagatctc catattattgc ttctgttagt gaccaacatg gagtcgtgta cattactgag	420
aacaaaaaca aaactgtggt gattccatgt ctcggttcca tttcaaatct caactgtgca	480
ctttgtgcaa gataccaga aaagagattt gttcctgatg gtaacagaat ttcctgggac	540
agcaagaagg gctttactat tcccagctac atgatcagct atgctggcat ggtcttctgt	600
gaagcaaaaa ttaattgatga aagttaccag tctattatgt acatagttgt cgttgtaggg	660
tataggattt atgatgtggt tctgagtcgg tctcatggaa ttgaactatc tgttgagaa	720
aagcttgtct taaattgtac agcaagaact gaactaaatg tggggattga cttcaactgg	780
gaataccctt cttegaagca tcagcataag aaacttgtaa accgagacct aaaaaccag	840
tctgggagtg agatgaagaa atttttgagc accttaacta tagatgggtg aaccggagt	900
gaccaaggat tgtacacctg tgcagcatcc agtgggctga tgaccaagaa gaacagcaca	960
tttgtcaggg tccatgaaaa accttttgtt gcttttgaa gtggcatgga atctctggtg	1020
gaagccacgg tgggggagcg tgtcagaatc cctgcgaagt accttggtta cccacccca	1080
gaataaaaat ggtataaaaa tggaaatccc cttgagtcga atcacacaat taaagcgggg	1140
catgtactga cgattatgga agtgagtga agagacacag gaaattacac tgtcatcctt	1200
accaatccca tttcaaagga gaagcagagc catgtggtct ctctggttgt gtatgtccca	1260
ccccagattg gtgagaaatc tctaactctt cctgtggatt cctaccagta cggcaccact	1320
caaacgctga catgtacggt ctatgccatt cctccccgc atcacatcca ctggtattgg	1380
cagttggagg aagagtgcgc caacgagccc agccaagctg tctcagtgac aaaccatac	1440
ccttgatgaag aatggagaag tgtggaggac ttccagggag gaaataaaaat tgaagttaat	1500
aaaaatcaat ttgctctaata tgaaggaaaa aacaaaactg taagtaccct tgttatccaa	1560
gcggcaaagt tgtcagcttt gtacaaatgt gaagcggta acaaagtcgg gagaggagag	1620
agggtgatct ccttccacgt gaccaggggt cctgaaatta ctttgcaacc tgacatgcag	1680
cccactgagc aggagagcgt gtctttgtgg tgcactgcag acagatctac gtttgagaac	1740
ctcacatggt acaagcttgg cccacagcct ctgccaatcc atgtgggaga gttgccaca	1800
cctgtttgca agaacttga tactctttgg aaattgaatg ccaccatgtt ctctaatagc	1860
acaaatgaca ttttgatcat ggagcttaag aatgcacct tgcaggacca aggagactat	1920
gtctgccttg ctcaagacag gaagaccaag aaaagacatt gcgtggtcag gcagctcaca	1980
gtcctagagc gtgtggcacc cacgatcaca ggaaacctgg agaatacagac gacaagtatt	2040
ggggaaagca tcgaagtctc atgcacggca tctgggaatc cccctccaca gatcatgtgg	2100
tttaaagata atgagaccct tgtagaagac tcaggcattg tattgaagga tgggaaccgg	2160

FIGURA 1 - CONTINUAÇÃO

aacctcacta tccgcagagt gaggaaggag gacgaaggcc tctacacctg ccaggcatgc	2220
agtgttcttg gctgtgcaaa agtggaggca tttttcataa tagaagggtgc ccaggaaaag	2280
acgaacttgg aatcattat tctagtaggc acggcgggtga ttgccatgtt cttctggcta	2340
cttcttgtea tcatcctacg gaccgttaag cgggccaatg gaggggaact gaagacaggc	2400
tacttgcca tegtcatgga tccagatgaa ctccattgg atgaacattg tgaacgactg	2460
ccttatgatg ccagcaaatg ggaattcccc agagaccggc tgaagctagg taagcctctt	2520
ggccgtggtg cctttggcca agtgattgaa gcagatgcct ttggaattga caagacagca	2580
acttgcagga cagtagcagt caaatgttg aaagaaggag caacacacag tgagcatcga	2640
gctctcatgt ctgaactcaa gatcctcatt catattggtc accatctcaa tgtggtcaac	2700
cttctagggt cctgtaccaa gccaggaggg cactcatgg tgattgtgga attctgcaaa	2760
tttgaaaacc tgtccactta cctgaggagc aagagaaatg aatttgtccc ctacaagacc	2820
aaagggggcac gattccgtca agggaaaagac tacgttggag caatccctgt ggatctgaaa	2880
cggcgcttgg acagcatcac cagtagccag agctcagcca gctctggatt tgtggaggag	2940
aagtccctca gtgatgtaga agaaggagaa gtcctgaag atctgtataa ggacttctg	3000
accttggagc atctcatctg ttacagcttc caagtggcta agggcatgga gttcttgga	3060
tcgcgaaagt gtatccacag ggacctggcg gcacgaaata tcctcttacc ggagaagaac	3120
gtgggtaaaa tctgtgactt tggcttggcc cgggatattt ataaaagatcc agattatgtc	3180
agaaaaggag atgctcgctt ccctttgaaa tggatggccc cagaaacaat ttttgacaga	3240
gtgtacacaa tccagagtga cgtctggtct tttggtgtt tgcgtgtgga aatattttcc	3300
ttagggtgctt ctccatatcc tggggtaaaag attgatgaag aattttgtag gcgattgaaa	3360
gaaggaaacta gaatgagggc ccctgattat actacaccag aaatgtacca gaccatgctg	3420
gactgctggc acggggagcc cagtcagaga cccacgtttt cagagttggt ggaacatttg	3480
ggaaatctct tgcaagctaa tgctcagcag gatggcaaag actacattgt tcttccgata	3540
tcagagactt tgagcatgga agaggattct ggactctctc tgctacctc acctgtttcc	3600
tgtatggagg aggaggaagt atgtgacccc aaattccatt atgacaacac agcaggaatc	3660
agtcagtatc tgcagaacag taagcgaaag agccggcctg tgagtgtaaa aacatttgaa	3720
gatatccctt tagaagaacc agaagtaaaa gtaatcccag atgacaacca gacggacagt	3780
ggtatggttc ttgcctcaga agagctgaaa actttggaag acagaaccaa attatctcca	3840
tcttttggtg gaatggtgcc cagcaaaaagc agggagtctg tggcatctga aggctcaaac	3900
cagacaagcg gctaccagtc cggatatcac tccgatgaca cagacaccac cgtgtactcc	3960
agtgaggaag cagaactttt aaagctgata gagattggag tgcaaaccgg tagcacagcc	4020
cagattctcc agcctgactc ggggaccaca ctgagctctc ctctgttta a	4071

FIGURA 2

KDR HUMANA, PROTEÍNA

SEQ. ID NO.: 2

MQSKVLLAVALWLCVETRAASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKA
NTTLQITCRGQRDLWLWPNNQSGSEQRVEVTECSDGLFCKTLTIKVIIGNDTGAYKCF
YRETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCA
RYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYR
IYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQS
GSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLV
EATVGERVRIPAKYLGYPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSEKDTGNYTVI
LTNPISKEKQSHVSVLVVYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGTQTTLCTVYAIPPPHHIHV
YWQLEEECANEPSQAVSVTNPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEVNKNQFALIEGKNKTVSTL
VIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTRGPEITLQPDMPTEQESVSLWCTADRS
TFENLTWYKLGPPPLPIHVGEPLTPVCKNLDTLWKLNATMFSNSTNDILIMELKNASLQ
DQGDYVCLAQDRKTKKRHCVRQLTVLERVAPTITGNLENQTTSIGESIEVSCTASGNP
PPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNLTIRRVKEDGLYTCQACSVLGCAKVEAFFI
IEGAQEKTNLEIIILVGTAVIAMFFWLLLVIIILRTVKRANGGELKTGYLSIVMDPDELP
LDEHCERLPYDASKWEFPRDLKLGKPLGRGAFGQVIEADAFGIDKTATCRTVAVKMLK
EGATHSEHRALMSELKILIHIGHHLNVNLLGACTKPGGPLMVIVEFCKFGNLSTYLRS
KRNEFVPYKTKGARFRQKDYVGAIPVDLKRRLDSITSSQSSASSGFVEEKSLSDVEEE
EAPEDLYKDFLTLEHLICYSFQVAKGMEFLASRKCIHRDLAARNILLSEKNVVKICDFG
LARDIYKDPDYVRKGDARLPLKWMAPETIFDRVYTIQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYP
GVKIDEEFCRRLKEGTRMRAPDYTPEMYQTMDCWHGEPSQRPTFSELVEHLGNLLQA
NAQQDGKDYIVLPISETLSMEEDSGLSLPTSPVSCMEEEEVCDPKFHYDNTAGISQYLQ
NSKRKSRPVSVKTFEDIPLPEPEVKVIPDDNQTDSGMVLASEELKTLEDRTKLSPSFGG
MVPSKSRRESVAEGSNQTSQYQSGYHSDDTDTTVYSSEEAECLKLIEIGVQTGSTAAIL
QPDSGTTLSPPV

FIGURA 3**Flt-1 HUMANA, DNA, CÓDONS 1 - 4017**

SEQ. ID NO.: 3

atggtcagct actgggacac cggggctcctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgtttctc	60
acaggatcta gttcagggttc aaaattaaaa gacccgaac tgagttttaa aggcacccag	120
cacatcatgc aagcaggcca gacactgcat ctccaatgca ggggggaagc agcccataaa	180
tggtctttgc ctgaaatggt gagtaaggaa agcgaaaggc tgagcataac taaatctgcc	240
tgtggaagaa atggcaaaca attctgcagt actttaacct tgaacacagc tcaagcaaac	300
cacactggct tctacagctg caaatatcta gctgtacctt cttcaaagaa gaaggaaaca	360
gaatctgcaa tctatatatt tattagtgat acaggtagac ctttcgtaga gatgtacagt	420
gaaatccccg aaattatata catgactgaa ggaagggagc tcgtcattcc ctgccgggtt	480
acgtcaccta acatcactgt tactttaaaa aagtttcac ttgaccttt gatccctgat	540
ggaaaacgca taatctggga cagtagaaag ggcttcatca tatcaaagc aacgtacaaa	600
gaaatagggc ttctgacctg tgaagcaaca gtcaatgggc atttgataa gacaaactat	660
ctcacacatc gacaaaccaa tacaatcata gatgtccaaa taagcacacc acgcccagtc	720
aaattactta gaggccatac tcttgctctc aattgtactg ctaccactcc cttgaacacg	780
agagttcaaa tgacctggag ttacctgat gaaaaaata agagagcttc cgtaaggcga	840
cgaattgacc aaagcaattc ccatgccaac atattctaca gtgttcttac tattgacaaa	900
atgcagaaca aagacaaagg actttatact tgcgtgtaa ggagtggacc atcattcaaa	960
tctgttaaca cctcagtga tatatatgat aaagcattca tcaactgtga acatcgaaaa	1020
cagcagggtc ttgaaaccgt agctggcaag cggctctacc ggctctctat gaaagtgaag	1080
gcatttcctt cgccggaagt tgtatggtta aaagatgggt tacctgcgac tgagaaatct	1140
gctcgtatt tgactcgtg ctactcgtta attatcaagg acgtaactga agaggatgca	1200
gggaattata caatcttgct gagcataaaa cagtcaaag tggttaaaaa cctcactgcc	1260
actctaattg tcaatgtgaa accccagatt tacgaaaagg ccgtgtcacc gtttcagac	1320
ccggtctctt acccactggg cagcagacaa atcctgacct gtaccgcata tggatccct	1380
caacctacaa tcaagtgggt ctggcaccct tgtaaccata atcattccga agcaagggt	1440
gacttttggt ccaataatga agagtccttt atcctggatg ctgacagcaa catgggaaac	1500
agaattgaga gcatcactca gcgcatggca ataatagaag gaaagaataa gatggctagc	1560
accttggttg tggctgactc tagaatttct ggaatctaca tttgcatagc ttccaataaa	1620
gttgggactg tgggaagaaa cataagcttt tatatcacag atgtgccaaa tgggtttcat	1680
gttaacttgg aaaaaatgcc gacggaagga gaggacctga aactgtcttg cacagttaac	1740
aagttcttat acagagacgt tacttggtt ttactgcgga cagttaataa cagaacaatg	1800
cactacagta ttagcaagca aaaaatggcc atcactaagg agcactccat cactcttaat	1860
cttaccatca tgaatgtttc cctgcaagat tcaggcacct atgcctgcag agccaggaat	1920
gtatacacag gggaaagaaat cctccagaag aaagaaatta caatcagaga tcaggaagca	1980
ccatacctcc tgcgaaacct cagtgtcac acagtggcca tcagcagttc caccacttta	2040
gactgtcatg ctaatggtgt ccccgagcct cagatcactt ggtttaaaaa caaccacaaa	2100
atacaacaag agcctggaat tatttttagga ccaggaagca gcacgctgtt tattgaaaga	2160

FIGURA 3 - CONTINUAÇÃO

gtcacagaag aggatgaagg tgtctatcac tgcaaagcca ccaaccagaa gggctctgtg	2220
gaaagttcag catacctcac tgttcaagga acctcggaca agtctaattc ggagctgac	2280
actetaacat gcacctgtgt ggctgcgact ctcttctggc tectattaac cctctttatc	2340
cgaaaaatga aaaggtcttc ttctgaaata aagactgact acctatcaat tataatggac	2400
ccagatgaag ttccttttga tgagcagtgt gagcggtcc cttatgatgc cagcaagtgg	2460
gagtttgccc gggagagact taaactgggc aaatcacttg gaagaggggc ttttgaaaa	2520
gtggttcaag catcagcatt tggcattaag aaatcaccta cgtgccggac tgtggctgtg	2580
aaaatgctga aagagggggc cacggccagc gagtacaaag ctctgatgac tgagctaaaa	2640
atcttgacct acattggcca ccatctgaac gtggttaacc tgctgggagc ctgcaccaag	2700
caaggagggc ctctgatggt gattgttgaa tactgcaaat atggaaatct ctccaactac	2760
ctcaagagca aacgtgactt atttttctc aacaaggatg cagcactaca catggagcct	2820
aagaaagaaa aaatggagcc aggcctggaa caaggcaaga aaccaagact agatagcgtc	2880
accagcagcg aaagctttgc gagctccggc ttccaggaag ataaaagtct gagtgatgtt	2940
gaggaagagg aggattctga cggtttctac aaggagccca tcaactatgga agatctgatt	3000
tcttacagtt ttcaagtggc cagaggcatg gagttcctgt cttccagaaa gtgcattcat	3060
cgggacctgg cagcgagaaa cattctttta tctgagaaca acgtggtgaa gatttgtgat	3120
tttggccttg cccgggatat ttataagaac cccgattatg tgagaaaagg agatactcga	3180
cttctctga aatggatggc tcctgaatct atctttgaca aaatctacag caccaagagc	3240
gacgtgtggt cttacggagt attgctgtgg gaaatcttct ccttaggtgg gtctccatac	3300
ccaggagtac aaatggatga ggacttttgc agtcgcctga gggaaggcat gaggatgaga	3360
gtccttgagt actctactcc tgaaatctat cagatcatgc tggactgctg gcacagagac	3420
ccaaaagaaa ggccaagatt tgcagaactt gtggaaaaac taggtgattt gcttcaagca	3480
aatgtacaac aggatggtaa agactacatc ccaatcaatg ccatactgac aggaaatagt	3540
gggtttacat actcaactcc tgccttctct gaggacttct tcaaggaaaag tatttcagct	3600
ccgaagttaa attcaggaag ctctgatgat gtcagatatg taaatgcttt caagtccatg	3660
agcctggaaa gaatcaaaac ctttgaagaa cttttaccga atgccacctc catgtttgat	3720
gactaccagg gcgacagcag cactctgttg gcctctccca tgctgaagcg cttcacctgg	3780
actgacagca aaccaaggc ctgcctcaag attgacttga gagtaaccag taaaagtaag	3840
gagtcggggc tgtctgatgt cagcaggccc agtttctgcc attccagctg tgggcacgtc	3900
agcgaaggca agcgcagggt cacctacgac cacgctgagc tggaaaggaa aatcgcgtgc	3960
tgctccccgc cccagacta caactcggtg gtctgtact ccaccccacc catctag	4017

FIGURA 4

Flt HUMANA, PROTEÍNA

SEQ. ID NO.: 4

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTQHIMQA
GQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGKQFCSTLTNTAQANHTGF
YCKYLAVPTSKKKETESAIIYFISDTGRPFVEMYSEIPEI IHMTEGRELVIPCRVTSP
NITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYT
HRQTNTIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRR
IDQSNSHANIFYSVLTIDKMQRKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRK
QQVLETVAGKRSYRLSMKVKA FPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRGYSLLIKDVTEED
AGNYTILLSIKQSNVFNLTATLIVNVKPKIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTCTAYG
IPQPTIKWFHPCNNHNSHSEARCD FCSNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMALIEGKNK
MASTLVVADSRISGIYICIASNKVGTVGRNISFYITDVPNGFHVNLKMPTEGEDLKLS
CTVNFVLYRQVTVILLRTVNNRMTMHSISKQKMAITKEHSITLNLTIMNVSLQDSGYA
CRARNVYTGEELQKKEITIRDQEA PYLLRNLS DHTVAISSSTTLDCHANGVPEPQITW
FKNNHKIQQEPGIILPGSSSTLFIERVTEEDEGVYHCKATNQKGSVESSAYLTVQGTSD
KSNLELITLTCTCVAATLFWLLLT LFIKMKRSSSEIKTDYLSIIMDPDEVPLDEQCER
LPYDASKWEFARERLKLKSLGRGAFGVVQASAFGIKKSPTCRTVAVKMLKEGATASE
YKALMTELKILTHIGHHLNVVNLLGACTKQGGPLMVIVEYCKYGNLSNYLKS KRDLFFL
NKDAALHMEPKKEKMEPGLEQGGKPRLD SVTSSES FASSGFQEDKSLSDVEEEEDSDGF
YKEPITMEDLISYSFQVARGMEFLSSRKCIHRDLAARNILLSENN VVKICDFGLARDIY
KNPDYVRKGDTRLPLKWMAPESIFDKIYSTKSDVWSYGVLLWEI FSLGGSPY PGVQMDE
DFCSRLREGMRMRAPEYSTPEIYQIMLDCWHRDPKERPRFAELVEKLGDLLQANVQDQD
KDYIPINAILTGNSGFTYSTPAFSEDFFKESISAPKFNSGSSDDVRYVNAFKFMSLERI
KTFEELLPNATSMFDDYQGDSS TLLASPM LKRFTWTD SKPKASLKIDLRVTSKSKESGL
SDVSRPSFCHSSCGHVSEGKRRFTYDHAELERKIACCSPPPDYNSVVLYSTPPI

FIGURA 5

Flk-1 DE CAMUNDONGO, CÓDONS 208 - 4344

SEQ. ID NO.: 5

```

ctgtgtcccg cagccggata acctggctga cccgattccg cggacaccgc tgcagccgcg 60
gctggagcca gggcgccggt gccccgcgct cccccggtc ttgcgctgcg ggggccatac 120
cgctctgtg acttctttgc gggccaggga cggagaagga gtctgtgcct gagaaactgg 180
gctctgtgcc caggcgcgag gtgcaggatg gagagcaagg cgctgctagc tgcgctctg 240
tggttctgcg tggagacccg agccgcctct gtgggtttga ctggcgattt tctccatccc 300
cccaagctca gcacacagaa agacatactg acaattttgg caaatataac ccttcagatt 360
acttgagggg gacagcgagg cctggactgg ctttgcccca atgctcagcg tgattctgag 420
gaaagggtat tggtgactga atgcggcggt ggtgacagta tcttctgcaa aacactcacc 480
attcccaggg tggttgga aa tgatactgga gcctacaagt gctcgtaccg ggacgtcgac 540
atagcctcca ctgtttatgt ctatgttcga gattacagat caccattcat cgctctgtc 600
agtgaccagc atggcatcgt gtacatcacc gagaacaaga acaaaactgt ggtgatcccc 660
tgccgagggt cgatttcaaa cctcaatgtg tctctttgcg ctaggtatcc agaaaagaga 720
tttgttcccg atggaacag aatttctctg gacagcgaga taggctttac tctccccagt 780
tacatgatca gctatgccg catggtcttc tgtgaggcaa agatcaatga tgaaacctat 840
cagtctatca tgtacatagt tgtggttga ggatatagga tttatgatgt gattctgagc 900
ccccgcgatg aaattgagct atctgccgga gaaaaactg tcttaaattg tacagcgaga 960
acagagctca atgtggggct tgatttcacc tggcactctc caccttcaaa gtctcatcat 1020
aagaagattg taaaccggga tgtgaaaccc tttctggga ctgtggcgaa gatgtttttg 1080
agcaccttga caatagaaag tgtgaccaag agtgaccaag ggaatacac ctgtgtagcg 1140
tccagtggac ggatgatcaa gagaaataga acatttgtcc gagttcacac aaagcctttt 1200
attgctttcg gtagtgggat gaaatctttg gtggaagcca cagtgggcag tcaagtccga 1260
atccctgtga agtatctcag ttaccagct cctgatatca aatggtacag aaatggaagg 1320
cccattgagt ccaactacac aatgattgtt ggcgatgaac tcaccatcat ggaagtgact 1380
gaaagagatg caggaaacta cacggtcacc ctcaccaacc ccatttcaat ggagaaacag 1440
agccacatgg tctctctggt tgtgaatgtc ccaccccgaga tcggtgagaa agccttgatc 1500
tcgcctatgg attcctacca gtatgggacc atgcagacat tgacatgcac agtctacgcc 1560
aacctcccc tgcaccacat ccagtgttac tggcagctag aagaagcctg ctcctacaga 1620
cccgcccaaa caagcccgta tgcttgtaaa gaatggagac acgtggagga tttccagggg 1680
ggaaacaaga tcgaagtcac caaaaaccaa tatgccctga ttgaaggaaa aaacaaaact 1740
gtaagtacgc tggtcaccca agctgccaac gtgtcagcgt tgtacaaatg tgaagccatc 1800
aacaagcgg gacgaggaga gagggtcacc tccttccatg tgatcagggg tcttgaaatt 1860
actgtgaac ctgctgccca gccaaactgag caggagagtg tgtccctgtt gtgcactgca 1920
gacagaaata cgtttgagaa cctcacgtgg tacaagcttg gctcacaggc aacatcggtc 1980
cacatgggag aatcactcac accagtttgc aagaacttgg atgctctttg gaaactgaat 2040
ggcaccatgt tttctaacag cacaatgac atcttgattg tggcatttca gaatgcctct 2100
ctgcaggacc aaggcgacta tgtttgctct gctcaagata agaagaccaa gaaaagacat 2160

```

tgcctggtca	aacagctcat	catcctagag	cgcatggcac	ccatgatcac	cggaaatctg	2220
gagaatcaga	caacaaccat	tggcgagacc	attgaagtga	cttggccagc	atctggaaat	2280
cctaccccac	acattacatg	gttcaaagac	aacgagaccc	tggtagaaga	ttcaggcatt	2340
gtactgagag	atgggaaccg	gaacctgact	atccgcaggg	tgaggaagga	ggatggaggc	2400
ctctacacct	gccaggcctg	caatgtcctt	ggctgtgcaa	gagcggagac	gctcttcata	2460
atagaaggtg	cccaggaaaa	gaccaacttg	gaagtcatta	tctctgtcgg	cactgcagtg	2520
attgccatgt	tcttctggct	ccttcttgtc	attgtcctac	ggaccgttaa	gcggggccaat	2580
gaaggggaac	tgaagacagg	ctacttgtct	attgtcatgg	atccagatga	attgcccttg	2640
gatgagcgct	gtgaacgctt	gccttatgat	gccagcaagt	gggaattccc	cagggaccgg	2700
ctgaaactag	gaaaacctct	tggccgcggt	gccttcggcc	aagtgattga	ggcagacgct	2760
tttggattg	acaagacagc	gacttgcaaa	acagtagccg	tcaagatgtt	gaaagaagga	2820
gcaacacaca	gcgagcatcg	agccctcatg	tctgaactca	agatcctcat	ccacattggt	2880
caccatctca	atgtggtgaa	cctcctaggc	gcctgcacca	agccgggagg	gcctctcatg	2940
gtgatttgtg	aattctgcaa	gtttggaaac	ctatcaactt	acttacgggg	caagagaaat	3000
gaatttgttc	cctataagag	caaaggggca	cgcttccgcc	agggcaagga	ctacgtttggg	3060
gagctctccg	tggatctgaa	aagacgcttg	gacagcatca	ccagcagcca	gagctctgcc	3120
agctcaggct	ttgttgagga	gaaatcgctc	agtgatgtag	aggaagaaga	agcttctgaa	3180
gaactgtaca	aggacttcct	gaccttgagg	catctcatct	gttacagctt	ccaagtggct	3240
aagggcattg	agtctctggc	atcaaggaag	tgtatccaca	gggacctggc	agcacgaaac	3300
attctcctat	cggagaagaa	tgtggttaag	atctgtgact	tcggcttggc	ccgggacatt	3360
tataaagacc	cggattatgt	cagaaaagga	gatgcccagc	tccctttgaa	gtggatggcc	3420
ccggaacca	tttttgacag	agtatacaca	attcagagcg	atgtgtggtc	tttcggtgtg	3480
ttgctctggg	aaatattttc	cttagtggtc	tccccatacc	ctgggggtcaa	gattgatgaa	3540
gaattttgta	ggagattgaa	agaaggaact	agaatgcggg	ctcctgacta	cactacccca	3600
gaaatgtacc	agaccatgct	ggactgctgg	catgaggacc	ccaaccagag	accctcgttt	3660
tcagagttgg	tggagcattt	gggaaacctc	ctgcaagcaa	atgcgcagca	ggatggcaaa	3720
gactatattg	ttcttccaat	gtcagagaca	ctgagcatgg	aagaggattc	tggactctcc	3780
ctgcctacct	cacctgtttc	ctgtatggag	gaagagggaag	tgtgcgaccc	caaattccat	3840
tatgacaaca	cagcaggaat	cagtcattat	ctccagaaca	gtaagcgaaa	gagccggcca	3900
gtgagtgtaa	aaacatttga	agatatccca	ttggaggaac	cagaagtaaa	agtgatccca	3960
gatgacagcc	agacagacag	tgggatggtc	cttgcatcag	aagagctgaa	aactctggaa	4020
gacaggaaca	aattatctcc	atcttttggg	ggaatgatgc	ccagtaaaa	cagggagctc	4080
gtggcctcgg	aaggctccaa	ccagaccagt	ggctaccagt	ctgggtatca	ctcagatgac	4140
acagacacca	ccgtgtactc	cagcgacgag	gcaggacttt	taaagatggt	ggatgctgca	4200
gttcacgctg	actcagggac	cacactgcgc	tcacctctctg	tttaaattgga	agtggctctg	4260
tcccggtctc	gcccccaact	cctggaaatc	acgagagagg	tgtctgcttag	attttcaagt	4320
gttgttcttt	ccaccacccg	gaagtagcca	catttgattt	tcatttttgg	aggaggggacc	4380
tcagactgca	aggagcttgt	cctcagggca	tttcagaga	agatgcccat	gacccaagaa	4440
tgtgttgact	ctactctctt	ttccattcat	ttaaaagtcc	tatataatgt	gccctgctgt	4500

FIGURA 5 - CONTINUAÇÃO

ggtctcacta ccagttaaag caaaagactt tcaaacacgt ggactctgtc ctccaagaag 4560
 tggcaacggc acctctgtga aactggatcg aatgggcaat gctttgtgtg ttgaggatgg 4620
 gtgagatgtc ccagggccga gtctgtctac cttggaggct ttgtggagga tgcggctatg 4680
 agccaagtgt taagtgtggg atgtggactg ggaggaagga aggcgcaagt cgctcggaga 4740
 gcggttgag cctgcagatg cattgtgctg gctctggtgg aggtgggctt gtggcctgtc 4800
 aggaaacgca aaggcgccg gcagggtttg gttttggaag gtttgcgtgc tcttcacagt 4860
 cgggttacag gcgagttccc tgtggcgttt cctactccta atgagagtgc cttccggact 4920
 cttacgtgtc tcttggcctg gccccaggaa ggaaatgatg cagcttgctc cttcctcctc 4980
 tctcaggctg tgccttaatt cagaacacca aaagagagga acgtcggcag aggctcctga 5040
 cggggccgaa gaattgtgag aacagaacag aaactcaggg tttctgctgg gtggagaccc 5100
 acgtggcgcc ctggtggcag gtctgaggtt tctctgtcaa gtggcggtaa aggctcaggc 5160
 tgggtttctt cctctatctc cactcctgtc agggccccc aa gtcctcagta ttttagcttt 5220
 gtggcttctt gatggcagaa aaatcttaat tggttgggtt gctctccaga taatcactag 5280
 ccagatttcg aaattacttt ttagccgagg ttatgataac atctactgta tcctttagaa 5340
 ttttaaccta taaaactatg tctactggtt tctgcctgtg tgettatgtt 5390

FIGURA 6

Flk-1 DE CAMUNDONGO, PROTEÍNA

SEQ. ID NO.: 6

MESKALLAVALWFCVETRAASVGLTGDFLHPPKLSTQKDILTILA
NTTLQITCRGQRDLWLWPNARDSEERVLVTECGGGDSIFCKTLTIPRVVGNNDTGAYK
CSYRDVDIASTVYVYVRDYRSPFIASVSDQHGIYITENKNKTVVIPCRGSISNLNVSL
CARYPEKRFPDGNRISWDSEIGFTLPSYMISYAGMVFEAKINDETYQSIMYIVVVVG
YRIYDVILSPPEIELSAGEKLVLNCTARTELVGLDFTWHSPPSKSHHKKIVNRDVKP
FPGTVAKMFLSTLTIESVTKSDQGEYTCVASSGRMIKRNRTFVRVHTKPFIAFGSGMKS
LVEATVGSQVRIPVKYLSYPAPDIKWYRNGRPYESNYTMIVGDELTIMEVTERDAGNYT
VILTNPISMEKQSHMVSLLVNVPPQIGEKALISPMDSYQYGTMTLTCTVYANPPLHHI
QWYWQLEEACSYPGQTSYPACKEWHRVEDFQGGNKIEVTKNQYALIEGKNKTVSTLVI
QAANVSALYKCEAINKAGRGERVISFHVIRGPEITVQAAQPTQESVSLCTADRNTF
ENLTWYKLSQATSVHMGESLTPVCKNLDALWKLNGTMFSNSTNDILIVAFQNASLQDQ
GDYVCSAQDKKTKKRHCLVKQLIILERMAPMITGNLENQTTTIGETIEVTCPASGNPTP
HITWFKDNETLVEDSGIVLRDGNRNLTIIRVRKEDGGLYTCQACNVLGCARAETLFIE
GAQECTNLEVIILVGTAVIAMFFWLLLIVLRTVKRANEGELKTGYLSIVMDPDELPLD
ERCERLPYDASKWEFPRDRCLKGKPLGRGAFGVIEADAFGIDKTATCKTVAVKMLKEG
ATHSEHRLMSELKILIHGHLNVVNLLGACTKPGGPLMVIVEFCKFGNLSTYLRGKR
NEFVVPYKSKGARFRQGDYVGELSVDLKRRLDSITSSQSSASSGFVEEKSLSDVEEEEA
SEELYKDFLTLEHLICYSFQVAKGMEFLASRKCIHRDLAARNILLSEKNVVKICDFGLA
RDIYKDPDYVRKGDARLPLKWMAPETIFDRVYTIQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGV
KIDEEFCRRLKEGTRMRAPDYTTPEMYQTMLDCWHEDPNQRPSFSELVEHLGNLLQANA
QQDGKDYIVLPMSETLSMEEDSGLSLPTSPVSCMEEEVCDPKFHYDNTAGISHYLQNS
KRKSRPVSVKTFEDIPLLEEPEVKVIPDDSQTDSGMVLASEELKTLEDNRNKLSPSFGGMM
PSKSRESVASEGSNQTSQYQSGYHSDDTDTTVYSSDEAGLLKMVDAAVHADSGTTLASP
PV

FIGURA 7



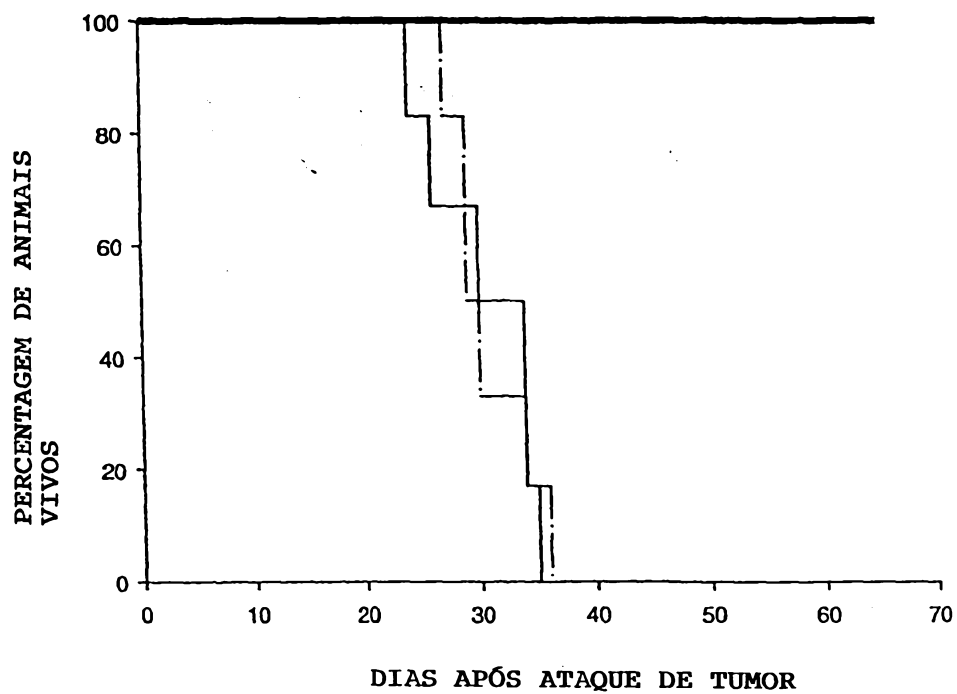
FIGURA 8

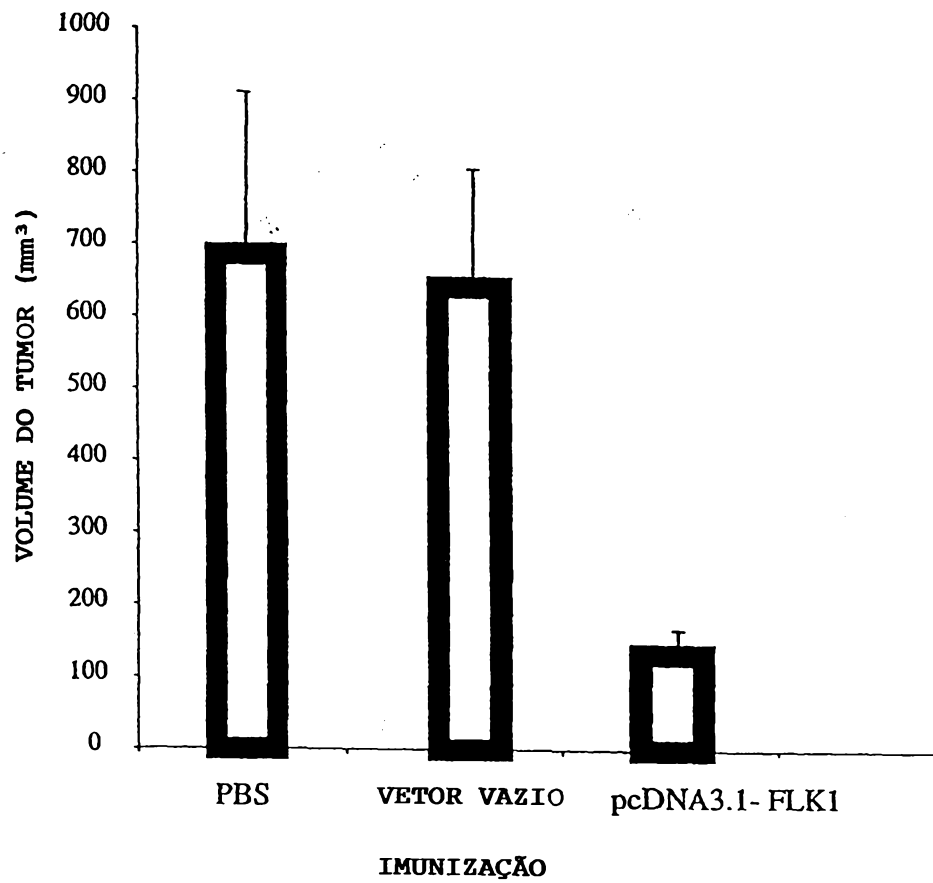
FIGURA 9

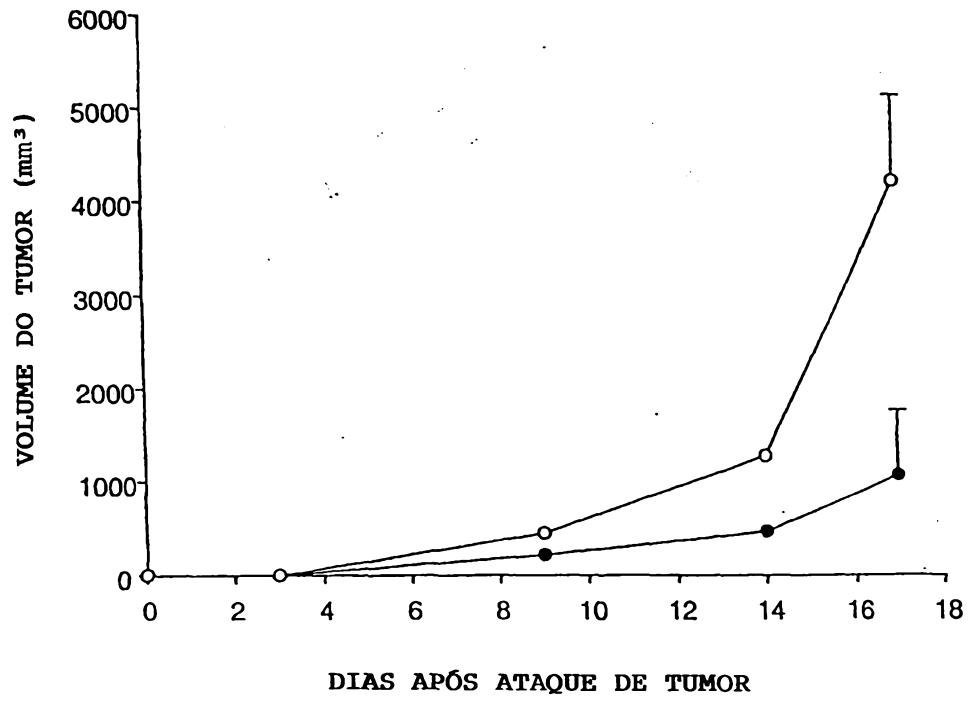
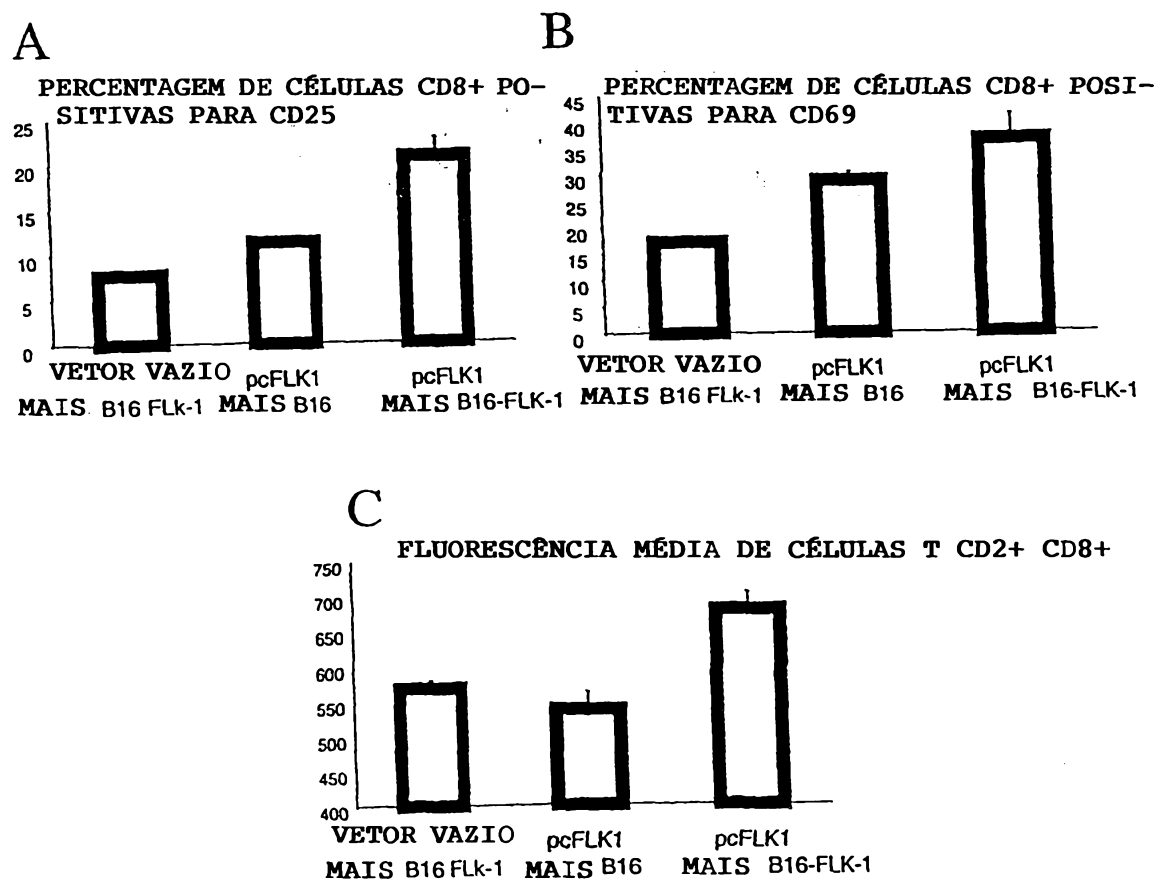
FIGURA: 10

FIGURA 11

VACINA DE DNA EFICAZ PARA DESPERTAR UMA RESPOSTA IMUNE
CONTRA CÉLULAS ENDOTELIAIS PROLIFERANTES, USO DE UMA
CONSTRUÇÃO DE DNA QUE CODIFICA OPERACIONALMENTE UMA
PROTEÍNA DE RECEPTOR DE VEGF E UM VEÍCULO FARMACEUTICAMENTE
5 ACEITÁVEL DESTA E ARTIGO DE MANUFATURA

Uma vacina de DNA eficaz para inibição de proliferação
de célula endotelial que compreende uma construção de DNA que
codifica operacionalmente uma proteína de receptor de fator
de crescimento vascular endotelial (VEGF). Essa invenção
10 fornece vacinas de DNA que codificam receptor-2 de VEGF (KDR,
ID. DE SEQ. N°: 2), receptor-1 de VEGF (Flt-1, ID. DE SEQ.
N°: 4), ou Flk-1 (o homólogo murídeo de KDR, ID. DE SEQ. N°:
6), seqüências de DNA IDS. DE SEQ. N°s: 1, 3, e 5
respectivamente, bem como métodos de uso de tal vacina de DNA
15 para inibir proliferação de célula vascular endotelial no
microambiente do tumor. É obtida anti-angiogênese e
subseqüente diminuição do crescimento e disseminação de tumor.