

(11) Número de Publicação: **PT 1137792 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/86 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01) **C12Q 1/00** (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **1999.11.12**

(30) Prioridade(s): **1998.12.09 US 111582 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2001.10.04**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.05.09**
056/2007

(73) Titular(es):

THERION BIOLOGICS CORPORATION
76 ROGERS STREET CAMBRIDGE, MA 02142US
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF
AMERICA, AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND
HUMAN SERVICES **US**

(72) Inventor(es):

JEFFREY SCHLOM **US**
JAMES HODGE **US**
DENNIS PANICALI **US**

(74) Mandatário:

LUISA MARIA FERREIRA GUERREIRO
PRACETA FERNANDO NAMORA, Nº 7, 3º ESQ. 2820-598
CHARNECA DA CAPARICA **PT**

(54) Epígrafe: **VECTOR RECOMBINADO QUE EXPRIME MOLÉCULAS COSTIMULANTES**
MÚLTIPLAS E AS SUAS UTILIZAÇÕES

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

VECTOR RECOMBINADO QUE EXPRIME MOLÉCULAS COSTIMULANTES MÚLTIPLAS E AS SUAS UTILIZAÇÕES

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um vector recombinação que compreende genes estranhos que codificam três moléculas costimulantes e, de um modo opcional, um gene estranho que codifica um antigénio alvo. A invenção refere-se ainda a um vírus recombinação que compreende genes estranhos que codificam pelo menos três moléculas costimulantes e, de um modo opcional, um gene estranho que codifica pelo menos um antigénio alvo ou um seu determinante antigénico imunológico. De um modo mais específico, a presente invenção refere-se a um poxvírus recombinação que compreende genes estranhos que codificam pelo menos as moléculas costimulantes: uma molécula da família B7, LFA-3 e ICAM-1 e, opcionalmente, um gene estranho que codifica pelo menos um antigénio alvo ou um seu determinante antigénico imunológico e usa-o como imunogénios e como vacinas. A presente invenção refere-se a um antigénio que apresenta células transinfectadas, infectadas ou transferidas por um vector recombinação que compreende genes estranhos que codificam três moléculas costimulantes e, de um modo opcional um gene estranho codifica pelo menos um antigénio alvo ou um seu determinante antigénico imunológico.

Antecedentes da Invenção

A extensão da resposta primária das células T, que envolve a sua activação, a sua expansão e a sua diferenciação, é de importância primordial para uma resposta imunológica bem sucedida a um antigénio. O início de uma resposta imunológica exige pelo menos dois sinais para a activação das células T ingénuas pelas células que apresentam antigénio (APC) (1-5). O primeiro sinal é um específico do antigénio distribuído através do receptor de células T através do péptido/complexo de histocompatibilidade principal, e faz com que a célula T entre no ciclo das células. O segundo sinal, ou "costimulatório", é necessário para a produção e para a proliferação de citocina. Pelo menos três tipos diferentes de células que podem ser encontrados normalmente na superfície da APC profissional foram propostos como sendo capazes de proporcionar o segundo sinal para a activação crítica de células T: B7.1 (CD 80), molécula de adesão intracelular - 1 (IÇAM-1; CD54), e antigénio associado-3 (LFA-3; CD58 humano; murina CD48) (2, 6, 7) com função de leucócito. Os ligantes de células T para estas moléculas costimulatórias são diferentes. B7-1 interage com o CD28 e com as moléculas de CTLA-4, o IÇAM-1 interage com o complexo CD11a/CD18) complexo (LFA-1/integrino $\alpha 2$), e o LFA-3 interage com as moléculas CD2 (LFA-2). Não é sabido se estas moléculas costimulatórias efectuem funções equivalentes ou se efectuem funções especializadas em etapas específicas de uma resposta imunologicamente induzida (2). Estas moléculas provaram de um modo individual contribuir para costimular a proliferação de células T *in vitro* (6). No entanto, como elas podem ser expressas de um modo simultâneo em APC, foi difícil examinar as potências relativas das moléculas costimulatórias

individuais durante a indução da proliferação das células T (2).

Foi proposto que tanto as moléculas de antígeno como as de costimulatório tenham de ser expressas na proximidade umas das outras de modo a poderem engatar entre si de um modo correcto a célula T e os receptores costimulatórios (8, 9), em que a mistura de vários vírus recombinados pode ser usada para explorar a comparação potencial das moléculas de costimulação. A desvantagem desta técnica reside, no entanto, no facto de a mistura de três ou mais vírus ter uma probabilidade estatisticamente inferior de co-infectar a mesma célula, fazendo deste modo uma estrutura de genes múltiplos muito mais desejável para ser usada com três genes de moléculas costimulatórias.

A Patente WO 91/02805, publicada a 7 de Março de 1991, revela uma estrutura de um retrovírus recombinado que orienta a expressão de um antígeno alvo, uma proteína MHC e outras proteínas envolvidas nas interacções de imunidade que não se encontram presentes ou que se encontram sub-representadas numa célula alvo.

Akagi e outros, 1997, J. Immunotherapy Vol. 20 (1) 38-47 revelam uma mistura de um vírus de vacina recombinado contendo um gene MUC1 modificado (rV-MUC1) e um vírus de vacina recombinado contendo o gene para a molécula costimulatória de murina B7 (rV-B7).

Cavallo, P. e outros 1995, Eur. J. Immunol., 25:1154-1162 revela a transfecção de B7-1 cDNA passando para o interior de

três linhas de células tumorais IÇAM-1⁺ é suficiente para induzir a rejeição em ratos singênicos.

Chen, L. e outros 1994, J. Exp. Med., 179:523-532 revela um vector de retrovírus de recombinação contendo cDNA para a murina B7, e o uso do vector na transdução de vários tumores.

Damie, N.K. e outros 1992, J. Immunol Vol 148 (Nº 7): 1985-1992 revela o uso de um antigénio que apresenta um sistema de cultura in vitro independente de célula (APC) que consiste de combinações imobilizadas de anticorpos monoclonais orientados para o complexo de TCR/CD3 e chaminés solúveis de Ig (RG) de quatro moléculas costimulatórias distintas associadas a APC de modo a comparar as capacidades destas moléculas para costimular a proliferação de células T.

Dubey C. e outros 1995 J. Immunol 155:42 - 47 revelam um estudo da contribuição relativa de IÇAM-1 : LFA 1 e B7:CD28/CTLA-4 com caminhos mutuamente estimulatórios na activação das células T inocentes, utilizando ou o anticorpo anti-CD 28 ou as linhas de células de fibroblastos transfectadas com I-E^k, o que exprime ou as moléculas de estimulação mutua, IÇAM-1 sozinhas, B7-1 sozinha, ou IÇAM-1 e B7-1 sozinha.

Fenton, R.G. e outros 1998 Vol 21, nº 2, pp 95-108, revela a transfecção da molécula de estimulação mútua do gene B7-1 em três linhas de células de melanoma humano que exprimem HLA-A2, e a sua capacidade para estimular as células T humanas primárias. As três linhas de melanomas também expressavam

níveis detectáveis das moléculas de estimulação mútua ICAM-1 (CD54) e LFA-3 (CD58).

Gjorloff Wingren, A. e outros 1995, *Critical Reviews in immunol* 15 (3 & 4): 235-253 revelam que com a transfecção simultânea de HLA-DR, B7 e LFA-3 para as células CHO, estas moléculas cooperam na activação tanto das células T ingénuas como nas de memória e permitem respostas em concentrações pico molares do antigénio, enterotoxina dos estafilococos B (SEB).

Goldbach-Mansky, R. e outros, 1992, *International Immunol.* 4 (Nº 12): 1351-1360 revelam que as células T CD4⁺ respondem à enterotoxina dos estafilococos B (SEB) na presença de LFA-3, ICAM-1 e a linha de células K562 da leucemia dos eritrócitos, células L de murina, e células L humanas B7 transfectado.

Hodge, J.W. e outros em 1994 *Cancer Research* 54:5552-5555 revelam a construção e a caracterização dos vírus de vacina recombinados contendo os genes de murina B7.1 e B7.2.

Hodge, J.W. e outros em 1994 *Cancer Research* 55:5552-5555 *Cancer Research* 55:3598-3603 revelam uma mistura de vaccínia murina recombinada B7.1 (rV-B7) mas a vaccínia recombinada que exprime o gene carcino-embriónico humano antigénico (rV-CEA) e o uso desta mistura para a actividade anti-tumoral.

Parra e outros 1993, *Scand J. Immunol* 38:508-514, Parra e outros 1994, *J. Immunol* 153:2479-2487, e Parra e outros 1997, *J. Immunol* 158:637-642 revelam células de CHO transfectadas com moléculas HLA-DR4 humana (CHO-DR4); HLA-DR4 e B7 (CHO-

DR4/B7), HLA-DR4 e LFA-3 (CHO-DR4/LFA3); HLA-DR4 e IÇAM-1 (CHO-DR4/IÇAM-1); ou genes DR4, B7 e LFA-3 (CHO-DR4B7/LFA-3).

Thomas, R. e outros 1993 J. Immunol. 151:6840-6852 revelam que as células dendríticas acabadas de obter (DC) exprimem densidades semelhantes de HLA-DR e as moléculas acessórias LFA-3, IÇAM-1 e B7 como monócitos.

Uzendoski, K e outros, Maio de 1997, Human Gene Therapy 8:851-860 revelam a construção, a caracterização e as consequências imunológicas de um vírus de vaccínia recombinado que exprime a molécula costimulatória de murina, IÇAM-1.

A Patente WO 96/10419 publicada a 11 de Abril de 1996, do PCT/US95/12624 revela o assunto objecto da presente em relação a um vector viral recombinado simples que incorpora um ou mais genes ou uma porção do mesmo codifica uma molécula imuno-estimulatória e um ou mais genes ou uma porção dos mesmos incluem um antigénio de um estado de doença.

A Patente dos Estados Unidos nº 5 738 852, em nome de Robinson e outros, revela um vector retroviral contendo uma sequência de polinucleotidos que codifica um antígeno alvo de um agente infeccioso e uma sequência de polinucleotidos que codifica uma molécula costimulatória B7.

A presente invenção é um vector contendo codificação de DNA estranha de pelo menos três moléculas costimulatórias sozinhas ou em combinação com a codificação de DNA estranho em pelo menos um antigénio alvo ou uma sua estrutura

antigénica imunológica o que permite a expressão funcional de cada DNA estranho numa célula hospedeira infectada.

Resumo da Invenção

A presente invenção proporciona um vector recombinado que compreende genes estranhos ou exógenos ou porções dos mesmos que codificam três moléculas costimulatórias. Os genes ou as porções funcionais dos mesmos que codificam moléculas costimulatórias com utilidade na presente invenção incluem, de um modo não limitativo, um membro da família B7, e moléculas ICAM-1, LFA-3, 4-1BBL, CD59, CD40, CD70, VCAM-1, OX-40L, porções funcionais e homólogos humanos das mesmas. O vector da presente invenção pode ainda proporcionar um gene estranho que codifica pelo menos um antigénio alvo ou uma sua estrutura antigénica em combinação com os genes estranhos que codificam três moléculas costimulatórias. O gene estranho codifica pelo menos um antigénio alvo ou uma sua estrutura antigénica pode ser derivada das células, dos tecidos ou dos organismos como sejam os vírus, as bactérias, os protozoários, os parasitas, as leveduras, as células tumorais, as células pré-neoplásicas, as células hiperplásicas, as células específicas dos tecidos, ou os antigénios sintéticos. O vector pode ainda proporcionar um gene estranho que codifica pelo menos uma de entre uma combinação de citoquinas, de quimoquinas e de fit-3L.

O vector recombinado destinado a ser usado no grupo de acordo com a presente invenção consiste por vectores de bactérias, vectores de vírus, vectores baseados em ácido nucleico e afins. Os vectores de vírus recombinados incluem, de um modo

não limitativo, o poxvírus, o adenovírus, o vírus do herpes, o alfavírus, o retrovírus, o picornavírus, o iridovírus e afins. O poxvírus inclui de um modo não limitativo o ortopox, o avipox, o suipox e o capripox.

A presente invenção proporciona um vírus recombinado que compreende genes estranhos ou porções dos mesmos que codificam três moléculas costimulatórias para proporcionarem uma resposta de imunidade aumentada para uma célula alvo, para um antígeno alvo ou para o seu epítope imunológico que é superior do que uma resposta proporcionada por um vírus de recombinado que compreende um gene estranho ou os genes que codificam moléculas de codificação simples ou duplas. O vírus recombinado pode ainda proporcionar um gene estranho que codifica pelo menos um antígeno alvo ou um seu epítope imunológico em combinação com os genes estranhos que codificam três moléculas costimulatórias. O vírus recombinado pode ainda proporcionar um gene estranho que codifica outros tipos de moléculas imuno-estimulatórias como sejam a citocina que inclui, de um modo não limitativo, IL-2, IL-12, GM-CSF e outros tipos como sejam a quimoquinas como sejam as MIP1, MIP2, RANTES e afins, e Fit-3L que estimula a proliferação de DC.

A presente invenção proporciona ainda um poxvírus recombinado que compreende vírus estranhos ou porções dos mesmos que codificam três moléculas costimulatórias para proporcionarem uma resposta imunológica aumentada a uma célula alvo, a um antígeno alvo ou a um seu epítope imunológico que seja superior a uma resposta proporcionada por um poxvírus recombinado que compreende um gene ou vários genes estranhos que codificam pelo menos um antígeno alvo ou um seu epítope

imunológico em combinação com os genes estranhos que codificam três moléculas costimulatórias.

A presente invenção proporciona ainda um poxvírus recombinado que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica e que exprime três moléculas costimulatórias, em que a referida sequência de ácido nucleico compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos uma molécula da família B7 de moléculas costimulatórias, uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma molécula costimulatória ICAM-1 e uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma molécula costimulatória LFA-3. O vírus recombinado proporciona ainda uma multiplicidade de promotores de poxvírus que regulam a expressão de cada um dos genes estranhos.

A presente invenção proporciona um vírus recombinado produzido ao permitir-se um vector plasmida que compreende a codificação de DNA estranho que codifica moléculas costimulatórias para que sofram a recombinação com um genoma de vírus parental de modo a produzir um vírus recombinado que tenha inserido no seu genoma o DNA estranho. O vírus recombinante produzido pela recombinação pode ainda conter um gene estranho que codifica pelo menos um antígeno alvo ou um seu epítipo imunológico proporcionado pelo vector plasmida.

A presente invenção produz ainda um poxvírus recombinado produzido permitindo um vector plasmida que compreende DNA estranho que codifica a molécula costimulatória, LFA-3, ICAM-1 e pelo menos uma molécula da família B7 de modo a que sofra uma recombinação com um genoma de poxvírus parental de modo a

produzir um poxvírus recombinado tendo inserido no seu interior o genoma do DNA estranho e uma multiplicidade de promotores de poxvírus capazes de controlar a expressão do DNA estranho. O poxvírus recombinado produzido pela recombinação pode ainda conter um gene estranho que codifica pelo menos um antígeno alvo ou um seu epítopo imunológico proporcionado pelo vector plasmida.

Um objecto da presente invenção é proporcionar um imunogénio para aumentar as respostas imunológicas em relação às células alvo, aos antígenos alvo ou aos seus epítopes imunológicos compreendendo um vector recombinado ou tendo sequências de ácidos nucleicos estranhas que codificam três moléculas costimulatórias. O vector pode ainda compreender um ácido nucleico estranho e uma sequência de ácidos nucleicos que codificam pelo menos um antígeno alvo ou um seu epítopo imunológico.

Um outro objecto da presente invenção é proporcionar um imunogénio destinado a aumentar as respostas imunológicas em relação às células alvo, aos antígenos alvo ou aos seus epítopes imunológicos que compreendem um vector recombinado tendo uma sequência de ácido nucleico que codifica três moléculas costimulatórias. O vector de vírus recombinado pode ainda compreender uma sequência de ácido nucleico estranho que codifica três moléculas costimulatórias. O vector de vírus recombinado pode ainda compreender uma sequência de ácido nucleico estranha que codifica pelo menos um ou mais antígenos alvo ou os seus epítopes imunológicos.

Um outro objecto da presente invenção é proporcionar um imunogénio para o aumento das respostas imunológicas em

relação às células alvo, aos antígenos alvo ou aos seus epítopes imunológicos compreendendo um vector de poxvírus recombinado compreendendo uma sequência de ácido nucleico estranha que codifica as moléculas costimulatórias LFA-3, ICAM-1 e uma molécula da família B7 e uma sequência de ácido nucleico estranha que codifica pelo menos um antígeno alvo ou um seu epítope imunológico.

O vector de acordo com a presente invenção proporciona uma vacina destinada a estimular ou a aumentar as respostas imunitárias em relação às células alvo, aos antígenos alvo ou aos seus epítopes para a protecção e/ou para o tratamento de estados de doença. A vacina de vector compreende sequências de ácidos nucleicos estranhos que codificam moléculas costimulatórias. O vector de vacina pode ainda compreender sequências de ácidos nucleicos estranhos e que codificam três moléculas costimulatórias. A vacina de vector pode ainda compreender sequências de ácidos nucleicos estranhos que codificam um ou mais antígenos alvo ou seus epítopes imunológicos para a produção de uma vacina monovalente ou polivalente em relação a uma doença.

A presente invenção proporciona composições farmacêuticas que compreendem um vector que possui sequências de ácido nucleico estranhas que codificam três moléculas costimulatórias e um transportador farmacologicamente aceitável. O vector pode ainda compreender uma sequência de ácido nucleico estranha que codifica pelo menos um antígeno alvo ou um seu epítope imunológico. O vector pode ainda compreender uma sequência nucleica que codifica uma citocina, uma quemoquina, flt-3L, ou uma combinação dos mesmos.

A presente invenção proporciona uma composição farmacêutica que compreende um vector de vírus recombinado que compreende genes estranhos ou exógenos ou em que porções funcionais dos mesmos codificam três moléculas costimulatórias, em que um gene estranho codifica pelo menos um antigénio alvo ou um seu epítope imunológico, e um transportador farmacologicamente aceitável.

A presente invenção compreende ainda composições farmacêuticas que compreende um poxvírus recombinado que compreende genes estranhos ou porções do mesmo que codificam três moléculas costimulatórias e um transportador farmacologicamente aceitável. O poxvírus recombinado pode ainda compreender uma sequência de ácido nucleico estranha que codifica pelo menos um antigénio alvo ou um seu epítope imunológico.

Um outro aspecto da presente invenção é uma composição farmacêutica que compreende um poxvírus recombinado que compreende genes estranhos ou porções do mesmo que codificam três moléculas costimulatórias, e pode ainda compreender um gene estranho ou uma porção do mesmo que codifica pelo menos um antigénio alvo ou um seu epítope imunológico, e um transportador farmacologicamente aceitável ou um seu epítope imunológico.

A presente invenção proporciona ainda uma composição farmacêutica que compreende um primeiro vector que compreende genes estranhos ou porções funcionais dos mesmos que codificam as moléculas costimulatórias e um segundo vector

que compreende genes estranhos que codificam pelo menos um antigénio alvo ou um seu epítope imunológico e um transportador farmacologicamente aceitável.

A presente invenção proporciona células hospedeiras infectadas, transfectadas ou transduzidas com um primeiro vector que compreende genes estranhos que codificam três moléculas costimulatórias que provocam a expressão das três moléculas costimulatórias nas células hospedeiras. O primeiro vector ou um segundo vector podem ainda proporcionar um gene estranho que codifica pelo menos um antigénio alvo ou um seu epítope imunológico para a célula hospedeira.

A presente invenção proporciona às células que apresentam antigénios (APCs) ou células infectadas com tumores, transfectadas ou transduzidas um primeiro vector que compreende genes estranhos ou produzidos no exterior que codificam três moléculas costimulatórias provocando a expressão ou a sobre-expressão das três moléculas costimulatórias. O primeiro vector ou um segundo vector podem ainda proporcionar um gene estranho que codifica pelo menos um antigénio alvo ou um seu epítope imunológico em relação à célula hospedeira.

A presente invenção proporciona ainda células hospedeiras infectadas com um poxvírus recombinado provocando a expressão das três moléculas costimulatorias e, opcionalmente, provocando a expressão de um antigénio alvo ou de um seu epítope imunológico.

Um outro aspecto da presente invenção é uma célula dendritica (DC) e um seu precursor infectado, transfectado ou geneticamente alterado de modo a aumentar a expressividade dos genes que codificam três moléculas costimulatórias exógenas. As células dentriticas e os seus precursores podem ainda ser alteradas geneticamente de modo a expressarem genes estranhos que codificam pelo menos um antigénio alvo ou um seu epitope imunológico.

Um outro aspecto de presente invenção é uma célula dendritica e um seu precursor infectado, transfectado ou geneticamente alterado de modo a aumentar a expressividade dos genes que codificam três moléculas costimulatórias exógenas. As células dentriticas e os seus precursores podem ainda ser alteradas geneticamente de modo a expressarem genes estranhos que codificam pelo menos um antigénio alvo ou um seu epitope imunológico.

A presente invenção proporciona ainda uma célula dendritica (DC) e um seu precursor infectado, transfectado ou geneticamente alterado de modo a aumentar a expressividade dos genes que codificam uma molécula B7, IÇAM-1 e LFA-3. As células dentriticas e os seus precursores podem ainda ser alteradas geneticamente de modo a expressarem genes estranhos que codificam pelo menos um antigénio alvo ou um seu epitope imunológico.

A presente invenção proporciona processos e um vector plasmida para a recombinação com um vírus parental destinado a produzir um vírus recombinado capaz de expressar sequencias de ácido nucleico estranhas que codificam três moléculas costimulatórias que compreendem (a) uma multiplicidade de

promotores virais, (b) as sequências de ácidos nucleicos estranhos que codificam as três moléculas costimulatórias, (c) sequências de DNA que ladeiam as estruturas dos elementos (a) e (b) sendo as sequências que ladeiam nas extremidades 5' e 3' homologas a uma região de um genoma de vírus parental em que os elementos (a) e (b) se destinam a ser inseridos. O vector plasmida pode ainda compreender uma sequência de ácido nucleico estranho que codifica pelo menos um antígeno alvo ou um seu epítipo imunológico. O vector plasmida pode ainda proporcionar um gene que codifica um marcador seleccionável.

A presente invenção proporciona processos e um vector plasmida para a recombinação com um poxvírus parental destinado a produzir um poxvírus recombinado capaz de expressar sequências de ácido nucleico estranhas que codificam as moléculas costimulatórias LFA-3, ICAM-1 e uma molécula B7 que compreendem (a) uma multiplicidade de promotores poxvirais, (b) as sequências de ácidos nucleicos estranhos que codificam as moléculas costimulatórias LFA-3, ICAM-1 e uma molécula B7, (c) sequências de DNA que ladeiam as estruturas dos elementos (a) e (b) sendo as sequências que ladeiam nas extremidades 5' e 3' homologas a uma região de um genoma de vírus parental em que os elementos (a) e (b) se destinam a ser inseridos. O vector plasmida pode ainda compreender uma sequência de ácido nucleico estranho que codifica pelo menos um antígeno alvo ou um seu epítipo imunológico. O vector plasmida pode ainda proporcionar um gene que codifica um marcador seleccionável.

Um aspecto da presente invenção é um processo para aumentar as respostas imunológicas num mamífero em pelo menos uma

célula alvo, antígeno alvo ou seu epítipo imunológico compreendendo a administração de um primeiro vector que compreende sequências de ácidos nucleicos estranhas que codificam três moléculas costimulatórias, sendo cada uma das moléculas costimulatórias expressa numa célula no mamífero numa quantidade eficaz para aumentar pelo menos uma resposta imunológica no mamífero. Genes ou suas porções funcionais que codificam moléculas costimulatórias tendo utilidade para a presente invenção incluem, de um modo não limitativo, um membro da família B7, ICAM-1, LFA-3, 4-1BBL, CD59, CD40, CD70, VCAM-1, OX-40L e seus homólogos e porções dos mesmos. Uma sequência de ácidos nucleicos estranhos que codificam pelo menos um antígeno alvo ou um seu epítipo imunológico podem ainda ser proporcionados no processo pelo primeiro vector ou por um segundo vector.

Para além dos genes ou das suas porções que codificam três moléculas costimulatórias, pode ser também fornecida pelo primeiro vector, pelo segundo vector ou pelo terceiro vector uma sequência exógena de ácidos nucleicos ou de suas porções que codifiquem pelo menos uma ou uma combinação de outros tipos de moléculas estimuladoras da imunidade. Outros tipos de moléculas estimuladoras da imunidade incluem as citocinas como sejam a IL-2, a IL-12, a GM-CSF e afins, as quimoquinas como sejam a MIP1, a MIP2, a RANTES e afins e a Flt-3L.

Um aspecto da presente invenção é um processo destinado a aumentar uma resposta de imunidade às células T específica de um antígeno num mamífero para uma célula alvo, para um antígeno alvo ou para um seu epítipo imunológico compreendendo a administração de um poxvírus estranho

recombinado compreendendo sequências de ácidos nucleicos que codificam três moléculas costimulatórias LFA-3, ICAM-1 e uma molécula B7, sendo cada molécula costimulatória expressa numa célula no mamífero numa quantidade eficaz para aumentar pelo menos uma resposta de imunidade da célula T em que o aumento é superior ao somatório aditivo do aumento proporcionado pela administração de moléculas costimulatórias simples ou duplas.

Num outro processo para aumentar as respostas imunológicas, as APCs ou as células de tumores que expressem genes estranhos ou fornecidos exogenamente que codifiquem três moléculas costimulatórias são fornecidas a um mamífero numa quantidade eficaz e suficiente para aumentar as respostas imunológicas. A APC ou a célula de tumor pode ainda exprimir genes estranhos que codificam pelo menos um antígeno alvo ou um seu epítopo para o aumento das respostas de imunidade. Um antígeno alvo ou um seu epítopo imunológico podem ser administrados ao mamífero antes de, ao mesmo tempo que ou depois da administração de APC ou da célula de tumor. De um modo adicional, ou de um modo alternativo, as APCs ou as células de tumores são impulsionadas com pelo menos um antígeno alvo ou um seu epítopo imunológico antes da administração ao mamífero.

A presente invenção proporciona processos para o aumento das respostas tumorais num mamífero a uma célula alvo, a um antígeno alvo ou a um seu epítopo imunológico compreendendo a administração de um vector recombinado compreendendo sequências de ácido nucleico estranhas que codificam três moléculas costimulatórias para um mamífero numa quantidade eficaz para aumentar uma resposta tumoral. O vector pode

ainda compreender sequências de ácido nucleico que codificam pelo menos um antígeno alvo ou um seu epítopo imunológico. A presente invenção proporciona ainda um anticorpo isolado ou uma sua porção isolada em relação a uma célula alvo, a um antígeno alvo ou a um seu epítopo imunológico produzido por intermédio do processo.

A presente invenção proporciona ainda anticorpos específicos para um antígeno alvo ou para um seu epítopo produzido como resposta à administração de um poxvírus recombinado compreendendo genes estranhos que codificam B7, ICAM-1 e LFA-3 e genes que codificam um ou mais antígenos alvo ou seus epítopos.

Breve Descrição dos Desenhos

Estes e outros objectos, características e muitas vantagens associadas da presente invenção serão melhor compreendidas aquando da leitura da descrição detalhada da invenção.

Figura 1. Estrutura do genoma do plasmida p T5032 compreendendo sequências de ácido nucleico que codificam a murina LFA-3, ICAM-1 e B7.1 ladeada por porções da região Hind III M do genoma da vaccínia.

Figura 2. Estrutura do genoma do plasmida p T5047 compreendendo sequências de ácido nucleico que codificam a murina LFA-3, ICAM-1, B7.1 e gene lacZ, ladeada por porções da região Hind III J do genoma da vaccínia.

Figura 3. Estrutura do genoma do plasmida pT5031 compreendendo sequências de ácido nucleico que codificam a murina LFA-3, ICAM-1, B7.1 e uma sequência de ácidos nucleicos que codifica CEA, ladeada por porções da região Hind III M do genoma da vaccínia.

Figuras de 4A a 4C. Estrutura do genoma de vírus de vaccínia recombinados que exprimem a costimulação de três moléculas de murina como (Figura 4C) ou sem (Figuras 4A e B) um antigénio associado a um tumor. A Figura 4A ilustra uma estrutura de um genoma de vaccínia recombinada vT171. A Figura 4B ilustra uma estrutura de um genoma de vaccínia recombinada vT199. A Figura 4A ilustra uma estrutura de um genoma de vaccínia recombinada vT172. Hind III M e Hind III J são os locais onde se dá a inserção dos genomas do poxvírus dos genes estranhos. Os promotores 30K, 13; se/L, 7.5K, 40K e C1 são promotores de poxvírus. São ilustrados os locais de restrição Bam HI e Hind III nas sequências inseridas, com a distância de cada local (em pares de quilobase) deste a extremidade 5' da inserção (0) indicada acima de cada um dos locais entre parêntesis (não se encontram desenhados à escala).

Figura 5. Estrutura do genoma do plasmida pT8001 compreendendo sequências de ácido nucleico que codificam a murina LFA-3, ICAM-1, B7.1 e gene lacZ, ladeada por porções da região BamHI J do genoma do pox aviário.

Figura 6. Estrutura do genoma do plasmida pT5049 compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica o antigénio associado ao tumor, CEZ e a murina LFA-3, ICAM-1,

B7.1 em combinação com o gene lacZ, ladeada por porções da região BamHI J do genoma do pox aviário.

Figuras de 7A a 7D. Estrutura do genoma de vírus recombinados de pox de aviário que exprimem três moléculas costimulatórias de murina com (Fig. 7B, 7C e 7D) ou sem (Fig. 7A) um antígeno associado a um tumor (TAA). A Figura 7A ilustra a estrutura do genoma do pox de aviário recombinado vT222. A Figura 7B ilustra a estrutura do genoma de um pox de aviário recombinado vT 194. A Figura 7C ilustra a estrutura do genoma do pox de aviário recombinado que exprime MUC-1, B7.1, ICAM-1 e LFA-3. A Figura 7D ilustra a estrutura do genoma do pox de aviário recombinado que exprime um antígeno associado a um tumor, B7.1, ICAM-1 e LFA-3. BamHI J é o local da inserção do genoma do vírus de pox de aviário dos genes estranhos. se/L, I3, 7.5K, C1, 40K e 30 K são promotores de vírus pox. P1 - P5 indicam cinco promotores de vírus pox diferentes. BamHI e HindIII são locais de restrição nas sequências inseridas e encontram-se ilustrados, com a distância de cada local (em pares de quilobase) a partir da extremidade 5' da inserção (0) indicada acima de cada local entre parêntesis (não traçado à escala).

Figura 8. Estrutura do genoma do plasmida pT5064 compreendendo sequências de ácidos nucleicos que codificam o LFA-3 humano, o ICAM-1 humano, o B7.1 humano e o gene lacZ, ladeada por porções da região HindIII J do genoma da vaccinia.

Figuras de 9A a 9C. Estrutura do genoma de vírus de pox recombinados que exprimem três moléculas costimulatórias

humanas LFA-3, ICAM-1 e B7.1 em conjunto com o gene lacZ com (Figura 9B, C) ou sem (Figura 9A) um antígeno de tumor associado, HindIII J é o local de inserção do genoma do vírus da vaccínia dos genes estranhos. BamHI J é o local da inserção do genoma do vírus de pox de aviário. 30K, 13, sE/L, 40K e CI são promotores de vírus pox. P1 - P5 indicam cinco promotores de vírus pox diferentes. BgIII e HindIII são locais de restrição nas sequências inseridas e encontram-se ilustrados, com a distância de cada local (em pares de quilobase) a partir da extremidade 5' da inserção (0) indicada acima de cada local entre parêntesis (não traçado à escala).

Figura 10. Estrutura do genoma do plasmida pT8016 compreendendo sequências de ácidos nucleicos que codificam o CEA (6D) e o LFA-3 humano, o ICAM-1, o B7.1 e o gene lacZ da E. coli, ladeada por porções da região HindIII J do genoma da vaccínia.

Figura 11. Estrutura do genoma de um vírus de vaccínia recombinado vT238 que exprime CEZ (6D) e três moléculas costimulatórias humanas. HindIII J é o local de inserção do genoma do poxvírus dos genes estranhos. 40K, 30K, 13, sE/L, e CI são promotores de vírus de pox.

Figura 12. Estrutura do genoma do plasmida pT8019 compreendendo sequências de ácidos nucleicos que codificam a murina LFA-3, o ICAM-1, o B7.1 e o gene lacZ da E. coli, ladeada por porções da região BamHI J do genoma de pox de aviário.

Figura 13A e 13B. Estruturas dos genomas de vírus de pox de aviário recombinados que exprimem moléculas costimulatórias de murina ou humanas. A Figura 13A ilustra a estrutura de genoma dos vírus de pox de aviário recombinados vT251. A Figura 13B ilustra a estrutura do genoma do pox de aviário recombinado vT232. BamHI J é o local da inserção do genoma de poxvírus dos genes estranhos. 30K, 13, sE/L e C1 são promotores do poxvírus.

Figura 14. Estrutura do genoma do plasmida pT5072 compreendendo sequências de ácidos nucleicos que codificam o LFA-3 humano, o ICAM-1 humano, o B7.1 humano e o gene lacZ da E. coli, ladeada por porções da região BamHI J do genoma da pox de aviário.

Figura 15. Estrutura do genoma do plasmida pT8020 compreendendo sequências de ácidos nucleicos que codificam o MUC-1, a murina LFA-3, ICAM-1, B7.1 e o gene lacZ da E. coli, ladeada por porções da região BamHI J do genoma da pox de aviário.

Figura 16A a 16D. Estruturas dos genomas de vírus de pox de aviário recombinados que exprimem moléculas costimulatórias de murina ou humanas. A Figura 16A ilustra a estrutura de genoma dos vírus de pox de aviário recombinados vT250. A Figura 16B ilustra a estrutura do genoma do pox de aviário recombinado vT242. A Figura 16C ilustra a estrutura do genoma do pox de aviário recombinado vT257. BamHI J é o local da inserção do genoma de poxvírus dos genes estranhos. 40K, 7.5K, 30K, 13, sE/L e C1 são promotores do poxvírus.

Figura 17. Estrutura do genoma do plasmida pT2186 compreendendo sequências de ácidos nucleicos que codificam o MUC-1, a LFA-3 humana, ICAM-1, B7.1 e o gene lacZ da E. coli, ladeada por porções da região BamHI J do genoma da pox de aviário.

Figura 18. Estrutura do genoma plasmida pT2187 compreendendo sequências de ácidos nucleicos que codificam CEA (6D), a LFA-3 humana, ICAM-1, B7.1 e o gene lacZ da E. coli, ladeada por porções da região BamHI J do genoma da pox de aviário.

Figura 19. Estrutura do genoma do plasmida pT5080 compreendendo sequências de ácidos nucleicos que codificam PSA, PSMA, LFA-3 humana, ICAM-1, B7.1 e o gene lacZ da E. coli, ladeada por porções da região BamHI J do genoma da pox de aviário.

Figura 20. Estrutura do genoma do plasmida pT5085 compreendendo sequências de ácidos nucleicos que codificam a LFA-3 da murina, ICAM-1, B7.1 e o gene lacZ da E. coli, ladeada por porções da região de apagamento III do genoma de MVA.

Figuras 21A e 21B. Estrutura do genoma dos vírus recombinados MVA que exprimem as moléculas costimulatorias de murina ou humanas com ou sem antígenos associados ao tumor. A Figura 21A ilustra a estrutura do genoma do MVA recombinado vT264. A Figura 21B ilustra a estrutura do genoma do MVA recombinado vT260. Apagamento III é o local da inserção no genoma do poxvírus dos genes estranhos. 40K, 7,5K, 30K, 13, sE/L e C1 são promotores do poxvírus.

Figura 22. Estrutura do genoma do plasmida pT5084 compreendendo sequências de ácidos nucleicos que codificam PSA, PSMA, LFA-3 humana, ICAM-1, B7.1 e o gene lacZ da E. coli, ladeada por porções da região de apagamento III do genoma de MVA.

Figura 23. Expressão de superfície de molécula costimulatória a seguir à infecção com os vírus recombinados. As células de tumor MC38 foram infectadas durante 5 horas a 5 MOI (multiplicidade da infecção; pfu/célula) com o vírus indicado. Após a infecção, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais titulados com FITC (MAb) específicos da molécula costimulatória. As áreas a sombreado são a intensidade da fluorescência da MAb específica enquanto que as áreas não sombreadas são a intensidade da fluorescência do anticorpo de controle do isótopo adequado (ver Materiais e Processos).

Figuras 24A e 24B. Efeito das moléculas costimulatórias múltiplas na proliferação das células T. As células T de murina ingênuas, na presença de concentrações variáveis de Com A de modo a proporcionarem um primeiro sinal, foram alvo de uma cultura em simultâneo com células de estimulador de MC38 infectadas ou com vectores de vaccinia recombinada (Figura 24A) ou com pox de aviário recombinada (Figura 24B). Os vectores recombinados eram de um tipo selvagem (isto é, V-Wyeth ou WT-FP [quadrados abertos]), rV-B7-1 (Figura 25B), rV-ICAM-1 ou rF-ICAM-1 (círculos fechados), rV-B7-1 ou rF-B7-1 (losangos fechados) e rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3 ou rF-CEA/B7-1/ICAM-1/LFA-3 (quadrados fechados). As células de MC 38 não

infectadas são círculos abertos. O teste de proliferação encontra-se descrito em Materiais e Processos.

Figuras 25A a 25D. A especificidade da costimulação atribuída através dos vírus de vaccinia recombinados. As células T na presença de Com. A, foram alvo de uma cultura em simultâneo com as células de estimulador MC38 infectadas com V-Wyeth (Figura 25A), rV-B7-1 (Figura 25B), rV-ICAM-1 (Figura 25C), e rV-LFA-3 (Figura 25D), de acordo com o indicado através de círculos abertos. As células de estimulador infectadas na presença de MAb encontram-se assinaladas como círculos fechados e o anticorpo de controlo dos isótopos encontra-se assinalado por triângulos fechados.

Figura 26. A capacidade relativa de B7-1, ICAM-1, LFA-3 e a expressão em simultâneo de todas as três moléculas costimulatórias de modo a darem origem ao segundo sinal para a proliferação das células T. Na presença de Com A (2,5 μ g/ml), 100 000 células T foram alvo de uma cultura simultânea com 10 000 células MC38. As células de estimulador MC38 que exprimem uma ou todas as moléculas costimulatórias foram adicionadas aos recipientes em várias percentagens em combinação com células de estimulador infectadas com V-Wyeth até um total de 10^4 MC38 células/recipiente. As células MC38 foram infectadas com V-Wyeth (quadrados abertos), rV-LFA-3 (triângulos fechados), rV-ICAM-1 (círculos fechados), rV-B7-1 (losangos fechados) e rV-B7-1-ICAM-1-LFA-3 (quadrados fechados). As células foram mantidas numa cultura em simultâneo durante 48 horas. Durante as 18 horas finais foi adicionada ^3H -Tirimidina para medir a proliferação de células T. O quadro indica os valores de proliferação obtidos a

partir de uma cultura em que 3% das células de estimulador de MC38 foram infectadas com os vectores ilustrados. Deste modo, na presente experiência, a relação final entre as células de estimulador e as células T era de 0,003. Note-se o efeito relativamente fraco do rVB7,1/ICAM sob estas condições de acordo com o comparado com rV-B7/ICAM/LFA-3.

Figuras 27A a 27D. Efeito da costimulação nas populações específicas de células T. As células T de murina CD4⁺ (Figura 27A) ou CD8⁺ foram postas em cultura simultânea com células MC38 não infectadas (círculo aberto) ou as células infectadas com V-Wyeth (quadrados abertos), rV-LFA-3 (triângulos fechados), rV-ICAM-1 (círculos fechados), rV-B7-1 (losangos fechados) e rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3 (quadrados fechados) com uma relação de 10:1 durante 48 horas na presença de várias concentrações de Com A. Durante as 18 horas finais foi adicionada ³H-Tirimidina para medir a proliferação de células T. As Figuras 27C e 27D ilustram as respostas de proliferação das células purificadas de CD4⁺ e de CD8⁺, respectivamente, quando alvo de uma cultura em simultâneo na presença das células de estimulador MC38 infectadas por vector na uma baixa concentração de Com A (0,625 µg/ml).

Figuras de 28A a 28D. Efeito da estimulação em simultâneo na produção de citocina. As células T de murina CD4⁺ (Figuras 28A e 28C) ou CD8⁺ (Figuras 28B e 28D) foram purificadas de acordo com o descrito em Materiais e Processos e alvo de uma cultura em simultâneo com as células de estimulador infectadas com vector MC38 durante 24 horas na presença de 2,5 µg/ml de Com A. Os fluidos sobrenadantes foram analisados

para a produção de IL-2 (Figuras 28A e 28B) e IFN- γ (Figuras 28C e 28D) através de captação por ELISA.

Figuras de 29A a 29C. Efeito da estimulação em simultâneo na expressão da citocina do RNA. Figura 29A; células T de murina CD4⁺ ou CD8⁺ foram postas em cultura simultânea com células de estimulador MC38 infectadas com V-Wyeth (caminho A), rV-B7-1 (caminho B), rV-ICAM-1 (caminho C), rV-LFA-3 (caminho D), ou rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3 (caminho E) com uma relação de 10:1 entre as células T e as células de estimulador durante 24 horas na presença 2,5 μ g/ml de Com A. A seguir à cultura, o RNA das células T foi analisado através de uma análise de protecção de RNase de amostras múltiplas. A representação quantitativa dos resultados da auto radiografia encontra-se normalizada para a expressão do gene hospedeiro L32 na Figura 29B (células CD4⁺) e na Figura 29C (células CD8⁺). A ordem das barras do histograma (da esquerda para a direita) é de MC38/V-Wyeth MC38/B7-1, MC38/CAM-1, MC38/LFA-3 e MC38B7-1/ICAM-1/LFA-3.

Figura 30. Ratos C57BL/6 (5 por grupo) receberam administrações de HBSS (quadrados fechados) ou foram vacinados com 10⁷ pfu rV-CEA (triângulos fechados) ou rV-CEA/TRICOM (círculo fechado). Cem dias mais tarde os ratos receberam uma inoculação com 1 x 10⁶MC38 células de carcinoma que exprimem a CEA e a sobrevida foi vigiada. Todos os ratos com excepção dos do grupo rV-CEA/TRICOM desenvolveram tumores que excediam os 20 mm em comprimento ou em largura, ou quando os ratos estavam moribundos. Figura 30; numa segunda experiência, os ratos C57BL/6 foram vacinados com 10⁷ pfu rV-CEA, com rV-CEAB7,1, com rV-CEA/TRICOM ou com tampão HBSS. As

respostas linfoproliferativas foram células T de antraz sujeitas a estudo foram analisadas 22 dias após a vacinação. Os valores representam o índice de estimulação do cpm médio dos mesmos em relação à média. O desvio padrão nunca excedeu 10%. Os antígenos usados foram Com A (5 µg/ml), CEA (100 µg/ml) e a ovalbumina (100 µg/ml)

Figura 31. Ilustra um esquema de um teste costimulatório in vitro de células dendriticas.

As Figuras 32A e 32B ilustram a resposta de proliferação das células T da CD4⁺ ingénua (Figura 33A) ou da CD8⁺ ingénua (Figura 33B) estimulada com DCs de progenitor infectadas com rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3 ou DCs infectados com rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3 ou V.Wyeth (grupo de controlo).

A Figura 34 ilustra a reacção mista do linfócito (MLR) dos esplenócitos de Balb/C em contraste com as células dendriticas C57bl/6 infectadas com 25 MOI de V-Wyeth ou V-TRICOM. ³H-timidina introduzida no dia 3, colheita no dia 4, DC (não infectada), DC (infectada com V-Wyeth), DC(infectada com rV-TRICOM).

A Figura 35 ilustra a resposta de proliferação das células T do respondedor (CAP-M8 específico das células T para o péptido CEA 8) a várias relações de APC colhidas no dia 5 após a estimulação com as DCs impulsionadas com o péptido infectadas com rV-TRICOM e descansou durante 2 dias com 2 u/ml (não é necessário APC ou péptido). Péptido 8-(EAQNTTY) no teste com uma concentração final de 1 µg/ml. ³H-timidina adicionada no dia 2, as células T recolhidas no dia 3.

0=(DC(v-Wyeth)-pep e □=DC(rV-TRICOM) os resultados do péptido encontram-se na linha de base.

Figuras 36A e 36B. Eficácia da infecção de poxvírus das células dendríticas (DC) da murina. As DC foram infectadas com 25 MOI rV-TRICOM ou com 50 MOI rF CEA/TRICOM durante 5 horas. As DC infectadas com vectores TRICOM apresentam uma capacidade aumentada para estimular as células T ingénuas. Todas as populações de DC foram alvo de uma cultura em simultâneo durante 48h com as células T a uma relação de 10:1 na presença de distintas concentrações de Com A para proporcionarem o sinal -1. ³H-timidina foi adicionada durante as 18 h finais. Figura 36A: DC não afectadas (quadrados fechados) DC com infecção falsa (losangos falsos) ou DC infectadas com V-WT (triângulos fechados invertidos), rV-B7.1 (triângulos abertos) ou rV-TRICOM (círculos abertos). Figura 36B: DC (quadrados fechados) DC com infecção falsa (losangos falsos) ou DC infectadas com V-WT (triângulos fechados invertidos), rV-B7.1 (triângulos abertos) ou rV-TRICOM (círculos abertos).

Figuras 37A a 37F. Actividade aloestimulatória aumentada por DC infectadas com vaccínia (Figuras 37 A, C, E) ou vectores de pox de aviário (Figuras 37 B, D, F). As DC não infectadas (losangos fechados) ou as DC infectadas com um certo tipo de vectores de pox de aviário selvagem (V.WT ou F-WT, triângulos invertidos fechados), rV-B7.2 ou rF-B7 (triângulos abertos) ou rV-TRICOM ou rF-TRICOM (círculos abertos) foram alvo de uma cultura em simultâneo com células T alogénicas (Figuras 37A-D) ou sinegénicas (Figuras 37E-F) durante 5 dias. A ³H-timidina foi adicionada durante as 18 h finais.

Figuras 38A a 38F. Efeito da infecção de vaccínia das DC na proliferação de células T específicas de péptido. As células DC não infectadas (quadrados fechados) DC com infecção falsa (losangos falsos) ou DC infectadas com V-WT (triângulos fechados invertidos), rV-B7.1 (triângulos abertos) ou rV-TRICOM (círculos abertos) foram alvo de uma cultura em simultâneo com células T específicas de péptido OVA (Figuras 38 A, C, E) ou com as células T específicas de péptido CAP-M8 (Figuras 38 B, D, F). As condições experimentais incluíram um rácio de célula estimulador fixa de 10:1 na presença de várias concentrações dos péptidos apropriados (Figura 38 A-D), de péptidos de controlo negativo (quadrados abertos quer VSVN (Figura 38A) ou FLU-NP (Figura 38B), ou como uma concentração fixa de péptido de 1 μ M na presença de vários rácios de estimulador (Figuras 38E e F).

Figuras 39A e 39B. O efeito da infecção de rV-TRICOM com DC amadureceu com TNF- α ou com CD40. A DC (quadrados fechados) ou as DC em cultura ou com 100 ng/ml de TNF- α (triângulos abertos) ou com 5 μ g/ml de CD40 mAb (círculos abertos) para as últimas 24 horas de cultura foram usados para estimular o resultado específico das células T CAP-M8 (Figura 38A). A proliferação das células T CAP-M8 como resposta a estas populações de DC após a infecção com 25 MOI rV-TRICOM (Figura 39B). Para todos os painéis, a relação de células T DC era de 10:1 enquanto que a concentração de péptido de CAP-M8 era de 1 μ g/ml. Os círculos fechados indicam a proliferação de células T CAP-M8 estimuladas com todas as populações de DC na presença de um péptido de VSVN de 1 μ g/ml.

Figuras 40A a 40H. Efeito da infecção com vaccínia das DC aquando da indução da actividade CTL. As DC (Figura 40b) ou as DC infectadas com V-WT (Figura 40C), ou rV-TRICOM (Figura 40D) foram impulsionadas com 10^{-6} M OVA de péptido durante 2 horas. As populações de CD foram administradas de um modo intravenoso aos ratos (1×10^5 células/rato). Os ratos do grupo de controlo foram imunizados de um modo subcutâneo com 100 μ g de péptido OVA em adjuvante Ribi/Detox (Figura 40A). Catorze dias mais tarde os folículos foram colhidos e estimulados de novo durante 6 dias com o péptido correspondente, sendo avaliada a sua capacidade lítica quando comparada com as células EL-4 impulsionadas ou com péptidos OVA (quadrados fechados) ou com péptidos VSVN (quadrados abertos). Os números ilustram a actividade CTL da forma como a mesma se encontra expressa em unidades líticas. Encontra-se também ilustrado o efeito da infecção com vaccínia nas DC aquando da indução da actividade CTL. As DC (Figura 40F) ou as DC infectadas com V-WT (Figura 40G) ou rV-TRICOM (Figura 40H) foram impulsionadas com 10^{-6} M CAP-M8 de péptido durante 2 h. As populações de CD foram administradas de um modo intravenoso aos ratos (1×10^5 células/rato). Os ratos do grupo de controlo foram imunizados de um modo subcutâneo com 100 μ g de péptido OVA em adjuvante Ribi/Detox (Figura 40A). Catorze dias mais tarde os folículos foram colhidos e estimulados de novo durante 6 dias com o péptido correspondente, sendo avaliada a sua capacidade lítica quando comparada com as células EL-4 impulsionadas ou com péptidos OVA (quadrados fechados) ou com péptidos VSVN (quadrados abertos). Os números ilustram a actividade CTL da forma como a mesma se encontra expressa em unidades líticas.

Figuras 41A a 41C. Efeito das imunizações múltiplas com DC infectadas com vaccinia na actividade CTL. DC (quadrados fechados), ou DC infectadas com V-WT (triângulos invertidos fechados) ou rV-TRICOM (círculos abertos) foram impulsionados com 10 μ M CAP-M8 de péptido durante 2 h. As populações de CD foram administradas de um modo intravenoso aos ratos (1×10^5 células/rato) 1, 2 ou 3 vezes em intervalos de 7 dias. Os ratos do grupo de controlo foram imunizados de um modo subcutâneo com 100 μ g de péptido CAP-M8 em adjuvante Ribi/Detox (cruzes). Catorze dias mais tarde os folículos foram colhidos e estimulados de novo durante 6 dias com o CAP-M8, sendo avaliada a sua capacidade lítica quando comparada com as células EL-4 impulsionadas com CAP-M8 ou com péptido de controlo VSVN (não ilustrado).

Figuras 42A e 42B. Efeito dos esplenócitos infectados com TRICOM da vaccinia e da pox de aviário na proliferação das células T. As células T de murina ingénua foram cultivadas em simultâneo com esplenócitos autologos infectados ou com vaccinia recombinada ou com vectores de pox de aviário. A cultura em simultâneo foi efectuada com condições variáveis de Com A como Sinal 1. Os vectores recombinados eram do tipo selvagem (isto é, V-WT, FP-WT, losango aberto), rV-B7-1 ou rF-B7-1 (círculos abertos) ou rV-TRICOM ou rF-TRICOM (quadrados fechados). Os esplenócitos não infectados encontram-se indicados como triângulos abertos.

Figuras 43A a 43D. Efeito dos esplenócitos infectados com o vector TRICOM em células T alogénicas. As células T ingénuas Balb/C foram alvo de uma cultura em simultâneo com C578 1/6 esplenócitos infectados com vaccinia recombinada (Figura 43A e C) ou vectores de pox de aviário (Figuras 43B e D) por 2

dias (Figuras 43A e B) ou por 5 dias (Figura 43C e 43D). Os vectores recombinados eram V-WT ou FP-WT, em formato de losango aberto, rV-B7-1 ou rF-B7-1 (círculos abertos) ou rV-TRICOM ou rF-TRICOM (quadrados fechados). Os esplenócitos não infectados encontram-se indicados como triângulos abertos. A proliferação induzida pelas DC é indicada como quadrados fechados.

Figuras de 44A a 44F. Efeito dos esplenócitos infectados com rV-TRICOM em populações específicas de células T. As células T de murina ingênua foram fraccionadas com sub populações de CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺. As células T foram alvo de uma cultura em simultâneo quer com BMDC autologas não infectadas ou com esplenócitos infectados com vectores de vaccinia recombinados. A variação nas concentrações de Con A (Figuras 44A-C) ou a variação no número de células de estimulador (Figuras 44D-F) proporcionaram o primeiro sinal. A proliferação de células T como resposta ao BMDC maduro encontra-se indicada como quadrados abertos e os esplenócitos não infectados encontram-se indicados como triângulos abertos. Os vectores recombinados eram de um tipo selvagem (V-WT, losangos abertos) ou rV-TRICOM (quadrados fechados).

Figuras 45A a 45F. Efeito das células de espinal medula infectadas com rV-TRICOM em populações específicas de células T. As células T de murina ingênua foram fraccionadas com sub populações de CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺. As células T foram alvo de uma cultura em simultâneo quer com BMDC autologas não infectadas ou com esplenócitos infectados com vectores de vaccinia recombinados. A variação nas concentrações de Con A (Figuras 45A-C) ou a variação no número de células de

estimulador (Figuras 45D-F) proporcionaram o primeiro sinal. A proliferação de células T como resposta ao BMDC maduro encontra-se indicada como quadrados abertos e os esplenócitos não infectados encontram-se indicados como triângulos abertos. Os vectores recombinados eram de um tipo selvagem (V-WT, losangos abertos) ou rV-TRICOM (quadrados fechados).

Figuras 46A a 46D. Efeito dos esplenócitos infectados com rV-TRICOM nas células de espinal medula (BM) nas células T de memória $CD8^+$ específicas de péptidos. As células T específicas de CAP-M8 foram alvo de uma cultura em simultâneo com esplenócitos autólogos (Figuras 46A e B) ou com as células da espinal medula (Figuras 46C e D) infectadas com vectores de vaccinia recombinados. A análise foi efectuada usando dois conjuntos de condições: a) uma relação fixa de 10:1 de células de estimulador recombinadas que foram alvo de uma cultura na presença de várias concentrações de péptido CAP-M8 (Figuras 46A e 46C) ou b) uma concentração fixa de péptido (1 μ M) a várias relações de estimulador de resposta (Figuras 46B e 46D). Os vectores recombinados eram do tipo selvagem (losangos abertos) e rV-TRICOM (quadrados fechados). Os esplenócitos não infectados encontram-se ilustrados como sendo triângulos abertos. Os BM encontram-se ilustrados como sendo quadrados abertos.

Figura 49. Ilustra a produção de IFN- γ por parte das células T humanas isoladas do PBMC usando células dendríticas humanas infectadas com rF-TRICOM impulsionada com péptido da Gripe 58-66.

Figura 50. Ilustra a produção de IFN- γ por parte das células T humanas isoladas do PBMC usando células dendríticas humanas infectadas com rF-TRICOM ou com rF-B7.1 impulsionada com péptido da Gripe 58-66 em várias relações de efeitos APC.

Figura 51. Ilustra a produção de IFN- γ por parte das células T humanas do dador 868 usando células dendríticas humanas infectadas com rF-TRICOM ou com rF-B7.1 impulsionada com péptido HPV (11-20) após uma ou duas simulações in vitro (IVS).

Figura 52. Ilustra a produção de IFN- γ por parte das células T humanas usando células dendríticas humanas infectadas com rF-TRICOM ou com rF-B7.1 impulsionada com péptido HPV (11-20).

Figura 53. Ilustra a produção de IFN- γ por parte das células T humanas usando células dendríticas humanas infectadas com rF-TRICOM ou com rF-B7.1 impulsionada com péptido HPV (11-20) a várias concentrações.

Figura 54. Ilustra a produção de IFN- γ por parte das células T humanas usando células dendríticas humanas infectadas com rF-TRICOM ou com rF-B7.1 impulsionada com péptido HPV E7 11-20 a várias relações de efeitos de APC.

Descrição Detalhada da Invenção

Apresente invenção é um vector recombinado que compreende genes estranhos que codificam três moléculas de estimulação

simultânea em combinação, ou as porções funcionalmente activas de cada molécula costimulatória.

De acordo com a forma aqui usada uma porção funcionalmente activa é uma porção da molécula que é responsável pela ligação ao seu ligante respectivo, desencadeando um sinal costimulatório adequado para a activação das células imunes. Um processo para a determinação da actividade funcional é o acesso à indução de proliferação de células T ingénuas distribuindo a molécula costimulatória a uma célula alvo em vitro de acordo com o aqui descrito. Uma porção funcional da molécula costimulatória estimula um aumento de pelo menos 20% na proliferação de células T.

O termo gene estranho ou sequência de ácido nucleico estranha ou uma porção funcional dos mesmos da forma aqui usada é um gene, uma sequência de ácido nucleico ou uma sua porção funcional que é proporcionada de um modo exógeno por um vector recombinado de modo a albergar uma célula ou um organismo. O gene estranho ou uma sua porção que é fornecido à célula hospedeira ou ao organismo hospedeiro pode ser uma que não se encontre presente de um modo endógeno na célula ou no organismo hospedeiro ou de pode estar presente de um modo endógeno e ser funcional ou não funcional. No caso em que um gene endógeno funcional se encontra presente na célula hospedeira ou no organismo hospedeiro, o gene estranho ou fornecido pelo exterior ou uma porção funcional do mesmo tem como resultado uma expressão excessiva do produto do gene.

Os vectores recombinados da presente invenção são úteis para proporcionarem uma resposta imunológica aumentada às células

do sistema imunológico incluindo de um modo não limitativo os T linfócitos, os B linfócitos, as células NK, as células que apresentam antígenos (APCs) e afins. O aumento da resposta imunológica usando os vectores recombinados que exprimem três moléculas costimulatórias é sinérgico quando comparado com o uso de uma única molécula costimulatória ou com o uso de duas moléculas costimulatórias no aumento das respostas imunológicas. A resposta imunológica pode ser uma resposta imunológica humoral e/ou celular e pode ser direccionada a um antígeno alvo específico ou a um seu epítopo ou pode ser um efeito de aumento ou de regulação imunológico generalizado como o demonstrado pela libertação aumentada da citocina, pelo aumento na proliferação pelas células imunológicas, pela capacidade aumentada de resposta do agente mitogénico e afins. O aumento de uma resposta de imunidade inclui de preferência a hiper estimulação ou a estimulação das células T com elevada intensidade (HITS) como um resultado da estimulação usando vectores de recombinação de acordo com a presente invenção ou células transfectadas, transduzidas ou induzidas pelo vector recombinado de acordo com a presente invenção.

Os genes estranhos que codificam as moléculas costimulatórias podem ser obtidos a partir de uma pluralidade de origens. A escolha da origem dos genes estranhos que codificam as moléculas costimulatórias pode depender das espécies que vão ser imunizadas ou tratadas usando o vector recombinante.

Os genes estranhos que codificam as moléculas costimulatórias podem ser derivados da murina, derivados dos seres humanos, derivados dos símios, e podem ser sintetizados quimicamente

com base nos genes dos mamíferos. OS genes estranhos que codificam as moléculas costimulatorias podem ser ainda derivados aviários ou sintetizados quimicamente com base nos genes de moléculas costimulatórias aviárias. Os vectores recombinados da presente invenção são úteis como genes imunológicos e como vacinas na estimulação de um aumento de uma resposta imunológica às células alvo, aos antígenos alvo e aos seus epitopes imunológicos. Um tal nível de aumento de uma resposta imunológica usando os presentes vectores recombinados compreendendo genes que codificam três moléculas costimulatórias não pôde ser obtido usando uma molécula costimulatória simples ou dupla.

Os genes ou as suas porções funcionais que codificam as moléculas costimulatórias são úteis na presente invenção e incluem, de um modo não limitativo, B7.1, B7.2, ICAM-1, 4-1BBL; B7.1, ou B7.2, ICAM-1, LFA-3, 4-1BBL; CD59, VCAM-1; e B7.1 ou B7.2, CD59, CD40, 4-1BBL, CD70 e VCAM-1, B7.1 ou B7.2, OX-40L, 4-1BBL; e afins dependendo da resposta imunológica desejada e da doença ou da condição a ser tratada. Com base na resposta imunológica sinérgica dramática conseguida usando um vector recombinado que codifica uma ou duas moléculas costimulatórias, um vector recombinado codifica quatro, cinco ou mais moléculas costimulatórias que irão resultar numa resposta imunológica sinérgica ou numa resposta imunológica igual a/superior a que usa um vector recombinado que codifica três moléculas costimulatórias.

B7 representa uma família de moléculas costimulatórias que são membros da super família de genes lg. Os membros incluem

a murina B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86), B7.1 e B7.2 e são ligantes naturais de CD28/CTLA-4 (CD152). A sequência de genes da murina B7.1 é revelada em Freeman e outros (J. Immunol. 143: 2714-2722, 1989) e em GENBANK sob o número de acesso X60958. A sequência de genes da murina B7.2 encontra-se revelada em Azuma e outros (Nature 366: 76-79, 1993) e em GENBANK sob o número de acesso L25606 e MUSB72X.

Os homólogos humanos das moléculas costimulatórias da murina e as suas porções funcionais encontram-se dentro do âmbito da presente invenção e apresentam uma utilidade em particular nos vectores recombinados para o uso clínico humano. O homólogo humano das moléculas costimulatórias da murina B7 incluem CD80, o homólogo da murina B7.1 e CD86, o homólogo de B7.2. A sequência de genes dos humanos B7.1 (CD80) encontra-se revelada em GENBANK sob o número de acesso M27533, e a sequência de genes dos humanos B7.2 (CD86) é revelada pelo número de acesso U04343 e AF099105. Pode ser requerida uma licença para pôr a presente invenção na prática.

Para o uso na presente invenção, um vector recombinado pode conter uma sequência de ácidos nucleicos estranha que codifica a molécula da família de moléculas costimulatórias B7, ou uma combinação de moléculas costimulatórias B7 ou suas porções funcionais para além das outras moléculas constituintes. A combinação de moléculas costimulatórias B7 inclui, de um modo não limitativo, duas ou mais moléculas B7.1, duas ou mais moléculas B7.2, B7.1 e B7.2 e afins. Numa das formas de realização o vector recombinado contém uma sequência de ácidos nucleicos estranha que codifica a

molécula B7.1 em combinação com sequências de ácidos nucleicos que codificam LFA-3 e ICAM-1.

A molécula de adesão intracelular 1 (murina ICAM-1, CD54) e o homólogo humano, CD54, actua também como uma molécula costimulatória. O seu ligante é um antigénio associado com a função de leucócito 1 (LFA-1, CD11 a/CD18) que se encontra expressa na superfície de linfócitos e de granulócitos. O gene para a murina ICAM-1 encontra-se revelado em GENBank sob o número de acesso J03132. Numa forma de realização, o vector recombinado pode da presente invenção contém uma sequência de ácidos nucleicos estranha que codifica pelo menos uma molécula de murina ICAM-1, homólogo humano, outro homólogo mamífero ou suas porções funcionais para além das sequências de ácidos nucleicos estranhas que codificam duas ou mais moléculas costimulatórias adicionais.

O antigénio de função de leucócito da molécula costimulatória 3, a murina LFA-3 e o seu homólogo humano LFA-3 (CD58), uma glicoproteína de glicosil-fosfatidilo inositol ligada, é um membro da família CD2 dentro da super família dos genes da imunoglobulina. O ligante natural da LFA-3 é o CD2 (LFA-2) que se encontra expresso em timócitos, em células T, em células B e em células NK. O gene da murina LFA-3 encontra-se revelado em GenBank sob o número de acesso X53526 e o gene para o homólogo humano revelado no número de acesso Y00636.

O antigénio da célula T 4-1BBL é uma molécula costimulatória que transmite sinais costimulatórios em culturas de células T estimuladas por antigénios e em activação impulsionada por lectina dos timócitos (Hurtado, J.C. e outros J. Immunol.

158(6): 2600-2609, 1997). 4-1BBL pertence ao factor de necrose do tumor da super família do receptor, um grupo de moléculas de superfície das células ricas em cisteína (Vinay, D.S. e outros, *Seminars in Immunology*, 1998, Vol. 10, pp. 481-489). O gene da murina 4-1BBL encontra-se revelado em GenBank sob o número de acesso U02567. O gene para o homólogo humano, hu4-1BBL encontra-se relevado em GenBank sob o número de acesso U03397.

OX-40L é uma proteína de membrana do tipo II com uma analogia limitada em relação ao TNF e ser estimuladora em relação às células OX-40⁺ in vitro. A murina e a humana OX-40L cDNAs apresentam uma analogia de 68% ao nível nucleotidio e de 46% ao nível de aminoácido. O OX-40L humano estimula exclusivamente as células T humanas enquanto que a OX-40L de murina estimula tanto as células T humanas como as dos ratos. APC exprime OX-40L e pode transmitir o OX-40L: o sinal é OS40R durante a apresentação de antígenos às células T CD4⁺. A sinalização de OX-40L é importante para a diferenciação das células dendriticas humanas e leva a uma produção acrescida de IL-12, de TNF- α , IL-1B e IL-6 (Weinberg, A.D. e outros 1998 *Seminars in Immunology*, Vol. 10: 471-480). OX-40L é uma potente molécula costimulatória para prender as respostas de células T CD4⁺ primárias, usadas em combinação com B7-1 (Granaglia, I. e outros 1988 *J. Immunology*, Vol. 161: 6510-7).

Os vectores que são úteis na presente invenção são capazes de provocar a expressão de pelo menos três ou mais genes estranhos, de preferência de cinco ou mais genes estranhos. Os vectores úteis na presente invenção incluem qualquer vector que seja capaz de provocar a expressão funcional de

três produtos de genes de moléculas costimulatórias no interior de uma célula hospedeira. Para além dos genes que codificam três moléculas costimulatórias, o vector é ainda capaz de provocar a expressão de pelo menos um gene estranho que codifica pelo menos um antigénio alvo ou um seu epitope imunológico assim como um marcador que pode ser seleccionado.

Os vectores de acordo com a presente invenção incluem, de um modo não limitativo, os vectores bacterianos como sejam a *Salmonella*, os vectores virais, vectores baseados em ácidos nucleicos e afins. Os vectores virais incluem, de um modo não limitativo, o poxvírus, o vírus da Herpes, o adenovírus, o alfavírus, o retrovírus, o picornavírus, o iridovírus, e afins: os poxvírus que são úteis na presente invenção incluem os vectores de replicação e de não replicação. Tais poxvírus incluem, de um modo não limitativo, o ortopox como seja a vaccinia, o pox de esquilo, o pox de coelho e afins, a avipox, a suipox, a capripox e afins. Os poxvírus podem ser seleccionados de entre o grupo que consiste por vaccinia-Copenhague, vaccinia da estripe Wyeth, vaccinia da estripe MVA, NYVAC, pox de aviário, TOVAC, pox dos canários, ALVAC, pox suína, e afins. Numa forma de realização o vector recombinado é um vírus de vaccinia. Numa outra forma de realização o vector recombinado é um pox de aviário.

Um vector preferido da presente invenção é um vírus recombinado, de preferência um poxvírus. Os poxvírus que são úteis na presente invenção apresentam vários atributos, incluindo (i) a distribuição eficaz dos genes para os três tipos de células, incluindo o APC e as células de tumores; (ii) elevados níveis de expressão de proteínas; (iii) a

apresentação óptima de antígenos ao sistema imunitário; (iv) a capacidade de obter respostas imunitárias mediadas pelas células assim como respostas de anticorpos; (v) a modificação genética das células, provisória ao invés de permanente, e (vi) a capacidade para usar combinações de poxvírus dos diferentes géneros pois não são reactivos entre si sob o ponto de vista imunológico. Os poxvírus parentais úteis na construção dos poxvírus recombinados de acordo com a presente invenção incluem, de um modo não limitativo, o vírus ortopox como seja o vírus de vaccinia replicado (Perkus e outros Science 229: 981-984, 1985; Kaufman e outros Int. J. Cancer 48: 900-907, 1991; Moss Science 252: 1662, 1991), os vírus de vaccinia muito atenuados como sejam o MVA, a vaccinia modificada Ankara (Sutter e Moss, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 89: 10847-10851; Sutter e outros Virology 1994), vaccinia Copenhagen e NYVAC: poxvírus das aves (15) como sejam os vírus da pox de aviário (15), o poxvírus dos canários, como sejam o ALVAC e afins (Baxby e Paoletti, Vaccine 10: 8-9, 1992; Rinns, M.M. e outros (Eds) Recombinant Poxviruses CRC Press, Inc., Boca Raton 1992; Paoletti, E. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93: 11349-11353, 1996) e poxvírus dos suínos, poxvírus dos caprinos e afins.

Numa forma de realização o poxvírus parental é um vírus de vaccinia. Numa forma de realização em particular, o vírus da vaccinia é uma estirpe Wyeth ou um seu derivado. Um derivado da estirpe Wyeth inclui, de um modo não limitativo vTBC33 a que falta um gene funcional K1L e afim. Numa outra forma de realização, o vírus é Dry-Vax, disponível como vacina da varíola nos Centros de Controlo das Doenças, Atlanta, GA. Numa outra forma de realização, o poxvírus parental é uma

estirpe da pox de aviário, por exemplo POXVAC-TC (Schering-Plough Corporation), e afins.

O vector recombinado da presente invenção tem a capacidade de infectar, de transferir ou de transduzir as células hospedeiras num hospedeiro. O hospedeiro inclui, de um modo não limitativo, os mamíferos, os pássaros, os peixes e afins. As células hospedeiras são quaisquer células que podem ser sujeitas a infecção, a transfecção ou a transdução por parte do vector recombinado e que é capaz de exprimir os genes estranhos do vector recombinado a níveis funcionais. As células hospedeiras incluem, de um modo não limitativo, o APC profissional e as células de precursor que apresentam antigénios como sejam os monócitos, os macrófagos, as DC, as células de Langerhans e afins. O vector recombinado de acordo com a presente invenção pode ainda infectar as células do tumor ou outros tipos de células como sejam os fibroblastomas ou as células de músculos. A infecção das células hospedeiras permite a molécula costimulatória exógena estranha e a expressão da sequência de ácidos nucleicos estranhos que codificam os antigénios alvo caso estes se encontrem presentes no vector recombinado. As células hospedeiras exprimem, ou são trabalhadas de modo a exprimirem, as moléculas adequadas MHC (HLA) de Classe I ou II para a apresentação dos antigénios adequada para as células CD4⁺ e/ou CD8⁺. Deste modo, qualquer célula de mamífero pode ser trabalhada de modo a tornar-se num antigénio adequado apresentando células que exprimem três moléculas costimulatórias.

O vector recombinado de acordo com a presente invenção compreende pelo menos um elemento de controlo da expressão que se encontra ligado de um modo operacional à sequência de ácido nucleico. Os elementos de controlo da expressão são inseridos no vector de modo a controlarem e a regular a expressão da sequência de ácido nucleico (Ausubel e outros, 1987, em "Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Nova Iorque, Nova Iorque). A expressão dos elementos de controlo é conhecida na técnica e inclui os promotores. Os promotores são úteis na presente invenção são os promotores de poxvirus conhecidos na técnica que incluem, de um modo não limitativo, o 30K, o 13, o sE/L, o 7.5K, o 40K, o C1 e afins. A sequência de ácidos nucleicos do promotor 30k encontra-se revelada no Acesso GenBank nº M35027, com os números de base de 28 012 a 28 423 (sentido contrário). A sequência de ácido nucleico de 13 encontra-se revelada no Acesso GenBank nº J03399 com os números de base de 1 100 a 1 301 (sentido contrário). A sequência de ácidos nucleicos do promotor 7,5k encontra-se revelada no Acesso GenBank nº M35027, com os números de base de 186 550 a 186 680 (sentido contrário).

O promotor 40K encontra-se revelado em GENBANK sob o número de acesso M13209 com os números de base de 9700 a 9858 (antimessageiro). A sequência de ácido nucleico do promotor C1 encontra-se revelada em GENBANK sob o número de acesso M59027 com os números de base de 1 a 242, e na Patente dos Estados Unidos nº 5 093 258. A sequência do promotor sE/L encontra-se revelada na Referência 16. Podem ser usados outros promotores de poxvirus como sejam, por exemplo, os revelados por Davison e Moss (J. Mol. Biol. 210: 749-769

(1989). Qualquer um destes promotores pode ser sintetizado usando os processos habituais da técnica.

A sequência de ácidos nucleicos depende da sua temporização e do seu nível de expressão. Os promotores precoces ou os promotores precoces/demorados são os preferidos. Numa forma de realização preferencial, o promotor ou a combinação de promotores usados permitem a expressão óptima de cada molécula costimulatória num hospedeiro infectado de modo a proporcionar uma resposta imunológica sinérgica. Numa forma de realização preferencial, cada um dos genes estranhos que codificam uma molécula costimulatória é controlado por um promotor separado e distinto.

No caso dos vectores nucleicos de base ácida, as estruturas podem ser ou ácido nucleico (DNA ou RNA) ou estar associados com/ou encapsulados num transportador de lípidos. De um modo opcional, o transportador de lípidos e/ou a estrutura podem proporcionar a sinalização e/ou a expressão de uma célula alvo em particular ou o respectivo plural. Os vectores simples de DNA podem ser preparados através dos processos descritos na Patente dos Estados Unidos nº 5 827 703. Para a região de início da transcrição, ou elemento promotor, qualquer região pode ser usada desde que proporcione o nível desejado de transcrição da sequência de DNA que interesse. O início da transcrição pode ser uma região nativa ou homóloga em relação à célula hospedeira ou em relação ao DNA que vai ser transcrito, ou que seja estranho ou externo à célula hospedeira e/ou à sequência de DNA a ser transcrita. Os elementos promotores eficazes para a transcrição do início do DNA simples incluem, de um modo não limitativo, o promotor

premature SV40 (vírus dos macacos 40, o promotor RSV (Rous sarcoma vírus) o principal promotor de adenovírus, o CMV humano (cytomegalovirus) sendo este um promotor I precoce imediato, e afins. Os vectores com base em ácidos nucleicos podem ser entregues a um hospedeiro usando uma seringa, um cateter ou um dispositivo de injeção sem agulha, como seja uma pistola de genes.

Numa forma de realização da presente invenção é fornecido um vector recombinado que compreende uma sequência de ácido nucleico estranha que codifica uma primeira molécula costimulatória ou uma porção funcional da mesma sobre o controlo de um primeiro promotor, uma sequência de ácido nucleico que codifica uma segunda molécula costimulatória ou uma porção funcional da mesma sob o controlo de um segundo promotor e de uma sequência de ácido nucleico estranha que codifica uma terceira molécula costimulatória ou uma porção funcional da mesma sob o controlo de um terceiro promotor. O vector recombinado pode ainda proporcionar uma sequência de ácido nucleico estranha que codifica um antigeneo ou uma porção imunológica do mesmo sob o controlo de um quarto promotor.

Numa forma de realização da presente invenção é proporcionado um poxvirus recombinado que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica LFA-3 uma porção funcional do mesmo sob o controlo de um promotor de poxvirus 30K, uma sequência de ácido nucleico que codifica ICAM-1 uma porção funcional do mesmo sob o controlo de um promotor de poxvirus 13, e uma sequência de ácido nucleico que codifica B7,1 uma porção funcional do mesmo sob o controlo de um promotor de poxvirus

sE/L. um exemplo de uma tal estrutura de poxvírus recombinada é a vaccinia vT171 de acordo com o ilustrado na Figura 11A. O poxvírus recombinado pode ainda proporcionar uma sequência de ácido nucleico que codifica um antígeno associado a um tumor ou uma porção imunológica do mesmo. Uma forma de realização da invenção é a vaccinia recombinada vT172 de acordo com o ilustrado na Figura 4C.

Numa forma de realização da presente invenção é proporcionado um poxvirus recombinado que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica B7,1 sob o controlo de um promotor de poxvirus sE/L, uma sequência de ácido nucleico que codifica LFA-3 sob o controlo de um promotor de poxvirus 13, e uma sequência de ácido nucleico que codifica ICAM-1 ou uma porção do mesmo sob o controlo de um promotor de poxvirus 7,5K. De um modo opcional a estrutura compreende ainda uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos um antígeno alvo ou um epítipo imunológico do mesmo e/ou uma sequência de ácido nucleico que codifica um marcador que pode ser seleccionado. Uma forma de realização de uma tal estrutura de poxvírus recombinado é a vaccinia vT199 de acordo com o ilustrado na Figura 4B contendo um gene lacZ como o marcador que pode ser seleccionado.

Numa forma de realização da presente invenção um vírus de pox de aviário recombinado compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica B7,1 sob o controlo de um promotor de poxvirus sE/L, uma sequência de ácido nucleico que codifica LFA-3 sob o controlo de um promotor de poxvirus 13, e uma sequência de ácido nucleico que codifica ICAM-1 ou uma porção do mesmo sob o controlo de um promotor de poxvirus 7,5K. um exemplo desta forma de realização é o pox de aviário vT222 de

acordo com o ilustrado na Figura 4A. Um vírus de pox de aviário recombinado pode ainda compreender uma sequência de ácido nucleico que codifica um antígeno alvo, CEA, sob o controle do promotor de poxvirus 40K e uma sequência de ácido nucleico que codifica um marcador que pode ser selecionado, lacZ sob o controle do promotor de poxvirus C1. um exemplo desta forma de realização é o pox de aviário vT194 de acordo com o ilustrado na Figura 4B.

Numa outra forma de realização, um vírus de pox de aviário recombinado que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno associado ao tumor MUC-1 ou uma porção do mesmo sob o controle do promotor 40K, uma sequência de ácido nucleico que codifica LFA-3 uma porção funcional do mesmo sob o controle de um promotor de poxvirus 30K, uma sequência de ácido nucleico que codifica ICAM-1 uma porção funcional do mesmo sob o controle de um promotor de poxvirus 13, e uma sequência de ácido nucleico que codifica B7,1 uma porção funcional do mesmo sob o controle de um promotor de poxvirus sE/L. O vírus de pox de aviário pode compreender uma sequência de ácido nucleico que codifique qualquer antígeno associado a um tumor ou uma porção do mesmo e sequências de ácido nucleico que codifiquem LFA-3, ICAM-1 e B7,1 sob o controle de uma pluralidade de promotores como ilustrado na Figura 4D.

Uma outra forma de realização da presente invenção é um vector recombinado que compreende as sequências de ácido nucleico que codificam os homólogos humanos das moléculas costimulatórias LFA-3, B7 e ICAM-1. O vector recombinado pode

ainda possibilitar que os promotores adequados permitam a expressão de cada sequência numa célula hospedeira infectada. Uma forma de realização do vector recombinado é vT224 ilustrado na Figura 9.

A presente invenção proporciona vectores plasmidos que compreendem uma sequência de ácido nucleico estranha que codifica três moléculas costimulatórias. Numa forma de realização, as sequências de ácido nucleico estranhas são seleccionadas de modo a codificarem três moléculas costimulatórias seleccionadas de entre o grupo que inclui B7, ICAM-1, LFA-3, 4-1BBL, CD59, de40, cd70, VCAM-1, OX-40L e afins. Numa forma de realização da presente invenção, os vectores plasmidas compreendendo uma sequência de ácido nucleico estranha codificando a molécula costimulatória B7, uma sequência de ácido nucleico estranha que codifica imã molécula costimulatória ICAM-1 e uma sequência de ácido nucleico estranha que codifica uma molécula costimulatória LFA-3. Os vectores plasmida de acordo com a presente invenção fornecem ainda pelo menos uma sequência de promotor para controlar a expressão das moléculas costimulatórias. Numa forma de realização preferencial cada sequência de ácido nucleico que codifica uma molécula costimulatória é controlada por uma sequência de promotor discreto separado. Para o uso na marcação de um poxvirus recombinado, os vectores plasmida proporcionam ainda sequências de ácido nucleico virais de separação provenientes de uma região não essencial de um genoma de um poxvirus. As sequências de ácidos nucleicos virais de separação orientam a inserção das sequências estranhas num genoma de poxvirus parental através da recombinação homóloga. Os vectores plasmida da presente

invenção podem ainda compreender um ou mais marcadores seleccionáveis para a escolha e identificação dos genes recombinados que contem o DNA estranho inserido tal como são conhecidas na técnica e incluindo de um modo não limitado a vaccinia K1L e a gama de genes hospedeiros, o gene lacZ da E. Coli, os genes de resistência aos antibióticos, o gene que codifica a β -glucuronidase e afins.

Numa forma de realização da presente invenção um vector plasmida é compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica LFA-3 sob o controlo de um promotor 30K, uma sequência de ácido nucleico que codifica ICAM-1 sob o controlo do promotor 13, e uma sequência de ácido nucleico que codifica B7,1 sob o controlo de um promotor de sE/L, ladeado por porções da região Hind III M do genoma de vaccinia. Numa forma de realização, o vector plasmida apresenta-se da forma ilustrada na Figura 1 como pT5032.

Uma outra forma de realização da presente invenção compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica B7 sob o controlo de um promotor sE/L, uma sequência de ácido nucleico que codifica LFA-3 sob o controlo de promotor 13, e uma sequência de ácido nucleico que codifica ICAM-1 sob o controlo de um promotor de poxvirus 7,5K. O vector plasmida pode ainda compreender um gene lacZ alimentado por uma sequência de promotor distinta. Estas sequências estão ladeadas por porções da região Hind III J do genoma de vaccinia. Numa forma de realização, o vector plasmida apresenta-se da forma ilustrada na Figura 2 como pT5047.

Numa outra forma de realização o vector plasmida compreende, em combinação com as sequências de ácido nucleico que codificam B7, ICAM-1, e LFA-3, uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos um antígeno alvo ou um epítopo imunológico do mesmo. É proporcionado um promotor para controlar a expressão do antígeno alvo. Uma forma de realização particular do vector plasmida encontra-se ilustrada como pT5031 na Figura 3 e compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno alvo, CEA.

Numa outra forma de realização particular o vector plasmida compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno associado ao tumor, CEA, sob o controlo do promotor 40K, uma sequência de ácido nucleico que codifica B7 sob o controlo do promotor sE/L, uma sequência de ácido nucleico que codifica LFA-3 sob o controlo de um promotor 13 e uma sequência de ácido nucleico que codifica ICAM-1. O vector plasmida pode ainda compreender um gene lacZ sob o controlo do promotor C1 de acordo com o ilustrado na Figura 6 como pT5049. O plasmida pT5049 foi depositado na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 em 13 de Novembro de 1998 com o número de acesso ATCC 203481 de acordo com os termos do Tratado de Budapest.

Numa outra forma de realização do vector plasmida, o vector compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica huLFA-3 sob o controlo do promotor 30K, uma sequência de ácido nucleico que codifica huICAM-1 sob o controlo do promotor 13, e huB7,1 sob o controlo do promotor sE/L. Uma forma de realização particular do vector plasmida encontra-se ilustrada como pT5064 na Figura 8 que foi depositado na ATCC

em 13 de Novembro de 1998 com o número de acesso ATCC 203482 de acordo com os termos do Tratado de Budapest.

O vector plasmida da presente invenção pode apresentar-se sob a forma de um conjunto para ser usado em processos para gerarem vectores recombinados. O conjunto pode ainda proporcionar um vírus parental e outros reagentes usados no processo de recombinação.

A presente invenção proporciona ainda processos para gerar poxvirus recombinados que compreendem sequências de ácido nucleico que codificam três moléculas costimulatorias. Um processo para gerar os poxvirus recombinados é conseguido através da recombinação homóloga *in vivo* entre o DNA do genoma do poxvirus parental e um vector plasmida que é portador das sequências heterogêneas que vão ser inseridas de acordo com o revelado na Patente dos Estados Unidos nº 5 093 258. Os vectores plasmida destinados à introdução de sequências estranhas no interior dos poxvirus são elaborados através de processos padrão da tecnologia de DNA recombinado (36). Os vectores plasmida contêm um ou mais genes quiméricos estranhos, em que cada um compreende um promotor de poxvirus ligado a uma sequência de codificação de proteínas ladeada por sequências virais provenientes de uma região não essencial do genoma do poxvirus. O plasmida é transfectado para o interior de células infectadas com poxvirus parentais usando processos de transfecção aceites na técnica, e a recombinação entre sequências de poxvirus no plasmida e o DNA correspondente no genoma viral parental que resulta na inserção no interior do genoma viral dos genes quiméricos estranhos provenientes do plasmida. Os vírus recombinados são seleccionados e purificados usando qualquer uma de entre uma

pluralidade de sistemas de selecção e de triagem como os que são conhecidos na técnica (14). A inserção dos genes estranhos no genoma de vaccinia é confirmada pela análise da cadeia de reacção da polimerase (PCR). A expressão dos genes estranhos é demonstrada pela análise Western Blot. Um processo alternativo para gerar poxvirus recombinados é conseguido através da ligação directa (Pleiderer e outros J. Gen Virol 76: 2957-2962, 1995; Merchlinsky e outros Virol 238: 444-451, 1997).

O uso do vector recombinado compreendendo sequencias de ácido nucleico que codificam três moléculas costimulatorias em combinação com uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos um antígeno alvo ou um seu epítopo é útil para aumentar uma resposta imune contra o antígeno alvo ou o seu epítopo, e aumentar a resposta imune contra as células que exprimem o antígeno alvo ou o seu epítopo. A magnitude da resposta imune contra o antígeno alvo o epítopo ou as células que exprimem o antígeno alvo obtidas usando o vector recombinado da presente invenção é significativamente mais elevada do que a conseguida usando sistemas que empregam uma molécula costimulatoria simples ou dupla.

O vector recombinado codifica três moléculas costimulatorias em combinação com uma sequência de ácido nucleico que codifica um antígeno alvo ou um seu epítopo imunológico para proporcionar uma resposta imunológica sinérgica ao antígeno alvo ou ao seu epítopo. Numa forma de realização um poxvirus recombinado proporciona uma sequência de ácido nucleico que codifica B7, ICAM-1, e LFA-3 em conjunto com uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos um

antigenio alvo ou epitope imunológico do mesmo. Em alguns casos pode ser benéfico proporcionar mais de uma sequência de ácido nucleico para dar origem a três antigenios alvo ou epitopes imunológicos com o objectivo de ter uma vacina multivalente.

O antigenio alvo da forma aqui usada, é uma antigénio ou um epitope imunológico do antigenio que é crucial no reconhecimento imune e na eliminação ou controlo final do agente que causa a doença ou do estado de doença de um mamífero. O reconhecimento imune pode ser celular e/ou humoral. No caso de patogenios intracelulares e do cancro o reconhecimento imune é de preferência uma resposta de um linfocito T.

O antigenio alvo pode ser derivado ou isolado a partir do micro organismo patogénico como sejam os vírus incluindo o HIV, (Korber e outros, eds HIV Molecular Immunology Data Base, Los Álamos National Laboratory, Los Álamos, New México 1977) gripe, herpes simplex, vírus do papiloma humano (Patente dos Estados Unidos nº 5 719 054), hepatite B (Patente dos Estados Unidos nº 5 780 036), a hepatite C (Patente dos Estados Unidos nº 5 709 995), EBV, Citomegalovirus (CMV) e afins. O antigenio alvo pode ser derivado ou isolado a partir de bactérias patogénicas como sejam a clamidia (Patente dos Estados Unidos nº 5 869 608), micobactéria, legionela, meningococcus, estreptococos do grupo A, salmonela, listéria, hemofilus influenza (Patente dos Estados Unidos nº 5 955 596) e afins.

O antígeno alvo pode ser preparado ou isolado a partir de levedura patogénica incluindo *Aspergillus*, *Cândida* invasiva (Patente dos Estados Unidos nº 5 645 992), *Nocardia*, *Histoplasmosis*, *Criptosporidia* e afins.

O antígeno alvo pode ser preparado ou isolado a partir de um protozoário patogénico e de parasitas patogénicos incluindo, de um modo não limitativo, *Pneumocystis carinii*, *Tripanosome*, *Leishmania* (Patente dos Estados Unidos nº 5 965 242), *Plasmódio* (Patente dos Estados Unidos nº 5 589 343) e *Toxoplasma gondii*.

O antígeno alvo inclui um antígeno associado a um estado preneoplásico ou hiperplásico. O antígeno alvo pode ser também associado com, ou provocar, o cancro.

Um tal antígeno alvo pode ser um antígeno específico de um tumor, um antígeno associado a um tumor (TAA) ou um antígeno do tecido, o seu epitope, e o seu epitope agonista. Alguns antígenos alvo incluem de uma forma não limitativa, o antígeno carcino-embrionário (CEA) e seus epitopes como sejam o CAP-1, o CAP-1-6D (46) e afins (número de acesso GenBank M29540) , MART-1 (Kawakami e outros, *J. Exp. Med.* 180: 347-352, 1994) , MAG-1 (Patente dos Estados Unidos nº 5 750 395) , MAG-3, GAGE (Patente dos Estados Unidos nº 5 648 226), GP-100 (Kawakami e outros, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91: 6458-6482, 1992), MLTC-1, MUC-2, oncogene alvo de uma mutação na ponta, os oncogenes normais e alterados nas pontas p53 (Hollstein e outros *Nucleic Acids Res.* 22: 3551-3555, 1994) , PSMA (Israeli e outros *Cancer Res.* 53: 227-230, 1993), tirocinase (Kwon e outros *PNAS* 84: 7473-7477, 1987), TRP-1

(Gp75) (Choen e outros Nucleic Acid Res. 18: 2807-2808, 1990; Patente dos Estados Unidos nº 5 840 839), NY-ESO-1 (Chen e outros PNAS 94: 1914-1918, 1997), TRP-2 (Jackson e outros, EMBOJ, 11: 527-535, 1992), TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erbB2, (Patente dos Estados Unidos nº 5 550 214), BRC-I, BRC-II, bcr-abl, pax3/fkhr, ews-fli-1, modificações de TAA e tecido de antígeno específico, variantes de estripe de TAA, epítopo agonista, e outros semelhantes. Outros TAA podem ser identificados, isolados e clonados pelos processos conhecidos na técnica, tal como os que são revelados na Patente dos Estados Unidos nº 4 514 506. O antígeno alvo pode ainda incluir um ou mais factores de crescimento e variantes de estripe de cada um deles.

Possíveis antígenos de tumores humanos e antígenos específicos dos tecidos assim como os seus epítopes imunológicos para servirem de alvos usando a presente invenção incluem, de um modo não limitativo, os que se encontram exemplificados na tabela 1.

Tabela 1			
Antigenios e Epitopes Reconhecidos pelas Células T			
Antigenios Alvo	Elemento restritivo	Péptido Imunológico Epitope	Nº SEQ. ID
<u>Antigenios de tumores alvo Humanos reconhecidos pelas Células T</u>			

gp 100	HLA-A2	KTWGQYWZY	
	HLA-A2	ITDQVPPSV	2
	HLA-A2	YLEPGPVTA	3
	HLA-A2	LLDGTATLR	4
	HLA-A2	VLYRYGSFSV	5
MARTI-/Melan A	HLA-A2	AAGIGILTV	6
	HLA-A2	ILTVILGVL	7
TRP-1 (GP75)	HLA-A31	MSLQRQFLR	8
Tirosinase	HLA-A2	MLLAVLYCL	9
	HLA-A2	YMNGTMSQV	10
	HLA-B44	SEIWRDIDF	11
	HLA-A24	AFLPWHRLE	12
	HLA-DR4	QNILLSNAPLGPQFP	13
	HLA-DR4	SYLQDSDPDSFQD	14
MAGE-1	HLA-A1	EADPTGHSY	15
	HLA-Cw16	SAGEPRKL	16
MAGE-3	HLA-A 1	EVDPIGHLV	17
	HLA-A2	FLWGPRALV	18
BAGE	HLA-Cw16	AARAVFLAL	19
GAGE-1,2	HLA-Cw6	YRPRPRRY	20
n-acetilglucosa- miniltransferase	HLA-A2	VLPDVFIRC	21
-V	HLA-A24	AYGLDFYIL	22
p15		YLSGANLNL (CAPI)	23
CEA		YLSGANLNL (CAPI-6D)	24
			37
	HLA-A24	SYLDSGIHF	25
β-catenin	HLA-B44	EEKLIVVLF	26
MUM-1	HLA-A2	ACDPHSGHFV	27
CDK4	HLA-A2	HSAVVGIL	28
HER-2/neu			
(Carcinoma da mama e ovário)	HLA-A2	KIFGSLAFL	29
Vírus do papiloma humano	HLA-A2	YMLDLQPETT	30
E6, E7	Sem	PDTRPAPGSTAPPAHGV TSA	31
(carcinoma do colo)	restrição a	(e porções)	
MUC-1	MHC		
	Com		
	restrição a	FLTPKKQCVDLHVISNDVCA-	32
(carcinoma da mama, ovário e pâncreas)	MHC	QVHPQKVTK	
		FLTPKKLQCV	33
		KLQCVDLHV	34
PSA	A2, A3	VISNDVCAQV	35
		QVHPQKVTK	36

Para organismos que contem um genoma de DNA, um gene que codifica um antígeno alvo ou um seu epítipo que interesse é isolado do DNA do genoma. Para organismos com genomas de RNA o gene desejado pode ser isolado a partir de cópias cDNA do genoma. Se estiverem disponíveis mapas de restrição do genoma, o fragmento de DNA que contem o gene que interessa é separado por digestão de restrição de endonuclease através dos processos habituais na técnica. Em casos em que o gene desejado foi previamente clonado os genes podem ser facilmente obtidos a partir dos clones disponíveis. De um modo alternativo, se a sequência de DNA do gene for conhecida, o gene pode ser sintetizado através de qualquer uma das técnicas convencionais para a síntese dos ácidos desoxirribonucleicos.

Os genes que codificam um antígeno que interessa podem ser amplificados clonando o gene num hospedeiro bactericida. Para este fim, podem ser usados vários vectores procarióticos de clonagem. Os exemplos são as plasmídas pBR322, pUC e pEMBL.

Os genes que codificam pelo menos um antígeno alvo ou um seu epítipo imunológico podem ser preparados para a inserção nos vectores plasmída concebidos para a recombinação com um vírus através de técnicas padrão. Em geral, os genes clonados podem ser retirados do vector de clonagem procariótico através da digestão da enzima de digestão. Na maioria dos casos, o fragmento retirado irá conter a totalidade da região de codificação do gene. O fragmento de DNA que é portador do gene clonado pode ser modificado de acordo com as necessidades, por exemplo, para tornar as extremidades do

fragmento compatíveis com os locais de inserção dos vectores de DNA usados para a recombinação com um vírus, sendo então purificados antes de serem inseridos no interior dos vectores nos locais de clivagem de endonucleose de restrição (locais de clonagem) de acordo com o aqui descrito.

Podem ser tratadas ou evitadas doenças através do uso da presente invenção estando entre as doenças as que são causadas por vírus, por bactérias, por fungos, por parasitas, por protozoários, por células cancerosas e afins. O vector recombinado compreendendo três moléculas costimulatórias pode ser usado como um incrementador generalizado da imunidade e como tal é útil no tratamento de doenças cuja causa etiológica não é conhecida. Os estados pré neoplásicos ou hiperplásicos que podem ser tratados ou evitados usando um vector recombinado de acordo com a presente invenção incluem, de um não limitativo, os estados pré neoplásicos ou hiperplásicos como sejam os pólipos do cólon a doença de Crohn, as colites ulcerosas as lesões da mama e afins.

Os cancros que podem ser tratados usando o vector recombinado de acordo com a presente invenção incluem, de modo não limitativo, o melanoma primário ou metastático, o adenocarcinoma, o carcinoma das células escamosas, o carcinoma adenoescamosas, timoma, o linfoma, o sarcoma, o cancro do pulmão, o cancro de fígado, o linfoma não Hodgkins, o linfoma de Hodgkins, as leucemias, o cancro do útero, o cancro de mama, o cancro da próstata, o cancro dos ovários, o cancro do pâncreas, o cancro do cólon, mieloma múltiplo, o neuroblastoma, o NPC, o cancro da bexiga, o cancro do colo do útero, e afins.

A presente invenção proporciona uma composição farmacêutica que compreende um vector recombinado contendo genes estranhos que codificam três moléculas costimulatorias num veículo farmacologicamente aceitável. Três genes que codificam uma molécula costimulatória fazem parte do vector recombinado e podem ser seleccionadas de entre o grupo de genes que codificam B7, ICAM-1, LFA-3, 4-1BBL, CD59, CD40, CD70, VCAM-1, OX-40L e afins. O vector recombinado pode ainda compreender uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos um antígeno alvo ou o epítipo imunológico do mesmo. Numa outra forma de realização, a composição farmacêutica compreende um primeiro vector recombinado que compreende genes estranhos que codificam três moléculas costimulatórias, um segundo vector recombinado que compreende sequenciais de ácido nucleico que codificam pelo menos um antígeno alvo ou o seu epítipo imunológico e um veículo farmacologicamente aceitável. A administração da composição farmacêutica fornece às células hospedeiras os genes estranhos que codificam três moléculas costimulatorias.

Numa forma de realização, a composição farmacêutica compreende um poxvirus recombinado contendo genes estranhos que codificam três moléculas costimulatórias num veículo farmacologicamente aceitável. O poxvirus recombinado pode ainda conter uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos um antígeno alvo ou o seu epítipo imunológico ou, de um modo alternativo, pode ser fornecido um segundo poxvirus recombinado que codifique pelo menos um antígeno alvo ou o epítipo imunológico do mesmo.

A presente invenção proporciona uma composição farmacêutica que compreende um poxvirus recombinado constituído por uma sequência de ácido nucleico que codifica de B7,1 a B7,2, uma sequência de ácido nucleico que codifica ICAM-1, e uma sequência de ácido nucleico que codifica LFA-3 e um veículo farmacologicamente aceitável. Para além da estrutura B7, ICAM-1, LFA-3, o poxvirus recombinado da composição farmacêutica pode ainda compreender uma sequência de ácido nucleico que codifique pelo menos um antígeno alvo ou o seu epítipo imunológico ou a sequência de ácido nucleico que codifique pelo menos um antígeno alvo ou o seu epítipo imunológico podem ser fornecidos na composição através de um segundo poxvirus recombinado.

A composição farmacêutica pode ainda compreender moléculas imunoestimuladoras adicionadas a partir do exterior de acordo com o conhecido na técnica incluindo as moléculas costimulatórias B7, ICAM-1, LFA-3, 4-1BBL, CD59, CD40, CD70, VCAM-1, OX-40L e afins e/ou citocinas incluindo de uma forma não limitativa IL2, JM-CSF, TNF α , IFN α , IL-12, RANTES, MIP-1 α , Fit-3L (Patentes dos Estados Unidos n.ºs 5 554 512; 5 843 423) e afins por motivos de sinergia adicional ou aumento da resposta de imunidade. As citocinas e as próprias quimoquinas podem ser fornecidas na composição ou, de uma modo alternativo, as citocinas e as quimoquinas podem ser fornecidas por um vector viral recombinado que codifique a citocina ou a quimoquina.

A presente invenção também diz respeito a processos de tratamento ou de prevenção de uma doença provocada pelos micro organismos patogénicos ou pelo cancro aqui revelados.

No processo de tratamento, a administração do vector recombinado da invenção pode ter uma finalidade "profilática" ou "terapêutica". Quando fornecido de um modo profilático o vector recombinado da presente invenção é fornecido antes de qualquer sintoma. A administração profilática do vector recombinado serve para evitar ou para mitigar qualquer infecção ou doença subsequentes. Quando fornecido de um modo terapêutico o vector recombinado é fornecido aquando ou após o desencadeamento de um sintoma de infecção ou de doença. Deste modo, a presente invenção pode ser fornecida ou antes da esperada exposição ao agente causador da doença ou dos estados de doença ou após o início da infecção ou da doença.

O termo "dose unitária" no contexto do material a ser inoculado refere-se a unidade fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para mamíferos, em que cada unidade contem uma quantidade previamente determinada de um vector recombinado calculada de modo a produzir o efeito imunogénico desejado em associação com o diluente requerido. As especificações da inovadora dose unitária de um material destinado a ser inoculado de acordo com a presente invenção são ditadas pelas e dependentes das características únicas do vírus recombinado e do efeito imunológico particular que vai ser alcançado.

O material a ser inoculado é habitualmente preparado como uma solução num diluente tolerável (aceitável) como seja o soro fisiológico, o soro fisiológico tamponado com fosfato ou

outro diluente fisiologicamente tolerado e afins de modo a formar uma composição farmacológica aquosa.

A via de inoculação pode ser a raspagem, intravenosa (I.V.), intramuscular (I.M.), subcutânea (S.C.), intradérmica (I.D.), intraperitoneal (I.P.), intratumoral e afins, o que tem como resultado a emissão de uma resposta de protecção contra o agente que provoca a doença. A dose é administrada pelo menos uma vez. Podem ser administradas doses subsequentes de acordo com o prescrito.

Numa forma de realização são empregues regimes aceleradores heterogénios. Num dos exemplos, o hospedeiro é imunizado pelo menos uma vez com um primeiro vector como seja um vector baseado em ácido nucleico. As imunizações seguintes são efectuadas com um vector de poxvirus. Num outro exemplo, o hospedeiro é em primeiro lugar imunizado com um primeiro vector de poxvirus e de seguida com um segundo vector de poxvirus de um género diferente.

Ao administrar-se a um mamífero, de preferência um humano, o vector recombinado da presente invenção, a dosagem a dosagem do vector recombinado administrado irá variar dependendo de factores como sejam a idade, o peso, a altura, o sexo, a situação médica geral, a história médica anterior, a progressão da doença, os incómodos provocados pelo tumor num mamífero e afins.

Em termos gerais, é desejável fornecer ao receptor uma dosagem de vírus recombinado compreendida entre cerca de 10^5 e cerca de 10^{10} unidades de formação de placa muito embora

possa ser administrada uma dose inferior ou uma dose mais elevada.

A definição genética de antígenos associados ao tumor e de antígenos específicos do tumor permite o desenvolvimento de vacinas específicas de antígenos alvo destinadas ao tratamento do cancro. A inserção de um gene que seja um antígeno de um tumor no genoma dos poxvirus recombinados em conjunto com os genes que codificam três moléculas costimulatórias é um sistema poderoso para que se consiga obter uma resposta de uma unidade específica em termos de prevenção em indivíduos com risco aumento de desenvolvimento de cancro (imunização preventiva), de modo a diminuir o tamanho dos tumores antes da cirurgia de modo a evitar a recorrência da doença após a cirurgia primária (vacinação anti-metastática) ou então para aumentar o número de linfócitos citotóxicos (CTL) *in vivo* melhorando deste modo a sua eficácia na erradicação dos tumores difusos (tratamento da doença estabelecida). Os vírus recombinados da presente invenção podem provocar uma resposta de imunidade *ex vivo* em linfócitos autólogos ($CD8^+$), quer linfócitos T citotóxicos e/ou células T de auxílio $CD4^+$ ou células NK antes de serem transferidas de volta para o paciente que possui o tumor (imunoterapia adoptiva).

Nos tratamentos de cancro os vectores recombinados podem ser introduzidos num mamífero ou antes de qualquer prova de cancro como seja um adenocarcinoma ou para mediar a regressão da doença num mamífero afectado com um cancro como seja um adenocarcinoma.

Dependendo da doença ou da condição física a ser tratada e do processo de tratamento, o vector recombinado pode, ou não, compreender uma sequência de ácido nucleico que codifique um antígeno alvo ou um seu epítope imunológico para além dos genes que codificam três moléculas costimulatorias. O antígeno alvo ou o seu epítope imunológico podem ser fornecidos de um modo endógeno pela célula hospedeira infectada com o vector recombinado como, por exemplo, uma célula de tumor pode de um modo endógeno expressar um antígeno associado a um tumor ou um seu epítope e pode não exigir à adição de um gene estranho que codifique um antígeno associado a um tumor exógeno. No caso em que um antígeno associado a um tumor não se encontre presente, não seja expresso ou que seja expresso a níveis muito baixos numa célula hospedeira, pode ser proporcionado um antígeno associado a um tumor exógeno codificado por um gene estranho. De um modo adicional, podem ser proporcionados diferentes antígenos associados a tumores codificados por genes. O gene estranho que codifica um antígeno associado a um tumor exógeno pode ser proporcionado pelo mesmo vector recombinado que compreende genes que codificam três moléculas costimulatorias ou pode ser proporcionado por um segundo vector recombinado numa mistura com o primeiro vector recombinado.

Exemplos de processos para a administração de vector recombinado em mamíferos incluem, de um modo não limitativo, a exposição das células de tumor ao vírus recombinado ex vivo, ou a injeção do vector recombinado no hospedeiro afectado através de administração intravenosa, S.C., I.D., ou I.M.. De um modo alternativo o vector recombinado ou a

combinação de vectores recombinados podem ser alvo de administração local por injeção directa na lesão cancerosa ou no tumor ou a aplicação tópica num veículo farmacologicamente aceitável. A quantidade de vector recombinado que é portadora da sequência de ácido nucleico de um ou mais antigenos associados a tumores (TAAs) em combinação com sequências de ácido nucleico que codificam três costimuladoras destinadas a serem administradas é baseada na dosagem das partículas de vírus. Uma amplitude preferida do imunogeno a ser administrado é de entre 10^5 a 10^{10} partículas de vírus por mamífero. De preferência um humano. Se o mamífero a ser imunizado já estiver afectado pelo cancro ou pelo cancro metastático, a vacina pode ser administrada em conjunto com os tratamentos terapêuticos.

Num processo de tratamento, os linfócitos citotóxicos autólogos ou os linfócitos que se infiltram no tumor podem ser obtidos partir do sangue, dos nódulos linfáticos, do tumor e afins de um paciente com cancro. Os linfócitos são desenvolvidos em cultura e os linfócitos específicos do antígeno alvo são expandidos em cultura na presença de antigenos alvo específicos e as células que apresentam antigenos que exprimem três moléculas costimuladoras estranhas ou antigenos alvo moldados dos APCs da presente invenção. Os linfócitos específicos do antígeno alvo são introduzidos de volta no paciente.

Após imunização a eficácia da vacina pode ser avaliada através da produção de anticorpos ou de células imunes que reconhecem o antígeno, de acordo com o avaliado pela actividade lítica específica ou da produção de citocina

específica ou pela regressão do tumor. Um perito na técnica irá conhecer os processos convencionais para avaliar os parâmetros anteriormente mencionados.

A presente invenção compreende processos destinados a aumentar as respostas das células T específicas do antígeno através da administração de uma quantidade eficaz de um vector recombinado que codifica três moléculas costimulatórias estranhas e um antígeno alvo num mamífero isolado, ou a infecção de uma célula alvo ou vector, com o vector, com o antígeno alvo ou com o seu epítopo imunológico. Numa forma de realização do processo um vector recombinado codifica a molécula da família B7, ICAM-1 e LFA-3 administrada sozinha ou misturada com uma célula alvo, com um antígeno alvo ou com um epítopo imunológico do mesmo. Esta técnica de imunização destaca ou aumenta as respostas imunes geradas pelo antígeno alvo, proporcionando uma resposta sinérgica comparada com o uso de moléculas costimulatórias simples ou duplas. O processo de administração de vector recombinado contendo genes que codificam três moléculas costimulatórias tem como resultado numa proliferação acrescida de linfócitos específicos de antígeno alvo, actividade citolítica aumentada, segregação citocina aumentada e imunidade mais duradoura relativamente ao antígeno alvo em comparação com o uso do vector recombinado que codifica pelo menos um antígeno alvo ou um seu epítopo imunológico para o aumento sinérgico das respostas imunes específicas do antígeno alvo. De um modo alternativo, a sequência de ácidos nucleicos que codifica pelo menos um antígeno alvo ou epítopo imunológico do mesmo é proporcionada por um segundo vector recombinado diferente do

vector que codifica as três moléculas costimulatórias. Numa forma de realização do processo destinado a aumentar as respostas das células T específicas do antígeno, os mamíferos de preferência humanos, são imunizados com uma estrutura rV-HIV-1 epítope/ B7-1/ ICAM-1/ LFA-3. A eficácia do tratamento pode ser vigiada in vitro e/ou in vivo através da determinação de linfócitos específicos do antígeno alvo, da resposta citolítica específica do antígeno alvo, das respostas clínicas e afins.

O processo para aumentar as respostas das células T específicas do antígeno pode ser usado para qualquer antígeno alvo ou para qualquer epítope do mesmo. Particularmente relevantes são os antígenos associados ao tumor, os antígenos específicos dos tecidos e os antígenos de agentes infecciosos.

Para além da administração do vector recombinado ao paciente, outras moléculas imuno modeladoras exógenas ou imuno estimulatórias, drogas de quimioterapia, antibióticos, medicamentos anti-fúngicos, medicamentos anti-virais e afins sozinhos ou em combinação podem ser administrados dependendo da condição a ser tratada. Exemplos de outros agentes adicionados incluem os exógenos IL-2, IL-6, alfa-, beta- ou gama-interferons GM-CSF, factor de necrose dos tumores, Fit-3L, ciclofosfamida, cis-platina, ganciclovir, anfotericina B, 5 fluororacil e afins.

A presente invenção proporciona três moléculas costimulatórias exógenas em que as moléculas são proporcionadas por um vector recombinado que tem sequências

de ácido nucleico estranhas que codificam três moléculas costimulatórias. As células hospedeiras podem ainda exprimir um ou mais antígenos alvo exógenos ou seus epítopes ou podem ser trabalhadas de modo a exprimirem um ou mais antígeno alvo estranhos exógenos ou os seus epítopes recombinados que podem possuir ainda o vector recombinado que codifica três moléculas costimulatórias ou segundo vector recombinado. As células hospedeiras da presente invenção, que são úteis para estimular uma resposta imune específica do antígeno podem ser qualquer célula passível de infectar usando o vírus recombinado da presente invenção e capaz de exprimir três moléculas costimulatórias exógenas e pode ainda ser trabalhado de um modo genético de modo a exprimir um ou mais antígenos alvo exógenos ou seus epítopes imunológicos. Tais células hospedeiras estão incluídas, de um modo não limitativo, nas células tumor, nas células que apresentam antígenos, como sejam as PBMC, as células dendríticas, células de pele ou de músculo, e afins. As células que apresentam antígenos incluem de um modo não limitativo, os monocitos, os macrófagos, as células dendríticas, as células dendríticas do progenitor, as células de Langerhans, os esplenócitos, as células B, as células de tumor, as células de músculo, as células epiteliais e afins.

Numa forma de realização, as células hospedeiras são células do tumor nas quais as células do tumor se encontram expostas ao vector recombinado *in situ* ou *in vitro* de modo a provocar a expressão de três moléculas costimulatórias exógenas ou estranhas nas células do tumor. As células do tumor podem exprimir um antígeno alvo endógeno ou as células do tumor podem ser ainda trabalhadas de um modo genético para

exprimirem um antígeno alvo como seja TTA ou um epítopo imunológico do mesmo. As células do tumor que exprimem a TAA em conjunto três moléculas imunostimulatórias são administradas ao mamífero numa quantidade eficaz de modo a resultar numa redução do tumor ou na eliminação no mamífero afectado pelo cancro.

A presente invenção proporciona ainda células dendríticas de progenitor, células dendríticas (DC), sub populações DC, e seus derivados que expressem três moléculas costimulatórias em que as três moléculas costimulatórias sejam fornecidas externamente por um vector recombinado que tenha sequências de ácido nucleico que codifiquem três moléculas costimulatórias. A DC progenitor e a DC da presente invenção exprimem níveis mais elevados de moléculas costimulatórias, do que os níveis expressos interiormente por DC progenitor ou por DC não tratadas. As APCs como sejam as células dendríticas de progenitor e as células dendríticas podem também exprimir um ou mais antígenos alvo interiores ou seus epítopes imunológicos ou os antígenos alvo exteriores podem ser também fornecidos pelo vector recombinado que codifica três moléculas costimulatórias ou através de um segundo vector recombinado. A presente invenção proporciona ainda processos para usar as APCs que exprimem as três moléculas costimulatórias, como sejam as células dendríticas de progenitor que exprimem as três moléculas costimulatórias e as células dendríticas que exprimem as três moléculas costimulatórias na activação das células T in vivo ou in vitro para a vacinação e para as respostas imunoterapêuticas contra uma ou mais de entre as células alvo, dos antígenos alvo e dos seus epítopes imunológicos.

As APCs como sejam as células dendríticas de progenitor as células dendríticas, as sub populações DC e os seus derivados isolados de uma fonte são infectados, transfectados ou transduzidos com um vector recombinado que compreende genes exógenos que codificam três moléculas costimulatórias durante um período de tempo suficiente para permitir a expressão funcional das três moléculas costimulatórias. Um tal antígeno que exprime múltiplas moléculas costimulatórias que apresentam células dendríticas de progenitor e células dendríticas pode ser ainda impulsionado ou incubado com pelo menos uma célula alvo, lisato de célula alvo, membrana de célula alvo, antígeno alvo, ou o seu epítipo imunológico, ou com RNA ou DNA de pelo menos uma célula alvo e administrada a uma espécie numa quantidade suficiente para activar as respostas das células T relevantes in vivo. Numa outra forma de realização, o antígeno que apresenta células dendríticas de progenitor e células dendríticas exprime adicionalmente pelo menos um antígeno alvo estranho ou um epítipo imunológico do mesmo.

As células hospedeiras que exprimem três moléculas costimulatórias externas podem estar presentes numa dose que varia entre 10^3 e 10^9 células. As vias de administração que podem ser usadas incluem a intravenosa, a subcutânea, a intra linfática, a intratumoral, a intradérmica, a intramuscular, a intraperitoneal, a intrarectal, a intra vaginal, a intra nasal, a oral, através introdução na bexiga, através de raspagem, e afins.

Numa forma de realização, as três moléculas costimulatórias que exprimem o antígeno que apresentam células dendríticas de progenitor ou células dendríticas encontram-se expostas a uma célula alvo, aos lisatos da célula alvo, às membranas da célula alvo, aos antígenos da célula alvo, ou ao seu epítopo imunológico ou com DNA ou com RNA de uma célula alvo *in vitro* e incubada com células T preparadas ou não preparadas para a activação das respostas das células T relevantes *in vitro*. As células T activadas, sozinhas ou em combinação com o DC de progenitor ou com o DC são então administradas a espécies de modo a que um humano que vai vacinar-se ou que a imunoterapia contra uma célula alvo, o antígeno alvo ou um seu epítopo imunológico. Num processo de uso, as células dendríticas de progenitor ou as células dendríticas são de preferência usadas para conseguir um crescimento imunoterapêutico que iniba a resposta às células de cancro.

Numa outra forma de realização a célula que apresenta antígeno que exprime as três moléculas costimulatórias preferencialmente a DC precursor ou a DC unem-se com uma célula alvo exprimindo um antígeno alvo relevante um seu epítopo imunológico para formar um heterocarion de APC e a célula alvo através dos processos conhecidos na técnica (Gong, J. e outros Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 6279-6283, 1998). Uma tal célula de fusão ou célula de antígeno alvo / APC quimérica exprime tanto as três moléculas costimulatórias e o antígeno alvo ou os epítopos imunológicos dos mesmos. Numa forma de realização preferencial, a célula alvo é uma célula hiperplásica, uma célula pré maligna ou maligna. A célula de antígeno alvo / quimérica APC pode ser usada tanto

in vivo como in vitro de modo a aumentar as respostas imunes aos linfócitos T e B.

As células dendríticas de progenitor são obtidas a partir da espinal medula do sangue periférico e dos nódulos linfáticos de um paciente. O paciente pode ter sido previamente vacinado ou tratado com um composto como seja o Fit-3L de modo a aumentar o número de células. As células dendríticas são obtidas a partir de qualquer tecido como sejam a epiderme da pele (células de Langerhans) e tecidos linfóides como sejam os que se encontram no baço, na espinal medula, nódulos linfáticos que apresentam o antígeno, e o timus e o sistema circulatório e as células linfáticas (células veladas). O sangue do cordão umbilical é uma outra fonte de células dendríticas.

As células dendríticas podem ser enriquecidas ou isoladas para ser usadas na presente invenção usando processos conhecidos na técnica, como os que estão descritos na Patente dos Estados Unidos nº 5 788 963. Quando as células dendríticas de progenitor, as células dendríticas e os seus derivados são obtidos, eles são desenvolvidos em cultura num meio de condições de cultura adequadas para a expansão da população de células e /ou mantêm as células num estado que possibilita a sua infecção, transfecção ou transdução óptimas por intermédio de um vector recombinado e para permitir uma assimilação óptima do antígeno alvo, o seu processamento e a sua apresentação. Particularmente vantajosa para a manutenção do estado correcto de maturidade das células dendríticas numa cultura in vitro é a presença do factor de estimulação (GM-CSF) da colónia de granulócitos /macrófagos e interleuquina 4

(IL-4). As sub populações de células dendriticas podem ser isoladas com base na adesão e /ou com o grau de maturidade apoiada pelos marcadores da superfície da célula. O fenotipo da DC de progenitor e da DC e das sub populações encontra-se revelado em Banchereau e Steinman Nature 392: 245-252, 1998.

Numa forma de realização, GM-CSF e IL-4 são, cada um deles fornecidos numa concentração de cerca de 500 unidades /ml durante um período de cerca de 6 dias (41,42). Numa outra de realização TNF α e /ou CD40 são usados para fazer com que a DC de precursor ou a DC amadureçam.

As células dendriticas de progenitor ou as células dendriticas podem ser obtidas a partir do individuo a ser tratado e como tal são autologas em termos dos antigenios HLA relevantes, ou as células podem ser obtidas de um individuo cujos antigenios HLA relevantes (tanto da classe I como da classe II, por exemplo HLA-A, B, C e DR) corresponde ao individuo que vai ser tratado. De um modo alternativo, a célula dendritica de progenitor é trabalhada de modo a exprimir os antigenios HLA relevantes adequados do indivíduo que recebe o tratamento.

As células dendriticas de progenitor e as células dendriticas podem ser ainda geneticamente modificadas de modo a alongar a sua vida através de métodos como sejam a transformação EBV revelada na Patente dos Estados Unidos nº 5 788 863.

As células dendriticas e os seus precursores podem ser fornecidos sob a forma de uma composição farmacológica num meio fisiologicamente aceitável. A composição pode ainda

compreender uma célula alvo, lisato de célula alvo, membrana de célula alvo, antígeno alvo ou o seu epítopo imunológico. A composição pode compreender adicionalmente citocinas e/ou quimioquinas como sejam IL-4 e a GM-CSF para o aumento sinérgico adicional de uma resposta imune.

Numa outra forma de realização o APC da presente invenção que exprime três moléculas costimulatórias é útil nos processos de avaliação da eficácia de uma vacina através da determinação do linfócito específico do antígeno e da função. Num tal processo, os linfócitos são recuperados de um indivíduo que foi vacinado com o lisato de célula alvo, com a membrana de célula alvo, com o antígeno alvo ou com um epítopo imunológico do mesmo. Os linfócitos são cultivados *in vitro* com um APC da presente invenção na presença uma célula alvo, lisato de célula alvo, membrana de célula alvo, antígeno alvo ou o seu epítopo imunológico e um aumento dos números dos linfócitos específicos do antígeno e das funções determinadas pelos processos conhecidos na técnica. Um aumento nos números e/ou das funções é indicativo da eficácia da vacina. O processo é particularmente útil na determinação da eficácia nas vacinas de péptido na estimulação de uma resposta imune adequada.

Numa outra forma de realização, os APCs da presente invenção exprimem três moléculas costimulatórias externas úteis num processo de triagem de novos péptidos imunogénicos a partir de uma pluralidade de péptidos. No processo de triagem, os antígenos que apresentam células infectadas com um vector recombinado que codifica três moléculas costimulatórias ou porções funcionais da mesma são impulsionados com uma

pluralidade de péptidos de modo a formarem uma célula que apresenta antígenos impulsionada com péptidos. A célula que apresenta antígenos impulsionada com péptidos é incubada com células linfoides e a imunoreactividade das células linfoides é medida. Um aumento da imunoreactividade das células linfoides na presença do APC impulsionado por péptidos indica uma resposta ao péptido específica de um antígeno. O péptido que pede a resposta aumentada pode ser identificado como proveniente de um tumor, através da análise da ligação HLA, etc. A origem da multiplicidade de péptidos pode ser uma biblioteca de combinações que exprime uma pluralidade de péptidos aleatórios. A imunoreactividade aumentada pode ser uma resposta humoral ou provocada pelas células e pode ser medida usando técnicas padrão conhecidas na técnica como sejam a proliferação induzida por antígenos, a citotoxicidade, a secreção de anticorpos, a transdução de sinais e afins. Os novos péptidos identificados podem ser usados como imunógenos, como vacinas ou como agentes de diagnóstico. As proteínas que contêm os péptidos podem ser identificadas através de bibliotecas de subtracção e por tecnologias de apresentação diferencial dos genes.

Os vectores recombinados da presente invenção assim como as células hospedeiras infectadas, transfectadas ou induzidas pelo vector recombinado da presente invenção são úteis nos processos de estimulação de uma resposta humoral aumentada tanto *in vivo* como *in vitro*. Uma tal resposta humoral aumentada pode ser monoclonal ou policlonal na natureza. O aumento das respostas humorais usando três moléculas costimulatórias é sinérgico quando comparado com a resposta humoral usando uma molécula costimulatória simples ou dupla.

O aumento sinérgico de uma resposta humoral pode ser determinado pela proliferação acrescida e/ ou pela secreção de citocina pelas células T CD4⁺, pela proliferação aumentada ou pela produção de anticorpos por parte das células B, pela toxicidade celular dependente dos anticorpos (ADCC) aumentada, pela lise mediada por complementos aumentada, e afins. Os anticorpos obtidos usando os vectores recombinados da presente invenção ou usando células hospedeiras infectadas, transfectadas ou induzidas pelo vector recombinado da presente invenção consideradas como tendo uma maior afinidade e/ ou uma maior avidéz e uma titulação mais elevada do que os anticorpos obtidos através dos processos convencionais. O anticorpo obtido através dos processos que usam o vector recombinado podem reconhecer os epitopes alvo imunodominantes ou os epitopes alvo não dominantes.

A presente invenção compreende ainda um anticorpo ou vários anticorpos obtidos por imunização com o vector recombinado da presente invenção. O anticorpo tem especificidade para, e reage ou liga-se com, o antígeno alvo ou o seu epitope imunológico que seja relevante. Nesta forma de realização da invenção, os anticorpos são na sua origem monoclonais ou policlonais.

Moléculas de anticorpos exemplares são as moléculas intactas de imunoglobulina, moléculas de imonuglobulina substancialmente intactas ou as porções de uma molécula de imunoglobulina que contêm o local de ligação do antígeno, incluindo as porções de moléculas de imunoglobina conhecidas na técnica como F(ab), F(ab'), F(ab')₂ e F(v). Os anticorpos

policlonais ou monoclonais podem ser produzidos através dos processos conhecidos na técnica. (Kohler e Milstein (1975) Nature 256, 495-497; Campbell "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas" em Burton e outros (eds.) (1985) "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology" volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam). Os anticorpos ou os fragmentos de ligação de antígenos podem ser produzidos também através de engenharia genética. A tecnologia para a expressão de genes quer de cadeias pesadas quer de cadeias leves na E. Coli é o sujeito dos pedidos de Patente PCT com os números de publicação WO 901443, WO 901443 e WO 901424 e em Huse e outros (1989) Science 246: 1275-1281.

Numa forma de realização os anticorpos da presente invenção são usados em testes imunológicos destinados a detectarem o novo antígeno que interessa nas amostras biológicas.

Numa forma de realização, os anticorpos da presente invenção gerados através de imunização com um vírus de vaccinia recombinado exprimindo um TAA e exprimindo B7-1, ICAM-1 e LFA-3 são usados para avaliar a presença do TAA a partir de uma biopsia de tecido de um mamífero afectado com um cancro exprimindo o TAA usando imunocitoquímica. Uma tal avaliação da delineação do antígeno TAA no tecido doente pode ser usada para prognosticar a progressão da doença num mamífero afectado com a doença ou a eficácia da imunoterapia. Nesta forma de realização, os exemplos de TAAs incluem, de um modo não limitativo, CAA, PSA, e MUC-1. Os processos convencionais para imunohistoquímica são descritos em (Harlow e Lane (eds.) (1988) em "Antibodies a Laboratory Manual", Cold Spring

Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque; Ausubel e outros (eds.) (1987). Nos Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons (Nova Iorque, Nova Iorque).

Numa outra forma de realização os anticorpos da presente invenção são usados para imunoterapia. Os anticorpos da presente invenção podem ser usados na imunoterapia passiva.

Ao fornecer a um paciente os fragmentos de ligação de anticorpos ou de antigenios a um recipiente mamífero, de preferência um humano, a dosagem dos fragmentos de ligação de anticorpos ou de antigenios irá variar dependendo de factores como sejam a idade, o peso, a altura, o sexo, a condição médica geral, a condição médica anterior do mamífero e afins.

Os fragmentos de ligação de anticorpos ou de antigenios da presente invenção destinam-se a ser fornecidos ao recipiente numa quantidade suficiente para evitar, diminuir ou atenuar a severidade, a extensão ou a duração da doença ou infecção.

Os anticorpos anti ediotípicos ocorrem normalmente no decurso das respostas imunes, e uma porção do anticorpo anti ediotípico assemelha-se epitope que induziu a resposta imune original. Na presente invenção, o gene da imunoglobulina ou uma porção do mesmo de um anticorpo cujo local de ligações reflecte um antígeno alvo de um estado de doença, está incorporado no genoma ou numa porção do mesmo de um vírus de genoma, isolado ou em combinação com um gene ou com uma porção do mesmo de três moléculas imunoestimuladoras, sendo o vírus recombinado resultante capaz de retirar uma resposta imune celular ou humoral ao antígeno.

A descrição das formas de realização específicas irão revelar totalmente o tipo geral de invenção que terceiros poderão facilmente modificar e/ ou adaptar para várias finalidades tais formas de realização específicas sem sair do conceito geral, e, deste modo, tais adaptações e modificações deverão considerar-se como compreendidas dentro do significado e do âmbito dos equivalentes das formas de realização reveladas.

Todas as referências e patentes mencionadas deverão ser consideradas como incorporadas na presente a título de referência.

Exemplos 1

Geração de vaccinia recombinada, rV-TRICOM(mul) n° vT171

A origem do vírus parental da vaccinia é a estirpe do New York City Board of Health e foi obtida por Wyeth do New York City Board of Health e tratado de modo a criar uma Semente de Vacina Small Pox. Os Flow Laboratories receberam uma amostra liofilizada da Semente de Vacina Small Pox, lote 3197, Tratamento 28 dos Drs. Chanock e Moss (National Institute of Health). Esta semente de vírus foi tratada com éter e purificada com placas três vezes.

Para a geração do rV-TRICOM(mul) um vector plasmida designado como pT5032 foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas no gene M2L (30K) que se encontra localizado na região Hind III M da região do genoma da vaccinia. O gene da morina LFA-3 encontra-se sob o controle

de transcrição do promotor (34) da vaccinia 30K (M2L) estando o gene da morina ICAM-1 sob o controlo do promotor (18) da vaccinia 13 e o gene da morina B7,1 encontra-se sob o controlo do promotor (32) sintético antecipado/ tardio (se/L). estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região Hind III M do genoma da vaccinia (ver Figura 1). As sequencias de ladeamento incluem o gene (33) hospedeiro da vaccinia K1L. um derivado da estripe Wyeth da vaccinia foi usada como vírus parental na construção do vírus de vaccinia recombinado. Este vírus parental, designado vTBC33, tem a falta de um gene funcional K1L e, deste modo, não pode formar de um modo eficaz replicam-se nas células do rim do coelho RK₁₃ (38). A geração de vaccinia recombinada foi conseguido através de recombinação homologa entre as sequencias de vaccinia no genoma de vaccinia vTBC33 e nas correspondentes sequencias em pT5032 nas células RK₁₃ infectadas com vaccinia, transfectadas com pT5032. o vírus recombinado, designado como vT171 foi seleccionado através do crescimento nas células RK₁₃ (ATCC, CCL 37). Foram retiradas placas da camada simples da célula e os seus genes foram mais propagados. Duas rondas de isolamento das placas e a recolocação de placas nas células RK₁₃ tiveram como resultado a purificação do recombinado desejado. A estrutura genómica do vT171 encontra-se ilustrada na Figura 4A.

Exemplos 2

Geração de vaccinia recombinada, rV-TRICOM(mu2) n° vT191

Para a geração do rV-TRICOM(mu2) um vector plasmida designado como pT5047 foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas no gene da timidina quinase (TK) que se encontra localizado na região Hind III J da região do genoma da vaccinia. O gene da morina B7,1 encontra-se sob o controlo do promotor (se/L), o gene da morina LFA-3 encontra-se sob o controlo de transcrição do promotor (13), e o gene da morina ICAM-1 sob o controlo do promotor (39) da vaccinia 7,5K. De um modo adicional, o gene E. Coli lacZ, sob o controlo do promotor (15) do vírus de pox de aviário é incluído como uma triagem do gene recombinado. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região Hind III J do genoma da vaccinia (ver Figura 2). O material isolado purificado com placas de Wyeth (New York City Board of Health) sendo uma estirpe de vaccinia, foi usada como vírus parental para a vacina recombinada. A geração de vírus de vaccinia de vírus recombinado foi conseguida através da recombinação homóloga entre as sequências de vaccinia no genoma de vaccinia de Wyeth, e as sequências correspondentes em pT5047 nas células infectadas com vaccinia Hu 143TK (Bacchetti e Graham 1977), transfectada com pT047. O vírus recombinado foi identificado usando a selecção para vírus TK na presença de bromo-desoxiuridina (BudR) em combinação com um teste cromogénico, efectuado em placas virais in situ que detecta a expressão do produto do gene lacZ na presença de indolilo-beta-D-galactocide halogenado (Bluo-gal), de acordo com o anteriormente descrito (31) as placas virais que espriam lacZ apresentavam-se azuis de encontro a um fundo transparente. As placas positivas, designadas como vT199 foram recolhidas da camada simples de células e os seus genes foram, preenchidos de acordo com as condições de selecção

acima descritas. Em outros vírus recombinados, seleccionados e purificados deste modo as únicas placas que se apresentavam sob estas condições de selecção eram azuis, e estas placas azuis eram facilmente isoladas e purificadas. No entanto, no caso de vT199, somente as placas brancas eram observadas na segunda ronda de purificação da placa, não eram aparentes quaisquer placas azuis. Um novo conjunto de placas azuis foi recolhido e preenchido uma vez mais, somente as placas brancas foram observadas na segunda ronda de purificação de placas. Uma tentativa final usando um outro conjunto de placas azuis deu origem tanto a placas azuis como a placas brancas após a segunda ronda de purificação de placas. As placas azuis foram seleccionadas e plaqueadas. Duas rondas adicionais de purificação de placas (um total de quatro rondas) deu origem a vírus recombinados que eram cem % azuis. A estrutura genómica do vT199 recombinado encontra-se ilustrada na Figura 4B.

Exemplo 3

Geração de vaccinia recombinada, rV-TAA/TRICOM(mu)

Para a geração do rV-TAA/TRICOM(mu) um vector plasmida construído de modo a orientar a inserção das sequências estranhas no genoma da vaccinia. O gene TAA, o gene da morina LFA-3, o gene da morina ICAM-1 e o gene da morina B7,1 encontram-se sob o controlo de uma pluralidade de promotores. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir do genoma da vaccinia a partir dos quais as sequências estranhas vão ser inseridas. A geração de vírus de vaccinia de vírus recombinado foi conseguida através da

recombinação homóloga entre as sequências de vaccinia no genoma de vaccinia e as sequências correspondentes no vector plasmida nas células infectadas com vaccinia, transfectadas com o vector plasmida. As placas recombinadas são escolhidas a partir da camada simples de células sob condições selectivas e a sua progenia é mais propagada. Rondas adicionais de isolamento de placas e de substituição de placas têm como resultado a purificação do vírus recombinado desejado.

Exemplo 4

Geração de vaccinia recombinada, rV-MUC-1/TRICOM(mu)

Para a geração do rV-MUC-1/TRICOM(mu) um vector plasmida é construído de modo a orientar a inserção das sequências estranhas no genoma da vaccinia. O gene MUC-1, o gene da morina LFA-3, o gene da morina ICAM-1 e o gene da morina B7,1 encontram-se sob o controlo de uma pluralidade de promotores. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir do genoma da vaccinia a partir dos quais as sequências estranhas vão ser inseridas. A geração de vírus de vaccinia de vírus recombinado foi conseguida através da recombinação homóloga entre as sequências de vaccinia no genoma de vaccinia e as sequências correspondentes no vector plasmida nas células infectadas com vaccinia, transfectadas com o vector plasmida. As placas recombinadas são escolhidas a partir da camada simples de células sob condições selectivas e a sua progenia é mais propagada. Rondas adicionais de isolamento de placas e de substituição de

placas têm como resultado a purificação do vírus recombinada desejado.

Exemplo 5

Geração de vaccinia recombinada, rV-CEA/TRICOM(mu) n° vT172

Para a geração do rV-CEA/TRICOM(mu) um vector plasmida designado como pT5031 foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas no gene M2L (30K) que se encontra localizado na região Hind III M da região do genoma da vaccinia. O gene CEA encontra-se sob o controlo do promotor (13) 40K o gene da morina LFA-3 encontra-se sob o controlo do promotor 30K o gene da morina ICAM-1 encontra-se sob o controlo do promotor (13) e o gene da B7,1 encontra-se sob o controlo do promotor se/L. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região Hind III M do genoma da vaccinia, incluindo o gene hospedeiro da vaccinia K1L, vTBC33, acima descrito, que foi usado como vírus parental na construção do vírus recombinado da vaccinia. A geração do vírus de vaccinia recombinado foi conseguida através de recombinação homóloga entre as sequências de vaccinia no genoma de vaccinia vTBC33 e nas correspondentes sequencias em pT5031 nas células RK₁₃ infectadas com vaccinia, transfectadas com pT5031. O vírus recombinado, designado como vT172 foi seleccionado através do crescimento nas células RK₁₃ da forma acima descrita. Foram retiradas placas da camada simples da célula e os seus genes foram mais propagados. Duas rondas de isolamento das placas e a recolocação de placas nas células RK₁₃ tiveram como

resultado a purificação do recombinado desejado. A estrutura genômica do vT172 encontra-se ilustrada na Figura 4C.

Exemplo 6

Geração de pox de aviário recombinado, rF-TRICOM(mu) n° vT222

A origem do vírus de pox de aviário parental foi purificado através de placas a partir de uma amostra de uma vacina destinada a aves autorizada pela USDA a POXVAC-TC, que é fabricada pela Schering-Plough Corporation. O material para a produção de POXVAC-TC foi uma amostra de embrião de frango da Vineland Laboratories que estiveram na origem da vacina de pox de aviário obtida pela Schering-Plough. O vírus foi feito passar duas vezes pela membrana cloroalantoica dos ovos de galinha de modo a produzir os vírus de origem. Os vírus de origem foram feitos passar mais 27 vezes nos fibroblastos do embrião de frango de modo a preparar a base do POXVAC-TC. De modo a preparar os conjuntos de vírus para a geração dos lotes de produtos POXVAC-TC a base do POXVAC-TC foi feita passar duas vezes nos fibroblastos de embrião de frango. Uma amostra de POXVAC-TC com o n° de série 961125 foi purificado através de placas por três vezes em células primárias da pele do embrião do pinto.

Para a geração do rF-TRICOM(mu) um vector plasmida designado como pT8001 foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas na região BamHI J do genoma de pox de aviário. O gene da morina B7,1 encontra-se sob o controle do promotor se/L, o gene da morina LFA-3 encontra-se sob o controle de transcrição do promotor (13), e o gene da morina

ICAM-1 sob o controlo do promotor 7,5K e o gene lacZ encontra-se sob o controlo do promotor C1. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região BAMHI J do genoma da pox de aviário (ver Figura 5). O material isolado purificado com placas da estirpe de pox de aviário POXVAC-TC (Schering Plough Corporation), foi usada como vírus parental para a vacina recombinada. A geração de vírus de pox de aviário recombinado foi conseguida através da recombinação homologa entre as sequências de pox de aviário no genoma de pox de aviário e as sequências correspondentes em pT8001 nas células primárias da pele dos embriões de pinto infectadas com pox de aviário, transfectadas com pT8001. O vírus recombinado foi identificado usando o teste cromogenico para o gene lacZ acima descrito. As placas virais que espremiavam lacZ apresentavam-se azuis de encontro a um fundo transparente. As placas positivas, designadas como vT222 foram recolhidas da camada simples de células e os seus genes foram, preenchidos. Seis rondas de isolamento de placas e de substituição de placas na presença de Blue-Gal resultaram na purificação do recombinado desejado. A estrutura genómica do vT222 encontra-se ilustrada na Figura 7A.

Exemplo 7

Geração de pox de aviário recombinado, rF-TAA/TRICOM(mu)

Para a geração do rF-TAA/TRICOM(mu) um vector plasmida foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas na região BamHI J do genoma de pox de aviário. O gene TAA, o gene da morina LFA-3, o gene da morina ICAM-1 e o gene da morina B7,1 encontra-se sob o controlo de uma

pluralidade de promotores. De um modo adicional o gene lacZ encontra-se sob o controlo do promotor Cl. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região BAMHI J do genoma da pox de aviário. O material isolado purificado com placas da estirpe de pox de aviário POXVAC-TC (Schering Plough Corporation), foi usada como vírus parental para a vacina recombinada. A geração de vírus de pox de aviário recombinado foi conseguida através da recombinação homóloga entre as sequências de pox de aviário no genoma de pox de aviário e as sequências correspondentes no vector plasmida das células primárias da pele dos embriões de pinto infectadas com pox de aviário, transfectadas com vector plasmida. O vírus recombinado foi identificado usando o teste cromogenico para o gene lacZ acima descrito. As placas virais que espremiam lacZ apresentavam-se azuis de encontro a um fundo transparente. As placas positivas foram recolhidas da camada simples de células e os seus genes foram preenchidos. Rondas adicionais de placas e de substituição de placas na presença de Blue-Gal resultaram na purificação do vírus desejado.

Exemplo 8

Geração de pox de aviário recombinado, rF-MUC-1/TRICOM(mu)

Para a geração do rF-MUC-1/TRICOM(mu) um vector plasmida foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas na região BamHI J do genoma de pox de aviário. O gene MUC-1, o gene da morina LFA-3, o gene da morina ICAM-1 e o gene da morina B7,1 encontra-se sob o controlo de uma pluralidade de promotores. De um modo adicional o gene lacZ

encontra-se sob o controlo do promotor Cl. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região BAMHI J do genoma da pox de aviário. O material isolado purificado com placas da estirpe de pox de aviário POXVAC-TC (Schering Plough Corporation), foi usada como vírus parental para a vacina recombinada. A geração de vírus de pox de aviário recombinado foi conseguida através da recombinação homologa entre as sequências de pox de aviário no genoma de pox de aviário e as sequências correspondentes no vector plasmida das células primárias da pele dos embriões de pinto infectadas com pox de aviário, transfectadas com vector plasmida. O vírus recombinado foi identificado usando o teste cromogenico para o gene lacZ acima descrito. As placas virais que espremiam lacZ apresentavam-se azuis de encontro a um fundo transparente. As placas positivas foram recolhidas da camada simples de células e os seus genes foram preenchidos. Rondas adicionais de placas e de substituição de placas na presença de Bluo-Gal resultaram na purificação do vírus desejado.

Exemplo 9

Geração de vaccinia recombinada, rV-CEA/TRICOM(mu) n° vT194

Para a geração do rV-CEA/TRICOM(mu) um vector plasmida designado pT5049 foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas na região BamHI J do genoma de pox de aviário. O gene CEA encontra-se sob o controlo do promotor da vaccinia 40K, o gene da morina B7,1 encontra-se sob o controlo do promotor se/L, o gene LFA-3 encontra-se sob o controlo transcripcional do promotor 13, o gene da morina

ICAM-1 encontra-se sob o controlo transcripcional do promotor da vaccinia 7,5K, e o gene lacZ encontra-se sob o controlo do promotor C1. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região BAMHI J do genoma da pox de aviário (ver Figura 6). O material isolado purificado com placas da estirpe de pox de aviário POXVAC-TC (Schering Plough Corporation), foi usada como vírus parental para a vacina recombinada. A geração de vírus de pox de aviário recombinado foi conseguida através da recombinação homóloga entre as sequências de pox de aviário no genoma de pox de aviário e as sequências correspondentes em pT5049 nas células primárias da pele dos embriões de pinto infectadas com pox de aviário, transfectadas com pT5049. O vírus recombinado foi identificado usando o teste cromogenico para o gene lacZ acima descrito. As placas virais que espremiam lacZ apresentavam-se azuis de encontro a um fundo transparente. As placas positivas, designadas como vT194, foram recolhidas da camada simples de células e os seus genes foram preenchidos. Cinco rondas de placas de isolamento e de substituição de placas na presença de Bluo-Gal resultaram na purificação do recombinado desejado. A estrutura genómica do pox de aviário recombinado vT194 encontra-se ilustrado na Figura 7B.

Exemplo 10

Geração de vaccinia recombinada, rV-TRICOM(hu) n° vT224

Para a geração do rV-TRICOM(hu) um vector plasmida designado pT5064 foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas no interior do gene timidina quinase (TK), o qual se encontra localizado na região Hind III J no

genoma da vaccinia. O gene humano LFA-3 encontra-se sob o controle do promotor 30K, o gene humano ICAM-1 encontra-se sob o controle do promotor 13 e o gene humano B7,1 encontra-se sob o controle do promotor se/L. De um modo adicional lacZ da E. Coli encontra-se sob o controle do promotor C1, estando incluído como uma triagem para o gene recombinado. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região HIND III J do genoma da vaccinia (ver Figura 8). O material isolado purificado com placas da estirpe da vaccinia da Wyeth (New York City Board of Health) foi usada como vírus parental para a vacina recombinada. A geração de vírus de vaccinia recombinado foi conseguida através da recombinação homóloga entre as sequências de vaccinia no genoma de vaccinia da Wyeth e as sequências correspondentes em pT5064 nas células CV-1 (ATTC, CCL 70) infectadas com vaccinia, transfectadas com pT5064. O vírus recombinado foi identificado usando o teste cromogenico para o gene lacZ acima descrito. As placas virais que espremiam lacZ apresentavam-se azuis de encontro a um fundo transparente. As placas positivas, designadas como vT224, foram recolhidas da camada simples de células e os seus genes foram preenchidos. Cinco rondas de placas de isolamento e de substituição de placas na presença de Bluo-Gal resultaram na purificação do recombinado desejado. A estrutura genômica do recombinado vT224 encontra-se ilustrado na Figura 9A.

Exemplo 11

Geração de vaccinia recombinada, rV-TAA/TRICOM(hu)

Para a geração do rV-TAA/TRICOM(hu) um vector plasmida foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas no interior do gene timidina quinase (TK), o qual se encontra localizado na região Hind III J no genoma da vaccinia. O gene humano TAA, o gene humano LFA-3, o gene humano ICAM-1, o gene humano B7,1 e o gene lacZ da E. Coli encontram-se sob o controlo de uma pluralidade de promotores de pox vírus. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região HIND III J do genoma da vaccinia. O material isolado purificado com placas da estirpe da vaccinia da Wyeth (New York City Board of Health) foi usada como vírus parental para a vacina recombinada. A geração de vírus de vaccinia recombinado foi conseguida através da recombinação homóloga entre as sequências de vaccinia no genoma de vaccinia da Wyeth e as sequências correspondentes no vector plasmida nas células CV-1 (ATTC, CCL 70) infectadas com vaccinia, transfectadas com o plasmida. O vírus recombinado foi identificado usando o teste cromogenico para o gene lacZ acima descrito. As placas virais que espremiavam lacZ apresentavam-se azuis de encontro a um fundo transparente. As placas positivas foram recolhidas da camada simples de células e os seus genes foram preenchidos. Rondas adicionais de placas de isolamento e de substituição de placas na presença de Bluo-Gal resultaram na purificação do recombinado desejado.

Exemplo 12

Geração de pox de aviário recombinado, rF-TAA/TRICOM(hu)

Para a geração do rF-TAA/TRICOM(hu) um vector plasmida designado foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas na região BamHI J do genoma de pox de aviário. O gene humano TAA, o gene humano LFA-3, o gene humano ICAM-1, o gene humano B7,1 e o gene lacZ da E. Coli encontram-se sob o controlo de uma pluralidade de promotores de pox vírus. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região BAMHI J do genoma da pox de aviário. O material isolado purificado com placas da estirpe de pox de aviário POXVAC-TC (Schering Plough Corporation), foi usada como vírus parental para a vacina recombinada. A geração de vírus de pox de aviário recombinado foi conseguida através da recombinação homóloga entre as sequências de pox de aviário no genoma de pox de aviário e as sequências correspondentes no vector plasmida nas células primárias da pele dos embriões de pinto infectadas com pox de aviário, transfectadas com o vector plasmida. A geração de vírus de vaccinia recombinado foi conseguida através da recombinação homóloga entre as sequências de vaccinia no genoma de vaccinia da Wyeth e as sequências correspondentes no vector plasmida nas células CV-1 (ATTC, CCL 70) infectadas com vaccinia, transfectadas com o plasmida. O vírus recombinado foi identificado usando o teste cromogenico para o gene lacZ acima descrito. As placas virais que espremiam lacZ apresentavam-se azuis de encontro a um fundo transparente. As placas positivas foram recolhidas da camada simples de células e os seus genes foram preenchidos. Rondas adicionais de placas de isolamento e de substituição de placas na presença de Bluo-Gal resultaram na purificação do recombinado desejado.

Exemplo 13

Geração de vírus de vaccinia recombinada, rV-CEA (6D) /TRICOM(bu) n° VT238

Para a geração do rV-CEA (6D) /TRICOM(bu) um vector plasmida, designado pT8016, foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas no interior do gene timidina quinase (TK), o qual se encontra localizado na região Hind III J no genoma da vaccinia. O gene CEA foi alterado através de mutação genética in vitro de modo a exprimir a totalidade da proteína que contem um epítopo modificado. A mutação alterou o aminoácido codificado na posição 576 de asparagina para ácido aspártico. O gene modificado, designado como CEA (6D) foi concebido de modo a aumentar as características de imunização de CEA (Zaremba e outros, 1997, Cancer Res. 57: 4570-4577). O gene CEA (6D) encontra-se sob o controlo do promotor 40K. O gene humano LFA-3 encontra-se sob o controlo do promotor 30K, o gene humano ICAM-1 encontra-se sob o controlo promotor 13 e o gene humano B7,1 encontra-se sob o controlo do promotor se/L. De um modo adicional lacZ da E. Coli encontra-se sob o controlo do promotor C1, estando incluído como uma triagem para o gene recombinado. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região HIND IIIJ do genoma da vaccinia (ver Figura 10). O material isolado purificado com placas da estirpe da vaccinia da Wyeth (New York City Board of Health) foi usada como vírus parental para a vacina recombinada. A geração de vírus de vaccinia recombinado foi conseguida através da recombinação homóloga entre as sequências de vaccinia no genoma de vaccinia da Wyeth e as sequências correspondentes

em pT8016 nas células CV-1 (American Type Culture Collection, (ATTC), Rockville, MD, CCL 70) infectadas com vaccinia, transfectadas com pT8016. O vírus recombinado foi identificado usando o teste cromogenico para o gene lacZ acima descrito. As placas virais que espremiam lacZ apresentavam-se azuis de encontro a um fundo transparente. As placas positivas, designadas como vT224, foram recolhidas da camada simples de células e os seus genes foram preenchidos. Cinco rondas de placas de isolamento e de substituição de placas na presença de Bluo-Gal resultaram na purificação do recombinado desejado. A estrutura genômica do vírus de vaccinia recombinado vT238 encontra-se ilustrado na Figura 11.

Exemplo 14

Geração de vírus de pox de aviário recombinado, rF-TRICOM(mu)
nº vT251

Para a geração do rF-TRICOM(mu) um vector plasmida designado pT8019 foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas na região BamHI J do genoma de pox de aviário. O gene da morina LFA-3 encontra-se sob o controlo do promotor 30K, o gene da morina ICAM-1 sob o controlo do promotor 13, o gene da morina B7,1 encontra-se sob o controlo do promotor se/L, e o gene lacZ encontra-se sob o controlo do promotor Cl. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região BAMHI J do genoma da pox de aviário (ver Figura 12). O material isolado purificado com placas da estirpe de pox de aviário POXVAC-TC (Schering Plough Corporation), foi usada como vírus parental para a

vacina recombinada. A geração de vírus de pox de aviário recombinado foi conseguida através da recombinação homologa entre as sequencias de pox de aviário no genoma de pox de aviário e as sequencias correspondentes em pT8019 nas células primárias da pele dos embriões de pinto infectadas com pox de aviário, transfectadas com pT8019. O vírus recombinado foi identificado usando o teste cromogenico para o gene lacZ acima descrito. As placas virais que espremiavam lacZ apresentavam-se azuis de encontro a um fundo transparente. As placas positivas, designadas como vT251 foram recolhidas da camada simples de células e os seus genes foram, preenchidos. Três rondas de isolamento de placas e de substituição de placas na presença de Bluo-Gal resultaram na purificação do recombinado desejado. A estrutura genômica do vT251 encontra-se ilustrada na Figura 13A.

Exemplo 15

Geração de vírus de pox de aviário recombinado, rF-TRICOM(hu)
nº vT232

Para a geração do rF-TRICOM(hu) um vector plasmida designado pT5072 foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas na região BamHI J do genoma de pox de aviário. O gene da morina LFA-3 encontra-se sob o controlo do promotor 30K, o gene da morina ICAM-1 sob o controlo do promotor 13, o gene da morina B7,1 encontra-se sob o controlo do promotor se/L, e o gene lacZ encontra-se sob o controlo do promotor C1. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região BAMHI J do genoma da pox de aviário (ver Figura 14). O material isolado purificado com

placas da estirpe de pox de aviário POXVAC-TC (Schering Plough Corporation), foi usada como vírus parental para a vacina recombinada. A geração de vírus de pox de aviário recombinado foi conseguida através da recombinação homóloga entre as sequências de pox de aviário no genoma de pox de aviário e as sequências correspondentes em pT5072 nas células primárias da pele dos embriões de pinto infectadas com pox de aviário, transfectadas com pT5072. O vírus recombinado foi identificado usando o teste cromogênico para o gene lacZ acima descrito. As placas virais que espremiavam lacZ apresentavam-se azuis de encontro a um fundo transparente. As placas positivas, designadas como vT232 foram recolhidas da camada simples de células e os seus genes foram, preenchidos. Três rondas de isolamento de placas e de substituição de placas na presença de Bluo-Gal resultaram na purificação do recombinado desejado. A estrutura genômica do vT232 encontra-se ilustrada na Figura 13B.

Exemplo 16

Geração de pox de aviário recombinado, rF-MUC-1/TRICOM(mu) n° vT250

Para a geração do rF-MUC-1/TRICOM(mu) um vector plasmida designado como pT8020 foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas na região BamHI J do genoma de pox de aviário. Uma versão truncada do gene MUC-1 foi usada, e consistia pela sequência de sinais, pela sequência de repetição em cadeia de 10 cópias, e pela sequência de codificação única 3' (SEQ ID NO: 41). A sequência de nucleotídeos da região de repetição em cadeia foi alterada de

modo a minimizar a homogenia entre as repetições sem alterar a sequência de aminoácidos. O gene estava contido num fragmento 1881 bp que inclui a sequência de codificação truncada, seis nucleotidos da região 5' que não foi alvo de translação, e 186 nucleotidos da região 3' sem translação (Gendeler e outros 1990, J. Biol. Chem. 265: 15286-15293). O gene da morina LFA-3 encontra-se sob o controlo do promotor 30K, o gene da morina ICAM-1 sob o controlo do promotor 13, o gene da morina B7,1 encontra-se sob o controlo do promotor se/L, e o gene lacZ encontra-se sob o controlo do promotor C1. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região BAMHI J do genoma da pox de aviário (ver Figura 15). O material isolado purificado com placas da estirpe de pox de aviário POXVAC-TC (Schering Plough Corporation), foi usada como vírus parental para a vacina recombinada. A geração de vírus de pox de aviário recombinado foi conseguida através da recombinação homologa entre as sequências de pox de aviário no genoma de pox de aviário e as sequências correspondentes em pT8020 nas células primárias da pele dos embriões de pinto infectadas com pox de aviário, transfectadas com pT8020. O vírus recombinado foi identificado usando o teste cromogenico para o gene lacZ acima descrito. As placas virais que espremiam lacZ apresentavam-se azuis de encontro a um fundo transparente. As placas positivas, designadas como vT250 foram recolhidas da camada simples de células e os seus genes foram, preenchidos. Quatro rondas de isolamento de placas e de substituição de placas na presença de Bluo-Gal resultaram na purificação do recombinado desejado. A estrutura genómica do vT250 encontra-se ilustrada na Figura 16A.

Exemplo 17

Geração de pox de aviário recombinado, rF-MUC-1/TRICOM(hu) n° vT242

Para a geração do rF-MUC-1/TRICOM(hu) um vector plasmida designado pT2186 foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas na região BamHI J do genoma de pox de aviário. Foi usada uma versão truncada do gene MUC-1 de acordo com o descrito no anterior exemplo 16. O gene MUC-1 encontra-se sob o controlo do promotor 40K. O gene humano LFA-3 encontra-se sob o controlo do promotor 30K, o gene humano ICAM-1 encontra-se sob o controlo promotor 13 e o gene humano B7,1 encontra-se sob o controlo do promotor se/L, e o gene lacZ encontra-se sob o controlo do promotor Cl. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região BAMHI J do genoma da pox de aviário (ver Figura 17). O material isolado purificado com placas da estirpe de pox de aviário POXVAC-TC (Schering Plough Corporation), foi usada como vírus parental para a vacina recombinada. A geração de vírus de pox de aviário recombinado foi conseguida através da recombinação homóloga entre as sequencias de pox de aviário no genoma de pox de aviário e as sequencias correspondentes em pT2186 nas células primárias da pele dos embriões de pinto infectadas com pox de aviário, transfectadas com pT2186. O vírus recombinado foi identificado usando o teste cromogenico para o gene lacZ acima descrito. As placas virais que espremiavam lacZ apresentavam-se azuis de encontro a um fundo transparente. As placas positivas, designadas como vT242 foram recolhidas da camada simples de células e os seus genes foram, preenchidos.

Quatro rondas de isolamento de placas e de substituição de placas na presença de Bluo-Gal resultaram na purificação do recombinado desejado. A estrutura genômica do vT242 encontra-se ilustrada na Figura 16B.

Exemplo 18

Geração de pox de aviário recombinado, rF-CEA(6D)/TRICOM(hu)
n° vT236

Para a geração do rF-CEA(6D)/TRICOM(hu) um vector plasmida designado pT2187 foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas na região BamHI J do genoma de pox de aviário. O gene CEA(6D) encontra-se sob o controlo do promotor 40K. O gene humano LFA-3 encontra-se sob o controlo do promotor 30K, o gene humano ICAM-1 encontra-se sob o controlo promotor 13 e o gene humano B7,1 encontra-se sob o controlo do promotor se/L, e o gene lacZ encontra-se sob o controlo do promotor C1. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região BAMHI J do genoma da pox de aviário (ver Figura 18). O material isolado purificado com placas da estirpe de pox de aviário POXVAC-TC (Schering Plough Corporation), foi usada como vírus parental para a vacina recombinada. A geração de vírus de pox de aviário recombinado foi conseguida através da recombinação homologa entre as sequencias de pox de aviário no genoma de pox de aviário e as sequencias correspondentes em pT2187 nas células primárias da pele dos embriões de pinto infectadas com pox de aviário, transfectadas com pT2187. O vírus recombinado foi identificado usando o teste cromogenico para o gene lacZ acima descrito. As placas virais que espremiam

lacZ apresentavam-se azuis de encontro a um fundo transparente. As placas positivas, designadas como vT236 foram recolhidas da camada simples de células e os seus genes foram, preenchidos. Oito rondas de isolamento de placas e de substituição de placas na presença de Blu-Gal resultaram na purificação do recombinado desejado. A estrutura genómica do vT236 encontra-se ilustrada na Figura 16C.

Exemplo 19

Geração de pox de aviário recombinado, rF-PSA/PSMA/TRICOM(hu)
nº vT257

Para a geração do rF-PSA/PSMA/TRICOM(hu) um vector plasmida designado pT5080 foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas na região BamHI J do genoma de pox de aviário. O gene que codifica PSA foi isolado através da amplificação da reacção de cadeia de polimerase do cDNA derivado do RNA da linha de células LNCaP humano (CRL 1740, American Type Culture Collection, (ATTC), Rockville, MD). O gene estava contido num fragmento 1346 bp que inclui a totalidade da sequência de codificação de PSA, 41 nucleótidos da região 5' sem translação e 552 nucleótidos da região 3' sem translação (Lundwall e Lilja, 1987, FEBS Lett. 214: 317-322). O gene que codifica PSMA foi isolado através da amplificação da reacção de cadeia de polimerase do cDNA derivado do RNA da linha de células LNCaP humano. O gene estava contido num fragmento 2298 bp que inclui a totalidade da sequência de codificação de PSMA, 26 nucleótidos da região 5' sem translação e 19 nucleótidos da região 3' sem translação (Israeli e outros, 1993, Cancer Res. 53: 227-230).

O gene PSA encontra-se sob o controlo do promotor 40K e o gene PSMA encontra-se sob o controlo do promotor 7,5K. O gene humano LFA-3 encontra-se sob o controlo do promotor 30K, o gene humano ICAM-1 encontra-se sob o controlo do promotor 13 e o gene humano B7,1 encontra-se sob o controlo do promotor se/L, e o gene lacZ encontra-se sob o controlo do promotor C1. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região BAMHI J do genoma da pox de aviário (ver Figura 19). O material isolado purificado com placas da estirpe de pox de aviário POXVAC-TC (Schering Plough Corporation), foi usada como vírus parental para a vacina recombinada. A geração de vírus de pox de aviário recombinado foi conseguida através da recombinação homóloga entre as sequências de pox de aviário no genoma de pox de aviário e as sequências correspondentes em pT5080 nas células primárias da pele dos embriões de pinto infectadas com pox de aviário, transfectadas com pT5080. O vírus recombinado foi identificado usando o teste cromogénico para o gene lacZ acima descrito. As placas virais que espremiam lacZ apresentavam-se azuis de encontro a um fundo transparente. As placas positivas, designadas como vT257 foram recolhidas da camada simples de células e os seus genes foram, preenchidos. Cinco rondas de isolamento de placas e de substituição de placas na presença de Blue-Gal resultaram na purificação do recombinado desejado. A estrutura genómica do vT257 encontra-se ilustrada na Figura 16D.

Exemplo 20

Geração de vírus MVA recombinado, rMVA-TRICOM(mu) n° vT264

A Vaccinia Ancara Modificada (MVA) é um derivado atenuado da estripe Ancara do vírus de vaccinia (Meyer e outros, 1991, J. Gen. Virol. 72: 1031-10381). O material de base da vacina MVA usada é a vacina da Smallpox de humanos obtida a partir do Dr. Anton Mayr (Instituto de Microbiologia Médica, Munique). O material foi purificado em placas duas vezes em células primárias da pele de embriões de pinto.

Para a geração do rMVA-TRICOM(mu) um vector plasmida designado pT5085 foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas na região de eliminação III do genoma MVA (Meyer e outros, 1991, J. Gen. Virol. 72: 1031-1038). O gene da morina LFA-3 encontra-se sob o controlo do promotor 30K, o gene da morina ICAM-1 sob o controlo do promotor 13, o gene da morina B7,1 encontra-se sob o controlo do promotor se/L, e o gene lacZ encontra-se sob o controlo do promotor C1. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região de eliminação III do genoma de MVA (ver Figura 20). O material isolado purificado em placas do material da vacina MVA foi usado como o vírus parental para esta vacina recombinada. A geração da vacina recombinada MVA foi conseguida através da recombinação homóloga entre as sequências de MVA no genoma de MVA e as sequências correspondentes em pT5085 nas células primárias da pele dos embriões de pinto infectadas com MVA, transfectadas com pT5085. O vírus recombinado foi identificado usando o teste cromogenico para o gene lacZ acima descrito. As placas virais que espriam lacZ apresentavam-se azuis de encontro a um fundo transparente. As placas positivas, designadas como vT264 foram recolhidas da camada simples de células e os seus genes foram, preenchidos. Quatro rondas de isolamento de

placas e de substituição de placas na presença de Bluo-Gal resultaram na purificação do recombinado desejado. A estrutura genômica do vT264 encontra-se ilustrada na Figura 21A.

Exemplo 21

Geração de vírus MVA recombinado, rMVA-PSA/PSMA/TRICOM(hu) n° vT260

Para a geração do rMVA-PSA/PSMA/TRICOM(hu) um vector plasmida designado pT5084 foi elaborado de modo a dirigir a inserção das sequências estranhas na região de eliminação III do genoma MVA. O gene PSA encontra-se sob o controlo do promotor 40K e o gene PSMA encontra-se sob o controlo do promotor 7,5K. O gene humano LFA-3 encontra-se sob o controlo do promotor 30K, o gene humano ICAM-1 encontra-se sob o controlo do promotor 13 e o gene humano B7,1 encontra-se sob o controlo do promotor se/L, e o gene lacZ encontra-se sob o controlo do promotor Cl. Estas sequências estranhas são ladeadas por sequências de DNA a partir da região de eliminação III do genoma MVA (ver Figura 22). O material isolado purificado com placas da estirpe da vacina MVA foi usada como vírus parental para esta vacina recombinada. A geração de vírus de MVA recombinado foi conseguida através da recombinação homóloga entre as sequências de MVA no genoma de MVA e as sequências correspondentes em pT5084 nas células primárias da pele dos embriões de pinto infectadas com MVA, transfectadas com pT5084. O vírus recombinado foi identificado usando o teste cromogenico para o gene lacZ acima descrito. As placas virais que espremiavam lacZ apresentavam-se azuis de encontro a um

fundo transparente. As placas positivas, designadas como vT260 foram recolhidas da camada simples de células e os seus genes foram, preenchidos. Quatro rondas de isolamento de placas e de substituição de placas na presença de Bluo-Gal resultaram na purificação do recombinado desejado. A estrutura genómica do vT260 encontra-se ilustrada na Figura 21B.

Exemplo 22

Poxvirus recombinados

Os vírus individuais da vaccinia recombinados contendo ou o gene B7-1 (designado rV-B7-1) que codifica a molécula costimulatória da morina ou o gene que codifica a adesão intracelular da morina molécula 1 (designada rV-ICAM-1) foram já descritos (10, 11). O vírus da vaccinia recombinada contendo o gene para a morina CD48 [designados rV-LFA-3; a morina CD48 é o homólogo da LFA-3 (CD58) (6) humano] foi construído de um modo similar à rV-B7-1 e rV-ICAM-1, e já foi descrito (12). Em cada um destes vírus simples recombinados da vaccinia, o gene que codifica a molécula costimulatória foi colocado sob o controlo do promotor do vírus da vaccinia precoce/ atrasado 40K (15), e o transgénio foi inserido na região Hind III M do genoma do vírus da vaccinia da estirpe Wyeth de acordo com o descrito (13). Os vírus da pox de aviário recombinados foram construídos através da inserção das sequências estranhas na região BamHI J do genoma do vírus da pox de aviário da estirpe POXVAC-TC (Schering Plough Corporation) conforme descrito (14). Nos vírus recombinados contendo um único gene estranho, o gene encontra-se sob o

controle do promotor 40K da vaccinia. rV-B7-1/ICAM-1 é um vírus de vaccina recombinado que contem o gene da morina B7-1 sob o controle do promotor sintético precoce/ atrasado (sE/L) (16) e o gene da morina ICAM-1 encontra-se sob o controle do promotor 40K. rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3 é um vírus de vaccina recombinado que contem o gene da morina LFA-3 sob o controle do promotor (M2L) da vaccinia (17), o gene da morina ICAM-1 encontra-se sob o controle do promotor 13 da vaccinia (18) e o gene da morina B7-1 encontra-se sob o controle do promotor sintético precoce/ atrasado (sE/L), o gene da morina LFA-3 encontra-se sob o controle do promotor 13 e o gene da morina ICAM-1 encontra-se sob o controle do promotor 7,5K da vaccinia (19). O vírus da vaccinia não recombinado foi designado como V-Wyeth, enquanto que o vírus de pox de aviário não recombinado foi designado como WT-FP.

Exemplo 23

Expressão de Moléculas Costimulatórias Recombinadas

Para confirmar que cada um vectores recombinados pode exprimir o transgene adequado, a linha de células de adenocarcinoma da morina MC38 foi infectada com as várias estruturas de vaccinia ou de pox de aviário recombinadas, e a expressão de superfície das células do transgene foi demonstrada por citometria de fluxo (Figura 23). As células não infectadas (dados não ilustrados) e as células infectadas com um tipo selvagem de vaccinia não exprimiram qualquer uma das três moléculas costimulatorias. Esta observação foi confirmada por PCR (dados não ilustrados). Em contraste, as células infectadas com rV-B7-1 tornaram-se fortemente

positivas em relação à proteína B7-1; as células infectadas com rV-ICAM-1 tornaram-se positivas para ICAM-1; e as células infectadas com rV-LFA-3 tornaram-se positivas para a proteína LFA-3. Análises semelhantes de uma estrutura que contenha duas moléculas costimulatorias (rV-B7-1/ICAM-1) demonstraram a expressão B7-1 (78% positivo com uma intensidade fluorescente média (MFI) de 1012) e ICAM-1 (70% positivo com um MFI de 690). De um modo adicional, as células infectadas com a estrutura de genes múltiplos da vaccinia rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3 expresso ao mesmo tempo com as três moléculas costimulatórias. De modo a determinar se os vírus de pox de aviário recombinados exprimiam as suas proteínas recombinadas, as células MC38 foram infectadas com estruturas de pox de aviário de um modo semelhante (Figura 23). Uma vez mais, as células infectadas com o vírus de pox de aviário de um tipo selvagem WT-FP não conseguiram exprimir qualquer molécula costimulatória. As células infectadas com rF-B7-1 tornaram-se positivas para a proteína B7-1, e as células infectadas com rF-ICAM-1 tornaram-se +positivas para a proteína ICAM-1. Não foi construído um vector rF-LFA-3. No entanto, as células infectadas com a estrutura de genes múltiplos da pox de aviário rF-CEA/B7-1/ICAM-1/LFA-3 expressam ao mesmo tempo as três moléculas costimulatórias.

Caracterização dos vírus recombinados: análise fluorescente da expressão de superfície das proteínas

A linha de células de adenocarcinoma do cólon murina MC38 foi descrita (20). As células MC38 confluentes foram infectadas com estruturas de vaccinia (V-Wyeth, rV-B7-1, rV-ICAM-1, rV-LFA-3, rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3) em 5 MOI (multiplicidade da

infecção; PFU/célula) durante 5 horas. O CEA foi usado em uma das estruturas rF sendo somente um marcador de gene. Após a infecção as células foram recolhidas e marcadas com imunidade em anticorpos monoclonais conjugados FITC (MAb) específicos da murina CD80 (B7-1), CD54 (ICAM-1), ou CD48 (LFA-3; PharMingen, San Diego, CA). A fluorescência das células foi analisada com um citômetro FACSAN (Becton Dickinson, Mountain View, CA) com programas informáticos Lysis II.

Análise de Costimulação in vitro

Ratos fêmea C57BL/6 (entre 6 e 8 semanas de idade) foram obtidos em Taconic Farms (Germantown, NY). As células T nativas foram isoladas de um modo mecânico das células do baço dispersas de um modo mecânico ao longo de estiradores de células 70 m (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) de modo a isolar suspensões de células simples e os eritrocitos e as células mortas foram removidas por centrifugação em gradientes Ficoll-Hypaque (densidade = 1,119 g/ml) (Sigma, St. Louis, MO). As populações que consistem por aproximadamente 95% de células T foram obtidas através da passagem de células mononucleares do baço sobre duas colunas de lã de nylon de um modo sequencial (Robbins Scientific Corp., Sunnyvale, CA). Para certas experiências, as células T foram mais fraccionadas em populações de CD4⁺ e de CD8⁺ através da selecção negativa usando contas paramagnéticas anti-CD4 ou anti-CD8 (MiniMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). As células T em foram colocadas em recipientes de 10⁵ em pratos de fundo plano 96 (Costar, Cambridge, MA). As células de estimulador consistiam por células não infectadas de MC38 ou por células infectadas durante 5 horas com estruturas de

vaccinia de 5 MOI (V-Wyeth, rV-B7-1, rV-ICAM-1, rV-LFA-3, rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3) ou estruturas de pox de aviário (WT-FP, rF-ICAM-1, rF-CEA/B7-1/ICAM-1/LFA-3) fixo com 2% de paraformaldeído e adicionado a recipientes de 10^4 . As células em todos os recipientes foram cultivadas com um volume total de 200 μ l de meios completos (CM) [RPMI 1640 com soro fetal de córego (10%), glutamina (2 mM), piruvato de sódio (1 mM), Hepes (7 mM), gentamicina (50 μ g/ml), 2-mercaptoetanol (50 μ M), e aminoácidos não essenciais (0,1 mM), (Biofluids, Rockville, MD)] na presença de várias diluições (entre 5 e 0,625 μ g/ml durante 2 dias) de Convanavalin-A (Com A, Sigma). Is recipientes de controlo receberam células T, células de estimulador e unicamente meios. Para as experiências indicadas, anti-CD ligado a placas (1,5 μ g/recipiente - 0,012 μ g/recipiente) foram substituídas por células Com A. As células foram tituladas para as 12 - 18 h finais de incubação com 1 Ci/recipiente 3 H-Timidina (New England Nuclear, Wilmington, DE) e recolhidos com um recolhedor de células Tomtec (Wallac Incorporated, Gaithersburg, MD). A radioactividade incorporada foi medida por intermédio de contagem de cintilação líquida (Wallac 1205 Betaplate, Wallac, Inc.). Os resultados dos recipientes triplicados foram medidos e indicados como média CPM \pm SEM. Para as experiências indicadas, a análise de costimulação in vitro foi efectuada na presença ou de um específico MAb para a molécula costimulatória expressa ou para o anticorpo de controlo do isótopo correspondente (Hamster da Arménia IgG, policlonais). Os anticorpos usados para bloquear a proliferação de células T foram os hamster anti-murina CD80 (B7-1; clone 16-10A1), os hamster anti-murina CD54 (ICAM-1; clone 3E2), ou os hamster anti-murina CD48 (BCM-1; clone

HM48-1), todos eles da PharMingen. Todos os anti-corpos foram usados com uma concentração final de 25 μ g/ml.

Determinação da Capacidade da Molécula Costimulatória

As células T e as células de estimulador foram preparadas da forma acima descrita. As células de simulador fixas que exprimem uma ou mais moléculas costimulatórias foram adicionadas aos recipientes em proporções variáveis em combinação com células de estimulador fixas/infectadas com V-Wyeth até totalizarem 10^4 por recipiente. As células T (10^5 por recipiente) foram então adicionadas e as células foram cultivadas até um volume total de 200 μ l de CM na presença de 2,5 μ g/ml de Com A durante 2 dias e titulados para o final de 12 - 18 h de incubação com 1 μ Ci/recipiente 3 H-Timidina. A radioactividade incorporada foi medida através da contagem da cintilação de líquido como antes.

Análise de Citoquina

As populações de células T de $CD4^+$ e de $CD8^+$ foram preparadas da forma acima descrita e adicionadas a um recipiente de $2,5 \times 10^6$ numa placa de 6 recipientes (Costar). As populações de células foram preparadas da forma acima indicada e adicionadas a um recipiente de $2,5 \times 10^6$. As células foram cultivadas num volume total de 5 ml de CM na presença de 25 μ g/ml Com A durante 24 horas. Os fluidos sobrenadantes foram recolhidos e analisados em relação à murina IL-2, IFNy, TNF- α , GM-CSF, e IL-4 através de captação por ELISA de acordo com o anteriormente descrito (21). A sensibilidade à detecção era de 30, 100, 20, 20 e 20 pg/ml, respectivamente.

As populações de RNA das células estimuladas foram também analisadas pelo conjunto de teste de protecção de sondas múltiplas RNase (mpRPA). As sondas de RNA definidas para as citocinas de murina foram compradas a PharMingen. Os testes foram efectuados de acordo com a forma que foi anteriormente descrita (22). Os pares protegidos relativamente às sombras das citocinas de murina foram separados por intermédio de electroforese em geles de 6% de poliacrilamida. Os geles secos foram expostos a uma película Biomax (Kodak) a -70° C durante entre 24 e 72 horas. A radioactividade contida nas faixas foi quantificada usando um sistema de fosfoimager Storm (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). O CPM líquido para uma dada faixa foi calculado através da seguinte fórmula [cpm do gene da citocina menos com do fundo) e foi expresso como uma percentagem da transcrição do gene doméstico L32.

Exemplo 24

B7-1, ICAM-1 e LFA-3 Cooperam de um Modo Sinérgico para Aumentar a Proliferação das Células T.

As moléculas B7-1, ICAM-1 e LFA-3 demonstraram, de um modo individual costimular as células T. No entanto, como podem ter sido expressos simultaneamente em APC, foi difícil examinar os papéis relativos das moléculas costimulatórias individuais durante a indução das proliferações de células T (2). De modo a analisar a contribuição das moléculas B7-1, ICAM-1 e/ou LFA-3 para a indução da proliferação das células T, nativas, um modelo modificado in vitro (23, 24) foi empregue em que o primeiro sinal para a activação das células

T foi fornecido através de um reagente farmacológico (Con A). Um painel de células estimuladoras que se diferenciavam somente em moléculas costimuladoras foi criado usando a linha de células MC 38 infectadas com vírus de vaccinia recombinada (Figura 24A) ou com vírus de pox de aviário (Figura 24B) preparados de modo a exprimirem moléculas costimulatórias. O segundo sinal, ou sinal "costimulatório" foi distribuído à célula T através de uma ou mais moléculas costimulatórias expressas sobre a superfície destas células de estimulador MC38. Conforme se encontra ilustrado na Figura 24A, ambas as células não infectadas MC38 e MC38/V-Wyeth induziram a proliferação marginal de células T em todos os níveis de Con A examinados. O MC38/LFA-3 induziu um pequeno (2,1 vezes) mas significativo ($P < 0,05$) aumento na proliferação das células T. A distribuição do sinal-2 através de MC38/ICAM-1 induzia um aumento de 3,5 vezes na proliferação das células T a 25 $\mu\text{g/ml}$ Con A. MC38/B7-1 induziu um aumento de 7,8 vezes e de 16 vezes na proliferação a 2,5 e a 1,25 $\mu\text{g/ml}$ Con A respectivamente. No entanto, MC38/B7-1/ICAM-1/LFA-3 (células MC38 que exprimem em simultâneo todas as três moléculas costimulatórias) induziram um aumento de 17,5 vezes na proliferação de células T a 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Con A, e um aumento de 34 vezes a 1,25 $\mu\text{g/ml}$ Con A. De um modo adicional, a baixos níveis de Con A (0,625 $\mu\text{g/ml}$), expressão de ICAM-1 e de LFA-3 não induziram a proliferação de células T. Enquanto que B7-1 induziu a proliferação mensurável (20 000 CPM) a 0,625 $\mu\text{g/ml}$ Con A, a expressão em simultâneo de todas as três moléculas costimulatórias induziu um nível ainda mais elevado de proliferação (100 000 CPM) (Figura 24A). Estas experiências foram repetidas quatro vezes com resultados semelhantes.

As células de estimulador MC38 foram também preparadas através da infecção com vectores de pox de aviário recombinados (Figura 24B). Uma vez mais, os MC38 ou MC38/WT-FP não infectados induziram a proliferação marginal de células T a todos os níveis do Con A examinado. MC38/rF-ICAM-1 suportou um aumento de 2 vezes, MC38/rF-B7-1 suportou um aumento de 3,2 vezes e MC38/rF-B7-1/ICAM-1/LFA-3 suportou um aumento de 6 vezes na proliferação de células T a 2,5 µg/ml Con A. Resultados similares foram obtidos quando esta experiência foi repetida duas vezes mais. Resultados semelhantes foram também observados quando o primeiro sinal foi distribuído através de imobilizados anti-CD3 (dados não ilustrados). As diferenças notadas na proliferação suportada por MC38/rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3 e MC38/rF-B7-1/ICAM-1/LFA-3 (17,5 vezes contra 6 vezes) são possivelmente devidas aos níveis das proteínas recombinadas a seguir a um período de infecção de 5 horas (Figura 23). De um modo específico, aproximadamente 70% das células infectadas com rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3 exprimem as moléculas costimulatórias enquanto que aproximadamente 40% das células infectadas com rF-B7-1/ICAM-1/LFA-3 são positivas. As células positivas infectadas com os vectores rF exprimem B7-1 e ICAM-1 recombinados a níveis de 50% em relação às células infectadas com rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3 com as condições usadas.

Exemplo 25

Especificidade da Contribuição da Molécula Costimulatória na Proliferação de Células T.

De modo a confirmar ainda mais a especificidade da contribuição proliferativa de B7-1, de ICAM-1 ou de LFA-3, as células de estimulador MC38 foram uma vez mais preparadas através de infecção com V-Wyeth, com rV-B7-1, com rV-ICAM-1 ou com rV-LFA-3 e cultivadas em simultâneo com células T de murina nativas e com células de Con A na presença ou na ausência de MAb específico para a dada molécula costimulatória. Conforme se encontra ilustrado na Figura 3B, MC38B7-1 aumentou a proliferação das células T 4,5 vezes mais do que MC38N-Wyeth (Figura 25A). Esta proliferação acrescida foi inibida em 83% pela adição de um bloqueador MAb para a murina B7-1. Do mesmo modo, MC38/ICAM-1 (Figura 25C) aumentaram a proliferação em 2,25 vezes, o que foi então reduzido em 88% na presença de anti-murina ICAM-1 MAb. Finalmente, MC38/LFA-3 (Figura 25D) aumentaram a proliferação em 2,1 vezes, a qual foi então reduzida em 98% na presença de anti-murina CD48 MAb. Para cada um dos grupos, a incubação com o anticorpo de isótopo de controlo adequado (de acordo com o especificado em Materiais e Processos) não bloqueou a proliferação assinalada. Esta experiência foi repetida duas vezes mais com os mesmos resultados.

Exemplo 26

Determinação da Capacidade da Molécula Costimulatória

A modificação do teste de costimulação *in vitro* permitiu um cálculo quantitativo da capacidade relativa de B7-1, de ICAM-1 e/ou de LFA-3 para dar o segundo sinal de proliferação de células T. Com esse objectivo, as células de estimulador (células MC38 infectadas com vários vírus de vaccínia

recombinados) foram titulados por diluição com quantidades variáveis de células MC38 infectadas com V.Wyeth e cultivada em simultâneo com um número constante de células T na presença de 2,5 μ g/ml Con A. A relação entre as células MC38 e as células T permaneceu constante nestas experiências a 1:10. Conforme pode ver-se na Figura 4, MC38/LFA-3 (triângulos fechados) aumentou a proliferação das células T em relação a MC38/V-Wyeth (quadrados abertos) a partir de uma concentração de 40% (isto é, das células de estimulador do recipiente, 40% estavam infectadas com rV-LFA-3 e as restantes 60% estavam infectadas com V-Wyeth). MC38/ICAM-1 (círculos fechados) ou MC38B7-1 (losangos fechados) suportam uma proliferação acrescida a partir de uma concentração de 13% e de 6%, respectivamente. Por outro lado, MC38B7-1/ICAM-1/LFA-3 aumentaram a proliferação quando menos de 3% das células de estimulador contidas no vector da tríada (extrapolados para menos de 1% através da análise linear dos mínimos quadrados). Tendo em conta a curvas de titulação destas moléculas costimulatórias individuais foi notório que a extensão da proliferação mediada das células T mediada por ICAM-1 e por B7-1 foi de 3 vezes e de 6 vezes, respectivamente, mais potente do que a mediada somente por LFA-3. No entanto, é claro que a proliferação mais forte é mediada por B7-1/ICAM-1/LFA-3. Deve notar-se (Figura 26) que a concentrações de células relativamente baixas (isto é, quando de 3% a 6% das células MC38 se encontram a desempenhar as funções de células de estimulador), a expressão de LFA-3, de ICAM-1 e mesmo de B7-1 isoladamente não aumenta a activação das células T, enquanto que as três moléculas costimulatórias que exprimem as células de estimulador aumentam substancialmente a activação das células T. Os dados

na Figura 26 (encaixe) ilustra os resultados da proliferação obtidos quando 3% das células de estimulador MC38 se encontravam infectadas com os vectores assinalados. Como cada um dos recipientes continha 10^4 do total das células de MC38 infectadas e 10^6 das células T nativas, a relação efectiva entre o estimulador e as células T nessas culturas era de 0,003. Note-se que as células MC38 infectadas com a estrutura de dois genes (rV-B7-1/ICAM-1) induzia a reduzida, se alguma, proliferação das células T sob estas condições, enquanto que MC38B7-1/ICAM-1/LFA-3 aumentaram a proliferação de um modo substancial ($p < 0,0001$)

Exemplo 27

Costimulação de células de $CD4^+$ e de $CD6^+$

De modo a caracterizar ainda mais a resposta das células T às moléculas costimulatórias expressas de um modo isolado ou em combinação, a capacidade de B7-1, de ICAM-1 e de LFA-3 para costimular as células T purificadas $CD4^+$ e $CD6^+$ foi testada. A Figura 5 ilustra a proliferação de células de $CD4^+$ (Figura 27A) e de $CD6^+$ (Figura 27B) purificadas foi activada com concentrações abaixo do nível óptimo de Con A. A estratificação dos efeitos da célula de estimulador na proliferação foi similar às células $CD4^+$ e $CD6^+$: MC38/LFA-3 estimulou a proliferação mais fraca seguida por MC38/ICAM-1 e MC38/B7-1. MC38/B7-1/ICAM-1/LFA-3 foram as células de estimulador mais potentes para as células T $CD4^+$ e $CD6^+$. Estas experiências foram repetidas três outras vezes com resultados semelhantes. Deve notar-se que em concentrações muito baixas de Con A ($0,625 \mu\text{g/ml}$, Figura 5, painéis C e D), não se

verificou um aumento significativo da activação das células T $CD4^+$ e $CD6^+$ quando ou ICAM-1, ou LFA-3, ou B7-1 ou a combinação B7-1/ICAM-1 foi usada de modo a proporcionar o segundo sinal. No entanto, a activação substancial de ambos os subconjuntos de células T foi observado e empregue quando o vírus de vaccinia exprimia em simultâneo a tríada de moléculas costimulatórias. Foram notados resultados semelhantes quando o primeiro sinal foi distribuído através de anti-CD3 imobilizado (dados não ilustrados).

Foi notado que a costimulação B7-1 prolonga a meia vida de IL-2 mRNA e a regulação ascendente da transcrição de IL-2, o que tem como resultado a produção de quantidades consideráveis de IL-2 segregada (4, 25). De um modo adicional, a costimulação das células T com LFA-3 foi relatada como tendo um efeito numa pluralidade de citocinas, nomeadamente em IL-2 e em IFN- γ (6). De modo a determinar os efeitos qualitativos e quantitativos da costimulação através de moléculas de costimulação de moléculas simples ou múltiplas na produção de citocina, as células T de $CD4^+$ e $CD6^+$ purificadas foram uma vez mais alvo de cultura em simultâneo com várias células de estimulador que exprimem B7-1, ICAM-1 e LFA-3 de um modo isolado ou em combinação com a presença de 2,5 μ g/ml de Con A. Os fluidos sobrenadantes foram analisados para IL-2, para IFN- γ , para TNF- α , para GM-CSF e para L-4 após 24 horas. As MC38 (dados não ilustrados) e MC38N-Wyeth induziram uma quantidade marginal de IL-2 das células $CD4^+$ (Figura 28A), enquanto que MC38/B7-1 induziram 3 979 pg/ml. No entanto, a estimulação das células T com MC38B7-1/ICAM-1/LFA-3 induziram um aumento dez vezes superior de IL-2. Do mesmo modo MC38B7-1 induziu uma quantidade

marginal de IL-2 a partir das células CD8⁺ (Figura 28B), enquanto que MC38B7-1/ICAM-1/LFA-3 induziram um aumento vinte vezes superior (6 182 pg/ml). A produção de IFN- γ através de células T estimuladas foi também examinada. MC38B7-1 e MC38/LFA-3 induziram somente quantidades moderadas de IFN- γ a partir das células CD4⁺ (Figura 28C). Em contraste, a estimulação das células CD4⁺ com MC38B7-1/ICAM-1/LFA-3 induziram quatro vezes mais IFN- γ do que a estimulação com qualquer outra estrutura. A estimulação das células CD8⁺ com MC38B7-1/ICAM-1/LFA-3 induziram a maior quantidade de IFN- γ maior do que as seis vezes mais das células CD8⁺ estimuladas com qualquer uma das outras estruturas (Figura 28D). A estimulação de qualquer um dos tipos de células com qualquer estrutura não conseguiu mediar mudanças significativas ($p > 0,05$) nos níveis segregados de TNF- α , GM-CSF, ou IL-4 (dados não ilustrados). É notório que o fim predominante da estimulação através das estruturas de tríada (rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3) era a segregação de IL-2 a partir das células CD4⁺ e a segregação de IFN- γ a partir das células T CD8⁺. Estas experiências foram repetidas três vezes mais com resultados semelhantes. Foram também efectuados estudos comparando as células do estimulador infectadas com as estruturas de dois genes (rV-B7-1/ICAM-1) versus a estrutura de genes múltiplos (rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3) relativamente à sua capacidade para aumentar a produção de citocina por parte das células T. Foram somente observadas pequenas diferenças entre as duas na produção de IFN- γ quer por parte das células CD4⁺ quer por parte das células CD8⁺, ou na produção de IL-2 por parte das células CD8⁺. Mas observou-se uma diferença substancial na estimulação da produção de IL-2 por parte das células CD4⁺ (5

000 pg/ml empregando MC38/B7-1/ICAM-1 versus 39 6000 pg/ml empregando MC38/B7-1/ICAM-1/LFA-3).

A expressão de citocina das células T CD4⁺ e CD8⁺ estimuladas com uma ou várias moléculas costimulatórias foi também analisada ao nível do RNA utilizando o teste múltiplo RNase (mRPA). Um perfil radiográfico representativo e uma análise quantitativa de duas experiências independentes encontram-se ilustrados (Figura 29). Os níveis de IL-4, de IL-5, de IL-10, de IL-15 e de IL-6 foram similares aos das células T CD4⁺ estimuladas com MC38/V-Wyeth, com MC38/B7-1, MC38/ICAM-1, MC38/LFA-3, ou com MC38/B7-1/ICAM-/LFA-3 (Figura 29, histograma do painel B). Os níveis de expressão de IL-2 e de IL- γ eram os mais elevados nas células T CD4⁺ estimuladas com MC38/B7-1, MC38/ICAM-1, MC38/LFA-3 quando comparadas com as células CD4⁺ estimuladas com células MC38 que exprimem qualquer molécula costimulatória simples (Figura 29B). Níveis levemente mais elevados de IL-13, de IL-9 e de IL-6 foram também notados nas células CD4⁺ estimuladas com células MC38/B7-1, MC38/ICAM-1, MC38/LFA-3. A expressão dos genes de citocina foi também analisada nas células T CD8⁺ estimuladas. De entre os RNAs da citocina analisados, os níveis IL-2 e em especial IFN- γ eram significativamente mais altos quando estas células eram estimuladas com MC38/B7-1, MC38/ICAM-1, MC38/LFA-3, em comparação com as células T estimuladas com células MC38 que exprimem qualquer molécula costimulatória simples. Deste modo, o efeito sinérgico predominante da tríada de moléculas costimulatórias na produção de citocina foi de IL-2 nas células CD4⁺ e IFN- γ nas células T CD8⁺.

Exemplo 28

Efeito da costimulação de TRICOM da apoptose das células T Estimuladas

Estudos de Apoptose

De modo a determinar se a estimulação de células T com o sinal 1 e rV-TICOM iria levar à sobrevivência das células ou à morte programada das células (PCD), as células T CD8⁺ foram activadas com Con A para o sinal 1, cultivadas com células infectadas com V-WT, com rV-B7-1 ou com rV-TRICOM durante 48 h e plaqueadas de novo durante 24 h num meio de modo a medir a apoptose. A apoptose foi avaliada usando o teste de TÚNEL, de acordo com o descrito por Gavrieli, Y e ouros, J. Cell Biol 119: 493-501, 1992. As células T activadas pela combinação de MC38 e de Con A ou de MC38/V-WT e de Con A na ausência de sinais de costimulação apresentaram níveis elevados de apoptose espontânea ($31,3 \pm 3,8$ e $30,7 \pm 1$, respectivamente).

Os resultados demonstram claramente a apoptose na células T estimuladas com células MC38 na presença de Con A com ou sem a infecção de V-WT (isto é, na ausência do sinal 2). Enquanto que Con A com MC38/TRICOM estimularam claramente as células CD8⁺ até níveis bastante superiores do que a Con A com o MC38B7-1 e tiveram como resultado a produção de níveis mais elevados de IFN- γ e de IL-2, isto não resultou em qualquer grau mais elevado de apoptose.

Exemplo 29

Efeito Anti-tumor de rV-CEA/TRICOM in vivo

Foram realizados estudos para determinar se uma resposta imune específica do antígeno poderia ser aumentada usando um vector TRICOM. Uma vaccinia recombinada de quatro genes foi elaborada contendo o gene humano CEA e os genes B7-1, ICAM-1 e LFA-3, designados como rV-CEA/TRICOM, de acordo com o aqui descrito. Ratos fêmea de oito semanas C57 BL/6 (Taconic Farmas) ou ratos C57BL/6 transgênicos em relação ao CEA humano (Kass, E e outros *Câncer Res* 59: 676-683, 1999) foram vacinados através da raspagem da cauda com Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ou uma vez com 10^7 pfu rV-CEA, rV-CEA/B7-1 ou com rV-CEA/TRICOM, tendo os baços sido recolhidos 22 dias mais tarde. A actividade linfoproliferativa dos esplenócitos foi analisada da forma descrita anteriormente (5).

Conforme pode ver-se na Figura 30 (encaixe), as células T do baço dos ratos vacinados com rV-TRICOM apresentavam níveis mais elevados de estimulação específica de CEA quando comparada com as células do grupo de ratos vacinados com rV-CEA; a ovalbumina e a Con A foram usadas como controlos. Foi então realizada uma experiência de modo a determinar se rV-CEA/TRICOM poderiam induzir a imunidade a longo prazo. Os ratos (5 por grupo) foram vacinados uma vez ou com V-WT, ou com rV-CEA ou com rV-CEA/TRICOM. Cem dias mais tarde, os ratos foram contaminados com uma dose elevada (1×10^6) de células de carcinoma do cólon MC38 que exprimem CEA (5). Todos os ratos que receberam V-WT e rV-CEA sucumbiram aos tumores enquanto que todos os ratos vacinados com rV-TRICOM

estavam vivos 50 dias após ter ocorrido a contaminação (Fig. 30).

Ratos transgênicos CEA (Kass 1999, *ibid*; Thompson, J.A. e outros J. Clin. Lab. Anal. 5: 344 - 366, 1999) nos quais o gene CEA humano se encontra expresso no tecido gastrointestinal adulto normal, e cujo soro é CEA positivo, foram empregues para determinar se o vector de rV-CEA/TRICOM poderia aumentar as respostas das células T a um auto-antígeno. Os ratos transgênicos CEA foram separados em grupos de 5 ratos. Dois dos ratos foram vacinados uma vez com 10^7 pfu rV-CEA, rV-CEAB7-1, rV-CEA/TRICOM ou um tampão e foram abatidos no 30º dia para que se pudesse estudar as respostas de células T específicas de CEA. As respostas de células T obtidas após a vacinação com rV-CEA/TRICOM eram substancialmente superiores às obtidas com rV-CEA (Tabela 2). As respostas à ovalbumina e à Con A foram usadas como controlos. Os restantes 3 ratos transgênicos CEA em cada um dos grupos foram usados para determinar se as respostas anti-tumor ao tumor que exprime CEA poderiam ser aumentadas empregando um vector TRICOM. Estes ratos foram em primeiro lugar inoculados com 4×10^5 de células de carcinoma de MC38 que exprimem o gene CEA (5). Quatro dias mais tarde, os ratos foram vacinados uma vez num local afastado com 10^7 de pfu viral recombinante ou um tampão. Não cresceram tumores nos ratos vacinados com rV-CEA/TRICOM enquanto que os tumores continuaram a crescer nos ratos vacinados com a solução tampão, com rV-CEA e com rV-CEAB7-1 (Tabela 2). Estes resultados suportam a actividade *in vivo* dos vectores TRICOM.

Tabela 2. Resposta Imune Aumentada e Resposta Anti-Tumor de rV-CEA/TRICOM em Ratos Transgênicos CEA

Índice de Estimulação (SI)						
	Con A	Oval	CEA	CEA	Valor Tumor	
Imunogene	(5µg /ml)	(100µg /ml)	(100µg /ml)	(25µ g/ml)	Dia 14	Dia 15
HBSS	109	1.0	1.3	2.0	698 ±	3,674 ±
rV-CEA	123	0.9	4.9	4.0	928	3,107
rV-CEA/B7	93	1.3	7.1	4.3	259 ± 0	1,112 ±
- 1	111	1.1	19.2	15.9	150 ±	1,685
rV-CEA/ TRICOM					236 0 ± 0	2,696 ± 1,936 ± 0
C57BU6 CEA-ratos transgênicos (5 por grupo) foram vacinados através da raspagem da pele com uma solução tampão ou com um recombinado de vaccinia (10 ⁷ pfu) uma vez por dia no Dia 0. No Dia 30, 2 ratos foram mortos e as células T do baço foram analisadas relativamente às respostas de proliferação das células T. Cada valor representa o intervalo padrão da média CPM das amostras triplicadas em comparação com o meio. O desvio padrão nunca foi superior a 10%. No dia 4, 3 ratos de cada grupo receberam 4 x 10 ⁵ células de carcinoma do cólon exprimindo CEA. O valor do tumor é dado nos Dias 14 e 35 após a vacinação.						

Exemplo 30

Costimulação das células T $CD4^+$ e $CD8^+$ por parte das Células Dendríticas de Progenitor e das Células Dendríticas Infectadas com rV-B7/ICAM-1/LFA-3

Novas células de medula óssea $CD34^+$ (precursores de células dendríticas) foram obtidas a partir de ratos C57BL/6 através do processo de Inaba e outros (41). Estas células de precursor ou foram usadas imediatamente ou cultivadas durante 6 dias em GM-CSF e em IL-4 (42) de modo a gerar células dendríticas maduras (DC). As células $CD34^+$ de precursor e as DC foram infectadas durante 18 horas com o vírus de vaccinia recombinado que codifica múltiplas moléculas costimulatórias

rV-B7/ICAM-1/LFA-3 (rV-Tricom), 10 MOI. Após 5 horas de infecção foi recolhida uma amostra de células e foi efectuada uma análise fenotípica. As células dendríticas são conhecidas na técnica como expressando a APC "final", exprimindo uma grande quantidade de moléculas costimulatórias a níveis elevados. A tabela 3 ilustra que a DC de murina exprime efectivamente as moléculas costimulatórias B7-1, B7-2, ICAM-1 e LFA-3 a níveis relativamente elevados (intensidade fluorescente média, MF; ilustrados entre parêntesis). No entanto, quando as DC estavam infectadas com rV-B7/ICAM-1/LFA-3 havia um aumento significativo tanto no nível de expressão da molécula costimulatória como na percentagem das células que exprime as moléculas costimulatórias múltiplas. A percentagem das células que exprimem B7-1 aumentou de 65% para 86% enquanto que o MFI aumentava 4 vezes; a percentagem de células que exprimem ICAM-1 aumentou de 32% para 68%, enquanto que o MFI aumentou 2,5 vezes; a percentagem de células que exprimem LFA-3 aumentou de 44% para 75%.

Tabela 3

Análise Fenotípica do Progenitor DC Pré e Pós Infecção com rV-COS²								
Marcador								
Infecção	H2 - K ^b	I-A ^b	CD11b	CD11c	B7-2	B7-1	ICAM-1	LFA-3
Nenhuma	90 ³ (994) ⁴	64 (621)	63 (397)	29 (223)	38 (319)	65 (300)	32 (336)	44 (378)
V-Wyeth	75 (554)	60 (633)	59 (398)	27 (218)	36 (317)	65 (311)	33 (296)	43 (322)
rV-B7	76 (516)	67 (755)	70 (419)	34 (213)	41 (320)	83 (661)	43 (363)	51 (333)
rV-B7/ICAM/LFA-3	79 (579)	63 (696)	63 (408)	30 (203)	42 (360)	86 (1253)	68 (810)	75 (484)

- ¹ 5 horas de infecção a 10 MOI
² rV-COS = vaccinia recombinação que codifica uma molécula costimulatória estranha
³ = % células que exprimem o marcador
⁴ = média de intensidade de fluorescência

Para serem usadas como células de estimulador, as células de precursor infectadas CD34⁺ e as D foram irradiadas (2 000 rad) e usadas para simular células T CD4⁺ e CD8⁺ nativas na presença de Con A de acordo com o indicado na Figura 31.

As células dendriticas de progenitor infectadas com o vírus recombinado de pox de aviário que codifica B7,1, ICAM-1 e LFA-3 foram capazes de simular células T tanto CD4⁺ como CD8⁺. A estimulação das células CD8⁺ por parte de B7,1, ICAM-1 e LFA-3 expressando células dendriticas de progenitor foi mais elevada do que a que se conseguiu usando a célula dendritica CD34⁺ madura não infectada (Figura 32). De um modo adicional, a infecção e a expressão das três moléculas costimulatórias nas células dendriticas CD34⁺ maduras (previamente tratadas com IL-4 e GM-CSF) tendo resultado num grande aumento na estimulação das células T tanto CD4⁺ como CD8⁺ (Figura 33).

Um perito na técnica pode ainda medir a qualidade da população de células dendriticas através da sua capacidade para suportar uma resposta aloreactiva (reação de linfócitos mista, MLR) (43). A Figura 34 ilustra os resultados de uma cultura de linfócitos mista usando células dendriticas infectadas com rV-TRICOM. A reação de linfócitos mistos usa DCs dos 6 ratos C57BL que se encontram a estimular os linfócitos T de Balb/c (isto é, uma reação anti-alotipo).

Estes dados ilustram que o grau de proliferação de uma reacção mista de linfócitos é dramaticamente mais elevada usando as DCs infectadas com rV-TRICOM quando comparadas com as DCs não infectadas ou com as DCs infectadas com a vaccínia de um tipo selvagem.

A Figura 35 demonstra que as células DC infectadas com rV-TRICOM são muito superiores às DCs padrão na estimulação da linha de células T de murina específicas de péptido de CEA. Esta linha de células T é CD8⁺ e é específica para o epítipo restrito CEA D^b Classe-I EAQNTTYL (CAP-M8). A combinação de DCs impulsionados com o péptido CEA (1 µg/ml) e previamente infectadas com rV-TRICOM é claramente superior na estimulação de respostas de células T específicas de CEA, em especial a baixas relações entre células T e DC.

Exemplo 31

Estimulação das Células T da Murina IN Vitro e In Vivo Usando Células Dendríticas Derivadas da Espinal Medula Infectadas com rV- ou com rF-TRICOM

Protocolo Experimental

Péptidos

Os péptidos restritos H-2k^b OVA (ovalbumina_{257 - 264}, SIINFEKL)⁴¹ e VSVN (vírus de estomatite vesicular N_{52 - 59}, RGYVYQGL)⁴², e os péptidos restritos CAP-M8 (CEA_{526 - 533}, EAQNTTYL) e FLU-NP (NP_{366 - 374}, ASNENMDAM)⁴³ foram ou comprados (Multiple Peptide Systems, San Diego, CA) ou sintetizados internamente (Applied

Biosystems 432A Synergy Peptide Synthesizer, Foster City, CA).

Linhas de Células e Células de Cultura

As linhas de células T OVA e Cap -M8 CD8⁺ citotóxicas foram geradas internamente a partir de ratos C57BL/6 e reconhecem, respectivamente os peptídeos OVA e Cap-M8. As linhas CTL foram mantidas através de ciclos de estimulação semanais in vitro com células do baço irradiadas nativas no meio completo (CM) [RPMI 1640 com soro fetal de borrego (10%); glutamina (2mM), piruvato de sódio (1mM), Hepes (7mM), gentamicina (50 µg/ml), 2-mercaptoetanol (50 µM) e aminoácidos não essenciais (0,1 mM), (Biofluids, Rockville, MD)] complementados com 1 µg/ml de peptídeo específico e 10 U/ml de murina IL-2 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Vinte e quatro horas antes do uso destas células como respondedores nos testes de proliferação específicos dos antígenos, as células foram purificadas através de centrifugação até um gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade = 1,119 g/ml, Sigma Chemical Co., St- Louis, MO) e plaqueadas de novo em seis recipientes de cultura de placas (10⁶ células/ml, 5 ml/ recipiente) em CM suplementado com somente 10 U/ml de murina IL-2. Para os testes de citotoxicidade, a linha de células de tumores alvo usada foi de EL-4 (C57BL/6, H-2^b, timoma, ATCC TIB-39).

Preparação de DC

A espinal medula foi retirada de ratos fêmea C57BL/6 de entre seis e oito semanas de idade (Taconic Farms, Germantown, NY). O procedimento usado neste estudo foi uma versão levemente

modificada do que se encontra descrito por Inaba e outros ⁴¹. Resumidamente, a espinal medula foi retirada dos ossos longos dos membros e feita passar através de um gradiente Ficoll-Hypaque. As células da espinal medula foram desprovidas de linfócitos e de células Ia⁺ usando um conjunto de contas magnéticas específicas para CD4, CD8, e para anti-MHC Classe-II (MiniMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). As células foram plaqueadas em placas de cultura de seis recipientes (10⁶ células/ml, 5 ml/ recipiente) em CM suplementado com 10 ng/ml de GM-CSF e 10 ng/ml IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN). As células foram plaqueadas num meio suplementado com citoquina nos dias 2 e 4. Ao fim de 6 dias em cultura, as células foram recolhidas para a infecção, análise e imunizações. Para as experiências especificadas, as DC foram tratadas com murina TNF- α (100 ng/ml, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) ou CD40 mAb (5 μ g/ml, PharMingen, San Diego, CA) durante as últimas 24 h de cultura.

Poxvirus Recombinados

Os rV vírus contendo o gene que codifica a molécula costimulatória da murina B7-1 (CD80) sob o controlo do promotor sintético antecipado/tardio (sE/L) (designado como rV-B7-1) foi aqui descrito. O vírus rV contendo o gene LFA-3 da murina (CD48) sob o controlo do promotor da vaccínia 30K (M2L), o gene da murina ICAM-1 (CD54) sob o controlo do promotor de vaccínia 13, e o gene de murina B7-1 sob o controlo do promotor sintético antecipado/tardio (sE/L) foi designado como rV-TRICOM. Os vectores rF-B7-1 e rF-B7-1/ICAM-1/LFA-3 (designado como rF-TRICOM) são vírus rF que são construídos de um modo similar a rV-B7-1 e a rV-TRICOM,

respectivamente. Uma estrutura de pox de aviário-TRICOM contendo um gene de relato, o CEA humano foi usado em certas experiências. Os vírus de vaccínia não recombinados de um tipo selvagem (estirpe Wyeth) foram designados como V-WT, enquanto que o vírus de pox de aviário de um tipo selvagem foi designado como FP-WT.

Infecção de DC

As DC foram recolhidas no dia 6 e lavadas com Opti-Mem (Gibco-BRL, Gaithersburgh, MD). As células foram então submetidas a uma infecção simulada com HBSS; infectadas com V-WT, com rV-B7, ou com rV-TRICOM a 25 MOI (multiplicidade da infecção; PFU/célula); ou infectadas com FP-WT, com rF-B7-1, ou rF-TRICOM a 50 MOI em Opti-Mem durante 5 h. Foi adicionada CM morna após a infecção e as células foram incubadas a 37° C de um dia para o outro. Após a infecção, as células foram recolhidas para a marcação da imunidade, para a análise de costimulação in vitro e para a administração in vivo.

Análise Citométrica de Fluxo

A marcação da superfície das células usou a imunofluorescência de três cores. A marcação foi efectuada com anticorpos primários titulados com FITC CD11c, CD11b, H-2K^b, H-2D^b, CD19, Pan-NK; anticorpos titulados PE IA^b, CD48 (mLFA-3), CD86 (B7-2), CD3, CD14; E os anticorpos titulados com biotina CD80 (B7-1), CD57 (ICAM-1), CD40. Os anticorpos titulados com biotina foram de seguida titulados com cícronio-estreptavidina. Todos os anticorpos foram comprados em PharMingen. A fluorescência das células foi analisada e

comparada com os controlos de isótopos correspondentes adequados (PharMingen) com um citómetro FACSCAN (Becton Dickinson, Mountain View, CA) usando os programas informáticos Lysis II.

Análise de Costimulação in vitro: Sinal Farmacológico 1

Foram obtidos ratos fêmea de entre 6 e oito semana do tipo C57BL/6 (Taconic Farms, Germantown, NY), e as células T nativas foram isoladas da forma anteriormente descrita⁵. As células T foram adicionadas a 10^5 / recipiente em 96 recipientes presentes em placas de fundo plano (Costar, Cambridge, MA). As células de estimulador consistiam por células DC não infectadas, ou por células DC com uma infecção simulada ou por células de DC infectadas com vectores de vaccínia (V-WT, rV-B7-1, rV-TRICOM) ou vectores de pox de aviário (FP-WT, rF-B7-1 ou rF-TRICOM) irradiados (20 Gy) e adicionados a um recipiente 10^4 . As células em todos os recipientes foram postas em cultura num volume total de 200 μ l de CM na presença de várias concentrações (de 2,5 a 0,9 μ g/ml) de Con A (Sigma) durante 2 dias. As células foram tituladas para as ultimas 12 - 18 horas de incubação com 1 μ Ci/recipiente 3 H- Timidina (New England Nuclear, Wilmington, DE) e recolhidas com um dispositivo de recolha de células Tomtec (Wallac Incorporated, Gaithersburg, MD). A radioactividade incorporada foi medida através da contagem de cintilação de líquido (Wallac 1205 Betaplate, Wallac, Inc.). Aos resultados dos recipientes em triplicado foi retirada a média e foram indicados como CPM \pm SEM.

Reacção Mista dos Linfócitos

A MLR foi usada para avaliar a função estimulatória das DC para as células T nativas alogeneicas e sigeneicas. As células T foram isoladas de Balb/C ou de ratos C57BL/6 como antes. As células de estimulador consistiam por células DC que ou não estavam infectadas ou que estavam infectadas com V-WT, rV-137-1, rV-TRICOM, FP-WT, rF-B7-1 ou rF-TRICOM) irradiadas (20 Gy). As células T (5×10^4 por recipiente) foram cultivadas em simultâneo com números classificados de células de estimulador em placas de cultura de 96 recipientes de fundo plano CM e incubados a 37° C, a 5% CO₂ durante 4 dias, titulados nas últimas 12 - 18 horas da incubação com I \square Ci/recipiente ³H- Timidina, recolhidas e analisadas como antes.

Análise de Costimulação in vitro: Sinal Específico do Péptido

As células T OVA ou CAP-M8 em repouso (respondedores) foram adicionadas a 5×10^4 por recipiente em placas de fundo plano com 96 recipientes. As células de estimulador consistiam por DC que ou não estavam infectadas ou que estavam infectadas com V-WT, rV-137-1 ou com rV-TRICOM e irradiavam (20 Gy). As células em todos os recipientes foram cultivadas num volume total de 200 \square l de CM. O teste de costimulação foi efectuado usando dois conjuntos de condições: (1) uma relação 11:11 fixa entre as células de respondedor : estimulador que foram cultivadas na presença de várias concentrações de um péptido específico ou de um péptido de controlo adequado ou (2) uma concentração fixa de um péptido específico ou de um péptido de controlo cultivado a várias relações de células de respondedor : estimulador. As células foram cultivadas

durante 72 horas, tituladas durante as últimas 12 - 18 horas da incubação com 1 μ Ci/recipiente ^3H - Timidina, recolhidas e analisadas como antes.

Indução CTL In Vivo e Análise Citotóxica

DC (1×10^6) que ou não se encontravam infectadas ou que se encontravam infectadas com V-WT ou com rV-TRICOM foram lavadas duas vezes em Opti-Mem e suspensas de novo em 1 ml do mesmo meio contendo 10 μ M ou OVA ou de péptidos CAP-M8. Após 2 h de incubação a 37° , as células foram lavadas duas vezes em HBSS e suspensas de novo em HBSS para as injeções. As DC impulsionadas por péptidos (1×10^5 células por rato) foram injectadas entre 1 e 3 vezes de um modo intravenoso com intervalos de 7 dias. Os ratos do grupo de controlo foram imunizados de um modo subcutâneo com 100 μ g do péptido indicado no adjuvante Ribi/Detox (Ribi ImmunoChem Research, Hamilton, MT). Catorze dias a seguir à inoculação final, os baços de dois animais por grupo foram removidos, dispersos em suspensões de células simples, misturados e incubados em simultâneo com 10 μ g/ml de um péptido adequado durante seis dias. Os linfócitos em bruto foram recuperados através de centrifugação através de um gradiente de densidade (LSM, Organon Teknika, West Chester, PA). As células EL-4 foram preparadas para serem usadas como alvos num teste citolítico padrão usando ^{111}In , como anteriormente⁴⁵. As células alvo foram impulsionadas com 10 μ M de um péptido específico durante 1 hora a 37°C , enquanto que o outro grupo de células alvo foi impulsionado com o péptido de controlo. Os linfócitos e os alvos impulsionados com péptidos (5×10^3 células por recipiente) foram suspensos em CM, combinados em

relações de efector : alvo de entre 80 : 1 e 10 : 1 em placas com o fundo em forma de U com 96 recipientes (Costar) e incubados durante 5 h a 37° C com 5% de CO₂. Após a incubação, os materiais sobrenadantes foram recolhidos usando um Supernatant Collection System (Skantron, Sterling, VA) e a radioactividade foi quantificada usando um contador gamma (Cobra Autogamma, Packard, Downers Grove, IL). A percentagem de libertação específica de ¹¹¹In foi determinada pela equação padrão; % de lise específica = [(experimental - espontânea) / (máxima - espontânea)] x 100. Sempre que indicado, a actividade de CTL foi convertida para unidades líticas (LU) de acordo com o descrito por Wunderlich e outros, 1994.

Análise do Anticorpo Anti-Vaccinia

Foi adicionado V-WT a 5 x 10⁵ por recipiente de placas de cloreto de polivinilo (Dynatech, Chantilly, VA), secas de um dia para o outro a 37° C e bloqueado com 5% de BSA. Diluições classificadas de soro de ratos imunizados foram adicionadas em triplicado e incubadas durante 1 h a 37° C. as placas foram lavadas e incubadas com varíola caprina titulada com água oxigenada IgG (Kirkegaard e Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) durante mais uma hora. Os recipientes foram desenvolvidos com dicloridrato O-diaminafenileno (sigma, St. Louis, MO) e H₂O₂. As reacções foram interrompidas com H₂SO₄. A absorvência de cada um dos recipientes foi lida a 405 nm usando um Bio-Tek EL312e leitros de micro placas ELISA (Winooski, VT).

Resultados

Expressão Acrescida das Moléculas Costimulatórias em DC

De modo a determinar a eficácia da infecção e poxvírus em DC, estas células foram infectadas ou com um vírus rV que codifica B7-1, ICAM-1 e LFA-3 (designadas como rV-TRICOM) ou com um vírus rF que codifica B7-1, ICAM-1, LFA-3 e o antígeno carcinoma-embriónico humano (CEA) designado rF-CEA/TRICOM). Neste último caso, CEA foi usado como um gene relator pois as proteínas estruturais da pox de aviário não se encontram expressas nas células infectadas. Após 18 h, as células foram analisadas relativamente à expressão dos marcadores das superfícies das células, associados com uma determinada infecção viral. As DC de controlo não infectadas expressavam CD 11b (97%) e eram negativas em relação à expressão das proteínas da vaccínia. Após a infecção com rV-TRICOM, 94% de DC expressavam em simultâneo tanto CD11b como as proteínas da vaccínia. As DC infectadas com rF-CEA/TRICOM expressavam ao mesmo tempo tanto CD11b como CEA (87%). Estas DC não conseguiram expressar as proteínas de pox de aviário detectadas pelos soros anti-pox de aviário de coelho policlonais (dados não ilustrados) o que se encontra em concordância com os relatórios que indicam que o pox de aviário não se replica nas células dos mamíferos. Tomados em conjunto, estes dados indicam que as DC se encontram infectadas de um modo eficaz com vectores rV e rF.

As características cardinais de DC são elevados níveis de expressão tanto dos antígenos de histocompatibilidade como das moléculas costimulatórias. De modo a caracterizar ainda melhor o fenotipo de DC após a infecção com o vírus, as células foram infectadas com o vírus da vaccínia de um tipo

selvagem (V-WT), rV-B7-1, rV-TRICOM, pox de aviário de um tipo selvagem (FP-WT) ou rF-TRICOM sendo analisados para a expressão de marcadores da superfície da célula associados com o fenotipo DC (Tabela 4). Como esperado, as DC não infectadas e as que apresentavam uma falsa infecção apresentavam elevados níveis de MHC Classe I e II e moléculas de CD11b, de B7-2 e de CD40, assim como elevados níveis de B7-1, de ICAM-1 e de LFA-3. A DC infectada com V-WT apresentava menores densidade das células à superfície (de acordo com o determinado em MFI) de várias moléculas enquanto que DC infectado com rV-B7-1 expressavam um aumento de 5 vezes em relação a B7-1 do que as DC não infectadas (MFI de 329 a 1 689). A infecção de DC com rV-TRICOM aumenta de um modo substancial MFI, assim como a percentagem de células positivas para B7-1, para ICAM-1 e para LFA-3. As populações infectadas com DC ficaram negativas em relação à célula T (CD3), à B-célula (CD19), monócito/neutrófilo (CD14) e os marcadores para, durante e a porta de atenção e após a área NK-célula (Pan NK), tanto antes como após a infecção com rF e com vectores N (Tabela 4).

Tabela 4

Infecção	Infecção por BMDC com rV-TRICOM Aumenta Nível de B7-1 e de LFA-3											
	Painel DC [% de células positivas (MFI)]										Marcadores Não	
	I-A ^b	H- 2K ^b /D ^b	CD 11b	CD 11c	B7-2	CD40	B7-1	ICAM-1	LFA-3	CD14	CD19	CD3
Nenhuma	88 (1124)	89 (125)	93 (935)	20 (74)	68 (490)	68 (82)	91 (329)	96 (595)	88 (153)	2 (20)	2 (26)	0.3 (3)
Simulação	87 (989)	88 (125)	90 (1129)	25 (49)	77 (432)	71 (99)	85 (330)	97 (519)	86 (189)	1 (42)	4 (30)	0.6 (3)
V-WT	87 (890)	86 (83)	86 (588)	29 (54)	61 (274)	79 (98)	90 (197)	95 (241)	70 (196)	3 (20)	3 (45)	1 (59)
rV-B7-1	85 (856)	85 (104)	81 (693)	25 (62)	73 (304)	73 (103)	94 (1689)	97 (364)	72 (131)	3 (42)	3 (40)	0.8 (6)
rV-TRICOM	87 (901)	78 (103)	77 (558)	22 (54)	66 (298)	71 (81)	96 (1442)	94 (1528)	94 (304)	3 (32)	4 (29)	0.9 (7)
FP-WT	91 (985)	98 (126)	89 (889)	24 (69)	65 (487)	71 (90)	94 (382)	97 (464)	91 (130)	2 (18)	2 (10)	1 (60)
rF-B7-1	88 (987)	99 (114)	86 (793)	28 (72)	74 (404)	68 (90)	95 (1559)	98 (437)	90 (180)	2 (30)	2 (29)	1 (45)
rF-TRICOM	90 (900)	99 (115)	84 (789)	27 (66)	76 (499)	73 (93)	99 (1824)	98 (1697)	95 (530)	3 (22)	3 (13)	1 (50)
DC foram não infectadas, alvo de uma simulação de infecção ou infectadas com 25 MOI de V-WT, ou de rV-B7, ou de FP-TRICOM ou de 50 MOI de cada WT-FP ou FP-TRICOM durante 5 horas. Após uma incubação durante 18 h, as células foram fenotipadas por uma análise citométrica de fluxo a três cores. Os números a negrito indicam uma mudança na expressão da superfície das células (MFI).												

DC Infectadas com Vectores TRICOM Apresentam uma Maior Capacidade para Estimular as Células T Nativas

Foi usado um modelo *in vitro* para analisar como é que os níveis aumentados de B7-1, ICAM-1, e LFA-3 ajudam a induzir a proliferação de células T nativas. Neste modelo, o primeiro sinal para a activação de células T foi administrado através de um reagente farmacológico (Con A) e o sinal adicional, ou costimulatório, foi administrado à célula T através das DC, ou as DC expressavam um maior nível de TRICOM como consequência da infecção com poxvirus recombinado. Nestes e em todos os estudos seguintes aqui indicados, V-WT e FP-WT foram também usados para excluir os efeitos devidos somente ao vector. Conforme ilustrado na Figura 36A tanto as DC infectadas como as que a tinham uma falsa infecção induziam a proliferação de células T. As DC infectadas com V-WT (designadas DC/V-TRICOM) induziam menos proliferação de células T do que as DC não infectadas. A administração de sinais costimulatorios adicionais através das DC infectadas com rV-B7-1 (designadas DC/rV-B7-1) aumentavam a proliferação quando comparadas com as DC não infectadas. No entanto, as DC infectadas com rV-TRICOM (designadas DC/rV-TRICOM) induziam mais aumentos na proliferação de células T em todas as concentrações de Con A. De um modo adicional, quando as células T foram estimuladas com DC/rV-TRICOM foi necessário 28 vezes menos Con A para induzir a proliferação até níveis comparáveis com os DC não infectadas. Quando estas experiências foram repetidas usando vectores de pox de aviário, as DC/rF-TRICOM induziram aumentos na proliferação de células T em todas as concentrações de Con A, ao contrário

de DC ou DC/rF-B7-1 (Fig. 38B). Estas experiências foram repetidas 4 vezes com resultados semelhantes.

Actividade Aloestimulatória Aumentada Através de DC Infectadas com Vectores TRICOM

O efeito de infecção com rV-TRICOM (Fig. 37A, C, E) ou com rF-TRICOM (Fig. 37B, D, E) na capacidade estimulatória das DC foi avaliada numa reacção de linfócitos mistos aloespecifica. Tanto as populações de DC não infectadas como as de DC falsamente infectadas induziram uma forte proliferação (78 000 CPM) de células T alogénicas (Fig. 37A, B). A capacidade estimulatória de DC foi aumentada após a infecção com rV-B7-1 (Fig. 37C). A infecção de DC com rV-TRICOM aumentou a capacidade estimulatória em relação a DC e em relação a DC/rV-B7-1 em todas as relações entre as DC e o respondedor (Fig. 37C). É importante notar que as populações de DC infectadas com vectores rV-TRICOM não conseguiam estimular as células T singeneicas (Fig. 37E). Quando estas experiências foram repetidas usando vectores de pox de aviário, as (Fig. 37B, D), DC/rF-TRICOM induziram maiores aumentos na proliferação de células T alogeneicas do que as DC e as DC/rF-B7-1, e as DC/rF-TRICOM, no entanto não conseguiram estimular as células T singeneicas (Fig. 37F). Estas experiências foram repetidas 3 vezes com resultados semelhantes.

Análise de Costimulação in vitro: Apresentação de Péptidos às Células T de Efeitor

Foram realizados estudos para determinar se a capacidade estimulatória das DC impulsionadas com péptidos poderia ser aumentada quando se infecta-se as DC com as rV-TRICOM. Com esse objectivo, o péptido OVA (ovalbumina_{257 - 264}, SIINFEKL) restrito a H-2K^b e uma linha de células T de efector CD8⁺ específica de OVA foram usados. As DC foram expostas a diferentes concentrações de péptidos de OVA e incubadas na presença de linha de células T de OVA (Fig. 38A - 38F). As DC convencionais (isto é não infectadas) induziram uma forte proliferação das células T específicas de OVA quando incubadas com o péptido OVA (Fig. 38A). Estas DC não induziram a proliferação das células T específicas de OVA quando incubadas com o péptido de controlo VSVN (vírus da estomatite vesicular N_{52 - 59} RGYVYQGL (Fig. 38A, quadrados abertos). A DC/rV-B7-1 aumentou a proliferação de péptidos global destas células em 1,8 vezes (Fig. 38C). De um modo DC/rV-B7-1 induziu uma proliferação semelhante à das DC infectadas ou falsamente infectadas na presença de uma quantidade de péptido 4 vezes inferior. Em contraste, a DC/rV-TRICOM aumentou a proliferação global destas células T várias vezes e na presença de um péptido de OVA numa quantidade 32 vezes inferior, tendo induzido uma proliferação comparável à das DC não infectadas (Fig. 38C). De modo a avaliar ainda mais a capacidade de DC infectadas com vaccinia para apresentarem péptidos, as DC foram impulsionadas com uma concentração simples de péptido de OVA (1 μ M) e incubadas na presença de várias proporções de células T (Fig. 38E). Por cada uma das células, foram requeridas 4 vezes menos DC/rV-B7-1 para induzir níveis de proliferação comparáveis aos da DC (triangulas abertos versos quadrados fechados). O maior efeito estimulatório foi o de DC/rV-TRICOM o qual induziu

níveis de proliferação comparáveis aos da DC com uma quantidade de células 32 vezes inferior (círculos abertos versus quadrados fechados).

Um segundo sistema empregando DC impulsionadas com péptidos e uma linha de células T estabelecida foram empregues para determinar se poderiam ser obtidos resultados semelhantes aos que se conseguira com o péptido OVA. Estas experiências foram conduzidas usando o péptido CAP-M8 (CEA₅₂₆ - ₅₃₃, EAQNTTYL) restrito a H-2D^b e uma linha de células T de efector CD8⁺ específica de CAP-M8; foram anotados resultados semelhantes (Fig. 38B, D, F). Estas experiências foram repetidas 5 vezes adicionais com resultados semelhantes.

Efeito da Infecção de rV-TRICOM sobre TNF α ou sobre DC Amadurecidas com CD 40

Como se pensa que o amadurecimento funcional de DC se correlaciona com a regulação das moléculas costimulatorias das células T, foram feitas experiências destinadas a examinar o efeito da infecção rV-TRICOM sobre as DC que tinham sido amadurecidas em cultura simultânea com TNF α ou com CD 40 mAb. O tratamento de DC com TNF α durante as últimas 24 horas de cultura resultou em alguma regulação de MHC-II, de B7-2 e de ICAM-1 de acordo com o determinado por análise citométrica de fluxo (Tabela 5), enquanto o tratamento das DC com CD 40 mAb resultou na regulação da expressão ICAM-1 e numa leve regulação ascendente de MHC-II. Sob um ponto de vista funcional o tratamento das DC com TNF α ou com CD 40 mAb culminou num aumento de 28% e de 16%, respectivamente, na proliferação específica de péptidos em

relação aos DC não manipulados (Fig. 39A). Dados semelhantes foram também obtidos após o tratamento das DC com lipopolisacarídio (LPS). A infecção de DC não tratado com rV-TRICOM resultou num aumento substancial da proliferação das células T (Fig. 39A versus 39B). No entanto, o tratamento prévio com TNF α ou com CD 40 mAb seguido de infecção com rV-TRICOM conferiu somente uma ligeira capacidade estimulatória acima do que pode ser visto somente com a infecção rV-TRICOM (Fig. 39B). Estas experiências foram repetidas 3 vezes adicionais com resultados semelhantes.

Tabela 5

Efeito do Tratamento Prévio das DC com TNF - α ou CD40 mAb antes da infecção com DC rV-TRICOM										
Painel DC [% células positivas (MFI)]										
Infecção	Tratamento Prévio	I-A ^b	H-2K ^b /D ^b	CD 11b	CD 11c	B7-2	CD40	B7-1	ICAM-1	LFA-3
DC (Não infectado)	Nenhuma	90 (924)	93 (225)	90 (835)	26 (174)	65 (340)	62 (182)	93 (389)	96 (415)	90 (253)
DC (Não infectado)	TNF - α	95 (1189)	91 (195)	84 (729)	20 (149)	71 (412)	65 (159)	85 (320)	97 (421)	87 (249)
DC (Não infectado)	CD40 mAb	87 (756)	89 (183)	87 (788)	22 (154)	68 (374)	69 (198)	90 (297)	95 (690)	86 (216)
DV/rV-TRICOM	Nenhuma	87 (756)	89 (214)	85 (684)	24 (98)	69 (301)	66 (103)	95 (1989)	98 (1487)	93 (413)
DV/rV-TRICOM	TNF - α	92 (991)	90 (230)	79 (558)	21 (62)	72 (398)	68 (81)	96 (1442)	94 (1993)	90 (394)
DV/rV-TRICOM	CD40 mAb	91 (905)	90 (216)	81 (614)	23 (69)	65 (387)	71 (120)	94 (1382)	97 (1444)	89 (310)
As DC foram tratadas com TNF - α (sem ng/ml) ou CD40 mAb (1mg/ml) durante as últimas 24 horas de cultura. As DC ou as DC tratadas foram então infectadas com 25 MOI ou com rV-TRICOM durante 5 horas. Após uma incubação durante 18 h, as células foram fenotipadas por uma análise citométrica de fluxo a três cores.										

As DC Infectadas com W-TRICOM São Mais Eficazes na Preparação de Respostas CTL In Vivo

Foram levadas a cabo experiências destinadas a determinar se a capacidade estimulatória aumentada de DC/rV-TRICOM verificada in vitro usando Con A (Fig. 36E - F), reacções de linfócitos mistos (Fig. 37) e dois modelos de células T de efector (Fig. 38) se traduziriam numa eficácia acrescida na preparação de respostas de células T nativas in vivo. Com esse objectivo, as DC, as DC/V-WT, e as DC/rV-TRICOM foram impulsionadas com um péptido de 10 μ M OVA e administradas de um modo intravenoso a ratos C57BL/6. Os ratos de controlo foram imunizados subcutaneamente com péptido OVA em adjuvante Ribi/Detos. Os esplenócitos foram retirados 14 dias após a vacinação, estimulados de novo in vitro durante 6 dias e avaliados em relação à sua capacidade lítica contra as células EL-4 impulsionadas com OVA. As células EL-4 impulsionadas com péptido VSVN foram usadas como células alvo de controlo. Conforme pode ver-se na Fig. 40A, CTL gerado de ratos imunizados com um adjuvante de péptido apresentaram níveis moderados de actividade CTL (Fig. 40A). Os ratos imunizados com DC impulsionadas com péptidos apresentavam uma maior resposta CTL específica de péptidos (Fig. 40B). A resposta CTL induzida estava algo baralhada nos ratos imunizados com DC/v-WT (Fig. 40C, < 2,5 unidades líticas (LU) versus 5,2 LU). Em contraste, os ratos imunizados com DC/rV-TRICOM impulsionadas com péptidos (Fig. 40D) apresentavam uma resposta CTL que era significativamente mais forte que a de DC (LU=14,3, $p = 0,001$). Experiências similares foram então realizadas usando um segundo modelo de péptido, o péptido CEA CAP-M8 (Fig. 40 E - H). Uma vez mais, o péptido impulsionado

com DC produzia uma actividade CTL muito superior do que a provocada pelo péptido/adjuvante (5,7 LU versus < 2,5 LU). De um modo adicional, os ratos imunizados com DC/rV-TRICOM impulsionadas com péptidos (Fig. 40H) apresentavam uma forte resposta CTL (> 20 LU) quando comparada com a induzida pela DC impulsionada pelos péptidos (5,7 LU, $p = < 0,001$; Fig. 40 F).

Eficácia das Vacinas de DC Infectadas com Vectores Múltiplos

Pensa-se em geral que a geração de anticorpos anti-vaccínia pode evitar o uso de vírus de vaccínia enquanto imunogenes. No entanto, sabe-se muito pouco sobre o uso repetido de células infectadas com vaccínia enquanto imunogenes. De modo a tratar deste assunto foi efectuado um esquema de imunização em que os imunogenes DC impulsionados com péptidos CAP-M8 foram administrados uma, duas ou três vezes, em intervalos de 7 dias. Como anteriormente, os esplenócitos foram recolhidos nos 14 dias que se seguiram à imunização final, estimulados de novo in vitro durante 6 dias e avaliados relativamente à sua capacidade lítica relativamente às células EL-4 impulsionadas com CAP-M8. Conforme pode ver-se na Fig. 41A, as DC/rV-TRICOM impulsionadas por péptidos induziram níveis mais elevados de actividade de CTL quando comparados com as DC impulsionadas com péptidos. Estes dados são semelhantes aos que se observaram na Figura 40 E-H. Esta administração simples de DC/V-WT ou de DC/rV-TRICOM induziu um número significativo de anticorpos anti-vaccínia IgG, com valores que variam entre 1 : 4 000 e 1 : 9 000 de acordo com o determinado através de ELISA qualitativa. Estas doses não tiveram, no entanto, qualquer efeito na capacidade destes

imunogenes para aumentarem a actividade CTL aquando das imunizações seguintes (Fig. 41 B e 41 C). Enquanto as doses do vírus anti-vaccínia após a segunda vacinação variavam entre 1 : 12 000 e 1 : 50 000, um aumento da indução de CTL específico de péptido pôde ser observado em todos os grupos. Uma vez mais, a actividade CTL observada usando células impulsionadas DC/rV-TRICOM era mais elevada do que a observada usando células DC impulsionadas com péptidos.

Exemplo 32

Esplenócitos de Células de Progenitor De Espinal Medula Infectadas com Vectores TRICOM Induziram a Activação das Células T Comparáveis às Células Dendríticas

Materiais e Processos

Geração de Células de Progenitor de Espinal Medula e de Culturas de Células Dendríticas

O processo usado para a geração de DC derivadas da espinal medula é o que se encontram descrito por Inaba e outros com pequenas modificações. De um modo resumido, foram retirados os fémures de ratos fêmea C57BL/6 de entre 6 e 8 semanas (Taconic Farmas, Germantown, NY) e a espinal medula foi retirada e feita passar através de um gradiente Ficoll-Hypaque. As células da espinal medula foram desprovidas de linfócitos e de células la^+ usando um conjunto de contas magnéticas específicas para CD4, CD8, e para MHC Classe II (MiniMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Designadas como células dendríticas de progenitor e, estas células de espinal

medula desprovidas foram então preparadas para serem infectadas ou para as culturas de células dendríticas desprovidas as células de espinal medula foram plaqueadas em placas de cultura de seis recipientes (106 células/ml, 5 ml/ recipiente) em CM suplementado com 10 ng/ml GM-CSF e 10 ng/ml IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN). As culturas DC foram plaqueadas de novo com uma nova dose de CM suplementada com citocina nos dias 2 e 4, e dividida por novas placas no dia 4. No dia 7 de cultura, as células foram recolhidas para análise, em testes in vitro, e em imunizações in vivo.

Geração de Células de Estimulador de Esplenócitos

Os baços foram recolhidos de ratos fêmea C57BL/6 nativos, esmagados numa suspensão de células únicas e passados através de um gradiente Ficoll-Hypaque. As células do baço foram desprovidas de linfócitos e de células la^+ usando um conjunto de contas magnéticas específicas para CD90 e para MHC Classe II. Os esplenócitos purificados foram então lavados duas vezes com Opti-Mem (Gibco-BRL) e preparados para serem infectados com os poxvírus recombinados.

Infecção das Células de Estimulador

As células dendríticas de progenitor derivadas da espinal medula e as células de esplenócito foram lavadas duas vezes com Opti-Mem e infectadas falsamente ou infectadas com 25 MOI V-WT, rV-B7-1, rV-TRICOM, ou 50 MOI FP-WT, rF-B7-1 ou rF-TRICOM a 25 MOI (multiplicidade da infecção, PFU/célula) em 1 ml de volume final de Opti-Mem durante 5 h. Após a infecção foi adicionada CM morna (37 graus) e as células foram

incubadas a 37° C de um dia para o outro. Após a infecção, as células foram recolhidas para a marcação da imunidade, para a análise de costimulação in vitro e para a administração in vivo.

Análise de Costimulação

As células T CAP-M8 (respondedoras) em repouso foram adicionadas a um recipiente de 5×10^4 por recipiente em placas de fundo plano com 96 recipientes (Costar, Cambridge, MA). As células de estimulador consistiam por BMDC, esplenocitos ou progenitores de espinal medula, quer não infectados, quer com infecção simulada ou infectados com V-WT, com rV-B7-1, com rV-TRICOM, com FP-WT, ou com rF-TRICOM e irradiadas (20 Gy). As células nos recipientes foram cultivadas num volume total de 200 ml de CM. O teste de costimulação foi levado a cabo usando dois conjuntos de condições: a) uma relação fixa de respondedor : célula de estimulador de 2,5 : 1 para os estimuladores não-BMDC e de 10 : 1 para BMDC cultivados na presença de várias concentrações de Con A como sinal de um péptido específico um de um péptido de controlo adequado, ou b) uma concentração fixa de Con A como sinal de um péptido específico ou de um péptido de controlo cultivados a várias relações de respondedor : célula de estimulador. As células foram cultivadas durante 48 ou durante 72 horas para os testes de Con A e específicos de péptido, respectivamente, e titulados para as últimas 12 - 18 horas de incubação com 3H-timidina 1 mCi/recipiente recolhida e analisada da forma acima descrita.

A tabela 6 ilustra a expressão da superfície das células dos esplanócitos e da medula óssea (BM das moléculas costimulatorias) após a infecção com os vectores recombinados. Os esplanócitos de morina purificados ou as células de espinal medula foram infectados durante 5 horas com 25 MOI de vectores de vaccinia ou com 50 MOI de vectores de pox de aviário. O fenotipo das células foi comparado com o das DC. Todas as células foram marcadas com imunidade com mAbs específicos das moléculas costimulatorias titulados com iso-tio-cianato de fluorescência, com ficoeritrina, ou com biotina /estreptavidina- cicrómio. O controlo dos isótopos foi negativo (dados não ilustrados). Os números indicam a percentagem de células positivas e a intensidade de fluorescência média entre parêntesis.

TABELA 6

Infecção de BMDC, de Esplanócitos, e de Progenitores BMDC com rV-TRICOM ou com rF-TRICOM aumenta o nível de expressão de B7-1, de ICAM-1, e de LFA-3¹

	DC ²	I-A ^b	H- 2K ^b /D ^b	CD 11b	CD 11c	B7-2	CD40	B7-1	ICAM- 1	LFA-3	CD19
	Não Infectado	88 (1124)	89 (125)	93 (935)	20 (74)	68 (82)	91 (329)	91 (329)	96 (595)	88 (153)	2 (26)
Esplanocitos ³	Não infectado	92 (102)	96 (389)	3 (136)	1 (54)	87 (494)	49 (61)	46 (540)	85 (258)	77 (40)	42 (25)
	V-WT	91 (114)	94 (400)	3 (182)	0.7 (82)	75 (408)	63 (92)	55 (490)	76 (257)	47 (32)	25 (24)
	rV-B7-1	91 (123)	95 (402)	3 (89)	1 (159)	81 (369)	61 (89)	87 (1134)	85 (315)	45 (29)	33 (27)
	rV-TRICOM	93 (188)	98 (433)	3 (41)	3 (83)	81 (327)	49 (69)	87 (1104)	92 (788)	97 (192)	27 (33)
	FP-WT	90 (104)	90 (410)	2 (162)	0.9 (92)	79 (418)	60 (72)	55 (460)	70 (157)	49 (32)	53 (29)
	rF-B7-1	91 (133)	86 (422)	1 (81)	1 (149)	85 (399)	55 (96)	83 (830)	83 (215)	51 (29)	52 (31)
	rF-TRICOM	89 (238)	96 (399)	3 (91)	2 (80)	86 (387)	51 (99)	86 (1001)	92 (588)	99 (292)	48 (33)
BM ⁴	Não infectado	9 (289)	99 (389)	80 (114)	1 (909)	26 (136)	28 (72)	79 (115)	68 (144)	37 (89)	1 (147)
	V-WT	8 (218)	98 (236)	66 (144)	1 (1131)	19 (161)	19 (98)	75 (131)	63 (151)	33 (64)	5 (50)
	rV-B7-1	8 (192)	97 (159)	71 (144)	2 (394)	25 (233)	22 (125)	89 (1117)	56 (204)	31 (65)	2 (106)
	rV-TRICOM	7 (242)	92 (183)	70 (129)	1 (875)	16 (171)	16 (91)	92 (880)	80 (490)	38 (112)	3 (62)
	FP-WT	8 (318)	98 (298)	64 (133)	1 (1101)	23 (175)	22 (88)	74 (121)	60 (112)	35 (69)	2 (30)
	rF-B7-1	7 (292)	99 (259)	75 (129)	2 (1001)	26 (245)	26 (101)	91 (652)	50 (104)	34 (72)	1 (86)
	rF-TRICOM	8 (233)	96 (213)	72 (118)	1 (984)	25 (111)	13 (99)	96 (1880)	79 (310)	39 (109)	1 (52)

¹As células estavam não infectadas, ou infectadas com 25 MOI de V-WT, rV-B7-1, rV-TRICOM ou com 50 MOI FP-WT, rF-B7-1, ou rF-TRICOM durante 5 horas. Após uma incubação durante 18 h, as células foram fenotipadas por uma análise citométrica de fluxo a três cores. Os valores são dados como 19 células positivas (Intensidade Média de Fluorescência). Os números a negrito indicam a > a uma mudança para o dobro na expressão da superfície das células (MFI).

²BMDC: células dendríticas derivadas da espinal medula do 6º dia (cultivadas em 10 ng/ml GM-CSF/IL-4).

³Esplanocitos desprovidos de células T através de \square -CD90 (Thy 1,2) através de contas magnéticas.

⁴BMDC progenitores: células de espinal medula desprovidas de células T e de células de MHC-II através de \square -CD4, de \square -CD8 e de \square -MHC-II

As figuras de 42A a 46 demonstram que os esplanócitos infectados com TRICOM são comparáveis às células de espinal medula infectadas com TRICOM na estimulação das respostas das células T.

EXEMPLO 33

Estimulação das células T humanas usando células dendriticas humanas infectadas com rF-TRICOM alogénico impulsionadas com péptidos.

As células dendriticas humanas foram isoladas relativamente a um indivíduo saudável normal através de leucoforese. As células dendriticas humanas foram cultivadas na presença de GM-CSF e de IL-4 durante entre 6 e 9 dias, seguindo-se a adição de rF-TRICOM ou de rF-Controlos para a infecção das células dendriticas. As células dendriticas infectadas com rF-TRICOM foram impulsionadas com um péptido CEA (CAP-1 ou CAP I, 6D) (Figura. 47); um péptido PSA (PSA-3) (Figura 48); um péptido de influenza (péptido de gripe 58-66) (Figuras 49 e 50); ou um péptido HPV (11 - 20) (Figuras 51 - 45) durante uma hora. As células T humanas isoladas das As células mononucleares periféricas do sangue (PBMC) foram cultivadas na presença de células dendriticas infectadas com rF-TRICOM impulsionadas por péptidos e foi determinada a produção de IFN- γ por parte das células T. As Figuras 47 - 54 mostram que as células dendriticas humanas infectas com rF-TRICOM impulsionadas por péptidos estimulavam muito mais as células T do que as do grupo de controlo. As Figuras 47 - 54 assim como a Tabela 7, demonstram que as células dendriticas alogénicas humanas podem apresentar de

modo eficaz qualquer péptido antigenico às células T para que se obtenha um aumento da resposta imune.

Tabela 7

Actividade CTL das linhas de Células T usando DC
impulsionadas com péptido de HPV E7(11-20)

Alvo	Linhas de Células T estabelecidas usando			
	A rF-Tricon + P	rF-B7.1 + P	rF-FPV + P	B DC + P
C1R-A2 + HPV	39.6 (3.1)	24.7	19.9	7.3 (0.4)
C1R-A2	5.1 (2.0)	(0.4)	(2.9)	8.0 (0.2)
		6.9 (4.0)	7.6 (2.0)	

Relação E: T = 25: 1

Foi efectuado um teste de libertação de ^{111}In de 6 horas.
As células C1R-A2 foram impulsionadas com o péptido HPV E7
(11-20) YMDLQPETT a uma concentração de $10 \mu\text{g} / \text{ml}$.

Os resultados apresentados na tabela 7 demonstram que as DC infectadas com rF-TRICOM (A) são melhores enquanto APC para gerarem CTL do que as DC(B) padrão quando ambas são impulsionadas com péptidos.

EXEMPLO 34

Ensaaios clínicos humanos de uma vacina rV-huTRICOM, rV-CA huTRICOM e rF-CEA TRICOM

O objectivo do ensaio clínico humano é determinar a dose óptima tolerada (OTD) da vacina recombinada rV-huTRICOM e rV-CA huTRICOM que pede uma resposta imune anti-tumor hospedeiro e que se encontra associada com uma toxicidade

aceitável em pacientes com adenocarcinomas que exprimem CEA avançado.

As vacinas rV-huTRICOM e rV-CA huTRICOM são produzidas sob as condições adequadas para os ensaios clínicos humanos de Fase I e da Fase II. Num ensaio inicial, as doses crescentes da vacina do vírus vivo recombinado rV ou rF CEA-huTRICOM ou a vacina rV-huTRICOM mais rV-CEA são administradas numa dose inicial de 10^6 pfu vírus, I.M., seguida de uma dose de 10^7 pfu vírus, I.M., que é seguida posteriormente de 10^8 pfu vírus ou de 10^9 s.c. ou por raspagem.

A resposta anti tumor a cada vacina recombinada é determinada usando provas clínicas, de laboratório e radiológicas do tamanho do tumor, da sua extensão e do seu crescimento usando critérios padrão aceites para a medição de respostas de tumores às novas formas de terapia conhecidas na técnica.

A resposta imune do paciente à vacina recombinada é avaliada usando uma pluralidade de testes imunológicos incluindo o teste de anti corpos Anti-CEA, o teste dos anti corpos Anti-poxvirus, o teste complexo imune, o teste linfoproliferativo específico de CEA, os testes T linfocitos citotóxicos específicos de CEA, a frequência de precursor das células T reactivas em CEA na libertação gama-inferon do teste das células T, um elisopt, um teste Fast Imune, testes Tetramer para as respostas de células T (Scheibenhogen e outros, Int. J. Câncer 71: 932-936, 1997), os testes HLA e afins. Uma comparação das amostras de pré tratamento e pós tratamento é feita de modo a documentar o

desenvolvimento das respostas humorais e imunes celulares dirigidas de encontro ao anti-genio do tumor CEA.

EXEMPLO 35

Ensaio clínico humano de um pox de aviário recombinado CEA-huTRICOM

Num teste inicial, doses crescentes de uma vacina de pox de aviário recombinado CEA-huTRICOM de 10^6 pfu vírus, 10^7 pfu e 10^8 são injectadas directamente na massa do tumor de um paciente com adenocarcinoma apresentando CEA avançada. As resposta específicas e anti tumor e imune à vacina recombinada são determinadas de acordo com o descrito no exemplo 34.

EXEMPLO 36

Ensaio clínico humano de linfócitos T activados por células dendriticas que exprimem moléculas costimulatorias múltiplas

Os linfócitos periféricos do sangue e as células dendriticas são obtidas a partir de um paciente com cancro de prostata avançado. Os linfocitos de sangue periférico são enriquecidos para os linfocitos $CD8^+$. As células dendriticas são infectadas com o epitope de rV-PSA QVHPQKVTk/B7.1/ICAM-1/LFA-3 durante um período de tempo suficiente para permitir a expressão do epitope PSA e a expressão de várias moléculas costimulatorias. Os linfocitos de $CD8^+$ específicos do epitope do PSA são activados e expandidos na presença destas células

dendriticas tratadas. Os linfocitos T autologos CD8⁺ específicos do epitope da PSA activados são injectados no paciente isolados e em combinação com o epitope de PSA. A resposta imune especifica do PSA e especifica de anti tumor relativamente ao tratamento é determinada através de processos que são comparáveis aos que se encontram descritos no exemplo 34. Ensaio clinicos humanos similares podem ser efectuados para o tratamento de pacientes com outros cancros que exprimem TAA ou através da substituição do gene que codifica CEA com um gene que codifica outro TAA no vector recombinado da presente invenção.

EXEMPLO 37

Triagem para os Péptidos Imunogénicos e/ou Células T Imunoreactivas Humanas com um Péptido Específico Usando DC Infectadas com rF-TRICOM

A presente invenção diz respeito a terapias contra o cancro que usam a manipulação das DC com vectores virias que apresentam um gene de antigénio associado a um tumor destinado a activar um CTL específico de um tumor. As DC infectadas com rF-CEA em combinação com as moléculas costimulatorias TRICOM são usadas para aumentar as respostas imunes específicas de CEA. A capacidade de indução de CTL das DC infectadas com rF-CEA/TRICOM e com rF-TRICOM é avaliada. O complexo CAP-1 de MHC classe I tetramétrico é usado de modo a visualizar o CTL específico de CAP-1. Este protocolo não se encontra limitado ao antigénio associado ao tumor, CEA, mas pode ser modificado de modo a provocar respostas imunes específicas dos antigenos para qualquer péptido antigénico ou para

qualquer seu epítotope imunogénico ou para a imunoterapia contra o cancro, para bactérias patogénicas, para vírus, para protozoários, para leveduras e afins. De um modo adicional, o processo pode ser modificado de modo a fazer uma triagem e identificar péptidos imunogénicos a partir de uma origem, como seja uma proteína natural, uma proteína recombinada, uma proteína sintética, ou fragmentos de cada um deles, bibliotecas de combinações, e afins.

Materiais e Processos

Culturas de Células

As linhas de células de carcinoma colorectal SW1463 (HLA-A1, 2), LS174T (HLA-A2, -), foram compradas na American Type Culture Collection (Manassas, MD). As culturas encontravam-se isentas de micoplasma e eram mantidas num meio completo [DMEN (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 unidades/ml de penicilina, e 100 µg/ml de estreptomicina (Life Technologies, Inc.)]. A linha de células C1R é uma linha de células de leucemia do plasma humano que não exprime os antígenos HLA-A ou B endógenos (Storkus, W.J. e outros, J. Immunol. 138(6) : 1657-1659, 1987). As células C1R-A2 são células C1R que exprimem um clone transfectado genómico de HLA-A2.1 (Hogan, K.T. e outros, J. Exp. Med. 168(2) : 725-736, 1988) Estas células foram obtidas a partir do Dr. William E. Boddison (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, NIH, Bethesda, MD). A cultura de C1R-A2 estava isenta de micoplasma e foi mantida num meio completo de RPMI 1640 (Life Technologies, Inc.). A linha de células V8T, uma

linha CTL dirigida para o epítoto CAP-1, foi estabelecida a partir de um paciente com cancro do cólon metastizado que foi inscrito num ensaio de Fase I usando rV-CEA (Tsang, K.Y. e outros., Clin. Cancer Res. 3(12): 2439-2449, 1997). As células V8T foram cultivadas num meio completo de RPMI 1640 contendo 10% de soro humano AB e IL-2 (fornecido pelo National Cancer Institute, Surgical Branch, 20 unidades/ml). As células V8T foram estimuladas de novo com um péptido CAP-1 (25 µg/ml) no 16º dia após a anterior estimulação com uma relação entre célula de efector e APC de 1 : 3. Células B transformadas EBV autologas irradiadas (23 000 rads) foram usadas como APC.

Cultura de D a partir de células mononucleares de sangue periférico

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas a partir de sangue heparinizado a partir de um paciente (#15) com carcinoma pélvico metastizado que foi inscrito num ensaio de Fase I usando uma combinação de rV-CEA e de ALVAC-CEA. Todas as experiências envolvendo materiais dos pacientes foram efectuadas de acordo com as orientações da NIH e foi obtido um consentimento informado e por escrito de todos os indivíduos. As PBMC foram separadas usando um meio de gradiente de separação de linfócitos (Organon Teknika, Durham, NC) de acordo com o anteriormente descrito (Boyum, A. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 97: 51-76, 1968). As DC foram preparadas usando uma modificação do processo descrito por Sallusto e outros (Sallusto, F., e outros, J. Exp. Med 179(4): 1109-1118, 1994). As PBMC ($1,5 \times 10^8$) foram suspensas de novo no meio de AIM-V contendo 2 mM de glutamina, 50 µg/ml de

estreptomicina, 10 µg/ml de gentamicina (Life Technologies, Inc.) e permitiu a adesão a um frasco de T-150 (Coming Costar Corp., Cambridge, MA). Após 2 horas a 37° C, as células não aderentes foram removidas com uma suave lavagem. As células aderentes foram cultivadas durante entre 6 e 7 dias num meio de AIM-V contendo 50 ng/ml de GM-CSF humano recombinado (rhGM-CSF) e 0,5 ng/ml de IL-4 humano recombinado (rhIL-4). O Meio de cultura foi cheio de novo cada três dias.

Vírus recombinado e infecção de DC com vírus de pox das aves contendo CEA, CEA/TRICOM e TRICOM

Um fragmento de DNA 2109 bp codificando a totalidade da sequência aberta de leitura de CEA foi obtida da forma descrita por Kaufman e outros (Kaufman, F. e outros Int. J. Cancer 46 (6): 900-907, 1991). O vírus de pox das aves CEA recombinado (pox de aviário CAA; dCP248) foi fornecido por Therion Corp usando os processos descritos por Taylor e outros (Taylor, J. e outros, Virology 187 (1): 321-328, 1992), Cox e outros (Cox, W.I. e outros, Virology 187 (1): 321-328, 1992) e Perkus e outros (Perkus, M.E. e outros, J. Virol. 63 (9): 3829-3836). O vírus das aves recombinado que codifica CEA e o gene humano da TRICOM (designado rF-CEA-TRICOM) e o pox de aviário humano recombinado TRICOM (rF-TRICOM) foram feitos da forma aqui revelada. A pox de aviário do tipo selvagem (FP-WT) foi usada como controlo negativo em algumas experiências. As DC (1×10^6) foram incubadas em um ml de um meio Óptim-MEM (Life Technologies, Inc) a 37° C com rF-TRICOM, rF-CEA, rF-CEA/TRICOM, FP-WT. As experiências de titulação indicaram que 2×10^7 unidades de formação de placas por ml, iguais a uma multiplicidade

da infecção (MOI) de 40 :1 durante duas horas podiam induzir de um modo consistente a CEA em aproximadamente 75% das DC infectadas. As DC infectadas foram suspensas em 10 ml de um novo meio completo RPMI-1640 morno, contendo 50 ng/ml de rhGM-CSF e 0,5 ng/ml rhIL-4 cultivados durante 24 horas e de seguida usados como estimuladores.

Péptido CAP-1 (Tsang, K.I. e outros, J. Natl. Cancer Inst. 87 (13): 982-990, 1995), posição de aminoácido CEA 571-579 YLSGANLNL, CAP-1-6D (Zaremba e outros Cancer Res. 57 (20): 4570-4577, 1997) YLSGADLNL e péptido da gripe, péptido da proteína da matriz da influenza 58-66 GILGFVTL superior a 99% de pureza, fabricados por Multiple Peptide System (San Diego, CA).

Geração de Linhas de Células T

A modificação do protocolo do descrito por Tsang e outros (Tsang, K.I. e outros, J. Natl. Cancer Inst. 87 (13): 982-990, 1995), foi usado para gerar CTL específicas de CEA. As DC não infectadas e as DC infectadas rF-TRICOM, com rF-CEA ou com rF-CEA/TRICOM foram usadas como APC. O péptido CAP-1 foi adicionado às DC não infectadas ou às infectadas com rF-TRICOM com uma concentração final de 25 µg/ml. As células autólogas não aderentes foram então adicionadas a APC numa relação entre APC e efector de 1: 10. As culturas foram incubados durante 3 dias a 37° C numa atmosfera húmida contendo 5% de CO₂. Após a remoção do meio que contem péptido, as culturas foram complementadas com recombinante humano IL-2 com uma concentração de 20 unidades por ml durante 7 dias, sendo o meio que contem IL-2 completado de 3 em 3 dias. A incubação de 3 dias com o

péptido e de 7 dias com o suplemento IL-2 constituiu um ciclo IVS. As culturas primárias foram estimuladas de novo com o péptido CAP-1 (25 μ g/ml) no 11º dia para começar no ciclo IVS seguinte. Células B transformadas com EBV autologas irradiadas (23 000 rads) foram usadas como APC. Um processo semelhante foi empregue para a geração de CPL quando as DC infectadas com rF-CEA ou com rF-CEA/TRICOM foram usadas como APT, com excepção de que nenhum péptido CAP-1 se encontrava na estimulação.

Construção de Tetrameros de Péptido MGC

Os complexos péptidos-MHC foram sintetizados da forma descrita por Altman e outros (Altman, J.D. e outros Science 274 (5284): 94-95, 1996). Resumidamente, o clone da micro globulina α_2 (α_2 M) foi obtido do Dr. Garboczi (Harvard University Cambridge, MA) (Garboczi, D.N. e outros, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89 (8): 3429-3433, 1992) e a estrutura HLA-A2 foi obtida da Immunotech (Beckman-Coulter, Marseille, França). As moléculas solúveis de HLA-A2 contendo o substrato de péptido de 15 aminoácidos para biotinylation dependente de BirA das terminações em COOH da cadeia pesada HLA-A2 e do α_2 M desenvolveram-se separadamente em E. Coli e foram isolados enquanto corpos de inclusão. Os HLA-A2 e α_2 M foram dissolvidos e recriados na presença de CAP-1 ou do péptido FLU-M1 58-66. O complexo foi purificado por FPLC em Superdex 200 (Pharmacia, Piscataway, NJ). O complexo purificado de péptido e MHC foi biotinilado usando a enzima BirA (Avidity, Denver, CO). Os tetrameros foram produzidos através da mistura do complexo biotinilado de péptido IMHC com UltraAvidine titulado com

Ficoeritrina (Leinco Technologies, Inc. Ballwin, MO) com uma relação molar de 4: 1.

Citometria de Fluxo

Marcação e triagem das células T: foi usado CAP-1-MHC tetramero-PE para fazer a análise citométrica do fluxo e a triagem das células T. um procedimento semelhante ao descrito acima foi usado para a marcação do tetramero. O CAP-1-MHC tetramero-PE foi usado com uma concentração de $0,33 \mu\text{g}/2 \times 10^5$ células. As células foram marcadas com CAP-1-MHC tetramero-PE durante uma hora a 4°C sendo depois marcadas com FITC anti-CD8 durante mais uma hora. As células foram lavadas e analisadas num aparelho de triagem Vantage Cell (Becton Dickinson) ou num FACScan (Becton Dickinson) usando programas informáticos Cellquest (Becton Dickinson). As células de triagem foram cultivadas e expandidas de acordo com a forma anteriormente indicada. As células marcadas com UltrAvidin-PE e tetramero Slu-MHC foram usadas como controlos negativos.

Teste Citotóxico

As células alvo foram tituladas com $50 \mu\text{Ci}$ de oxiquinolina titulada com $^{111}\text{indio}$ (Medi-Physics Inc, Arlington, IL) durante 15 minutos à temperatura ambiente. As células alvo ($0,3 \times 10^4$) em $100 \mu\text{l}$ de um meio completo de RPMI-1640 foram adicionadas a cada um dos 96 recipientes nas placas de teste de fundo plano (Corning Costar, Corp.). as células alvo tituladas foram incubados com péptidos durante 60 minutos a uma temperatura de 37°C em 5% de CO_2 antes do acréscimo das células de efector. Não foi usado péptido

quando as linhas de células de carcinoma foram usadas como alvos. As células de efector foram suspensas em 100 μ l de um meio completo de RPMI-1640 suplementado com soro humano AB misturado e adicionados às células alvo. As placas foram então incubadas a 37° C em 5% de CO₂ durante um período de entre 4 e 16 horas. O material sobrenadante foi recolhido para contagem gamma através do uso das estruturas de recolha (Skatron, Inc; Sterling, VA). As determinações foram efectuadas em triplicado e foram calculados os desvios padrão. A lise específica foi calculada com o uso da formula seguinte (todos os valores em cpm):

$$\% \text{ de lise} = \frac{\text{libertação observada} - \text{libertação espontânea} \times 100}{\text{Libertação total} - \text{libertação espontânea}}$$

A libertação espontânea foi determinada a partir de recipientes nos quais 100 μ l de um meio completo de RPMI-1640 foi acrescentado. A radioactividade total libertável foi obtida após tratamento em alvos com 2,5% de triton x-100.

Tipagem HLA

A fenotipagem HLA foi efectuada pelo banco de sangue do National Institutes of Health usando um teste de microcitotoxicidade dependente dos anti corpos padrão e um painel definido de anti soros anti-HLA. Os fenotipos da classe I da linha de células V8T e do paciente #15 eram HLA-A2, -; B 18 (W6), 44 (12, W4) e HLA-A2, 28; B 13 (BW4), B51 (BW4); CW6, respectivamente.

Detecção de Citoquina

O sobrenadante das células T expostas durante 24 horas às DC infectadas com rF-CEA, rF-CEA/TRICOM, ou a DC não infectadas impulsionadas por péptidos e a DC infectadas com rF-TRICOM num meio livre de IL-2 a várias relações de respondedor: estimulador foram triadas para a segregação de IFN γ usando um conjunto ELISA (R&D, Systems, Minniapolis, MN). Os resultados foram expressos em pg/ml.

Teste ELISPOT

Foi usada uma modificação do processo descrito por Scheibenbogen e outros (Scheibenbogen, C., e outros, Clin Cancer Res 3 (2): 221-228, 1997) foi usado para medir a produção de IFN γ de modo a determinar as células T específicas de CAP-1. De um modo resumido, placas HA de 96 recipientes com um ml (Millipore Corporation, Dedford, MA) foram revestidas com 100 μ l de um anticorpo de captura de encontro a IFN γ com uma concentração de 10 μ g/ml. Após 24 horas de incubação à temperatura ambiente, as placas foram bloqueadas durante 30 minutos com RPMI-1640 contendo 10% de mistura de soro humano AB. 1×10^5 células a serem testadas foram adicionadas a cada um dos recipientes. As células C1R-A2 impulsionadas com CAP-1-6D foram adicionadas a cada um dos recipientes sob a forma de um APC a uma relação de APC de 1:3. As células C1R-A2 não pulsadas foram então usadas como controlo negativo. O péptido da matriz da gripe com ligação a HLA-A2 (GILGFTL) ligando o péptido da falaste muito, mas foram usados como controlo. As células de respondedor são determinadas como um teste. As células de

resposta foram determinadas através de um Animador de Dominó (optimaz, Hillis, NH).

Análise estatística

A análise estatística das diferenças entre os meios foi efectuada usando um teste t de duas caudas.

Discussão

Quando uma célula nativa T encontra um antigénio, são possíveis vários resultados, incluindo a proliferação, a segregação de citoquina e a diferenciação em células de efector, assim como a desactivação, a morte e a falta de capacidade de resposta (energia). O resultado predominante em condições fisiológicas pode ser determinado por outros sinais costimulatórios adequados que são distribuídos à célula T que responde (26). Pelo menos três moléculas distintas normalmente encontradas à superfície da APC profissional são consideradas como sendo capazes de proporcionar os sinais críticos para a activação de células T: B7-1, ICAM-1 e LFA-3. Neste caso o papel das moléculas costimulatórias na activação das células T foi examinado usando vectores trabalhados para expressarem ou B7-1, ou ICAM-1 ou LFA-3, ou uma combinação de todas as três moléculas.

Foram investigados vários grupos relativamente à cooperação de duas destas moléculas na costimulação das células T: Dubey e outros indicaram que a costimulação por parte de A7-1 e de ICAM-1 é um requisito prévio para a activação (26) das células T nativas, enquanto que Cavallo e outros

determinaram que B-7-1 e ICAM-1 devem ser expressadas em simultâneo pelas células de tumor de modo a estabeleceram uma resposta de memória anti tumor (27). De um modo adicional, a costimulação com B7-1 e com LFA-3 demonstrou agir de um modo aditivo em relação à proliferação das células T e em relação à produção de citocina (6, 23, 24). Estes estudos prévios foram efectuados usando duas moléculas costimulatórias e vectores retrovirais. Um dos genes foi transduzido na linha de células alvo, seleccionado relativamente às drogas e de novo transduzido com uma segunda estrutura recombinada retroviral seguida pela selecção com um agente diferente. Este processo exige muitas vezes semanas ou meses. Usando vectores de poxvirus recombinados pode-se conseguir a expressão em simultâneo de três moléculas costimulatórias 5 horas após a infecção. In vitro, as células MC38 infectadas com rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3 ou com rF-CEA/B7-1/ICAM-1/LFA-3 demonstraram aumentar a proliferação de células T muito mais do que as células MC38 infectadas com vectores contendo o gene para qualquer molécula costimulatória simples. Dubey e outros demonstraram que a um baixo estimulador para as relações de células T, se observava uma sinergia de moderada a forte com B7-1 e com ICAM-1 (26). Os nossos estudos confirmam estas descobertas. No entanto, com relações muito baixas de células para as células T ou para um sinal fraco -1 (0,625 µg/ml Con A), a estrutura de dois genes (rV-B7-1/ICAM-1) tinha pouco ou nenhum efeito na proliferação; em contraste, a estimulação através construção tripla (rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3) tinha um efeito substancial e estatisticamente significativo na proliferação. O efeito predominante da estimulação através da estrutura de genes múltiplos (rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3) era a elaboração de IL-2 a partir das

células CD4⁺ e a elaboração de IFN- γ a partir das células T CD8⁺, enquanto que pouca, ou nenhuma, citocinas do tipo 2 eram produzidas. A análise da expressão de citocina por parte da protecção de RNase proporcionou um perfil compatível com o teste da citocina in vitro, manifestado por uma expressão significativamente superior de IL-2 e de IFN- γ quer nas células T CD4⁺ quer nas células T CD8⁺ estimuladas com as três moléculas costimulatórias, quando comparada com a estimulação efectuada por qualquer molécula costimulatória simples. Estes dados estão em conformidade com os estudos anteriores que demonstraram que no contexto da baixa costimulação de CD28, as células T produzem baixos níveis de IL-1, enquanto que a forte costimulação de CD28 suportava a produção de IL-2, de IFN- γ e de IL-13 (28). De um modo adicional, foi indicado que IL-13 estabelece sinergias com IL-2 na regulação da síntese de IFN- γ nas células T (29). De um modo interessante, os nossos resultados suportam esta observação pois a estimulação das células T CD4⁺ com MC38B7-1/ICAM-1/LFA-3. A expressão acrescida de IL-9 em conjunto com a regulação de IL-2 notado nos estudos está em concordância com os estudos anteriores que demonstraram que a produção óptima de IL-9 é regulada por IL-2 (30). Tomados em conjunto, estes estudos sugerem que as respostas óptimas de células T nativas requerem um nível mais elevado de costimulação do que o que se pensava anteriormente, e isto pode ser proporcionado pela acção combinada de três moléculas costimulatórias.

Talvez a molécula costimulatória mais estudada seja a B7-1. A capacidade desta molécula para aumentar a activação das células T usando vectores retrovirais, anticorpos anti-CTLA-4, e vectores de poxvirus encontra-se bem

estabelecida. Os estudos aqui indicados classificam a ordem da estimulação das células T através de uma única molécula costimulatória como B7-1 > ICAM-1 > LFA-3. No entanto, o uso de três moléculas costimulatórias era muito superior a B7-1 isoladamente ou em B7 em combinação com uma segunda molécula costimulatória tanto na proliferação de células T como na produção de citocina.

Muito embora não se encontrem apoiados pela teoria, há vários mecanismos possíveis para a cooperação eficaz entre B7-1, ICAM-1 e LFA-3. A interacção entre ICAM-1/LFA-3 vai alegadamente costimular a activação mediada por TCR das células T mantendo o aumento nos mesmos segundos mensageiros intracelulares gerados pelo engate TCR. Esta observação sugere que a ligação de LFA-1 através de ICAM-1 estimula em simultâneo as células T ao aumentar o sinal distribuído através do complexo CD3/TCR (6). A interacção ICAM-1/LFA-1 é necessária para regular a expressão da cadeia IL-2R-alfa e de CD28 nas células T, a qual tem de as tornar competentes para responder à costimulação IL-2 e B7-1. Por outro lado, a interacção B7-1/CD28 proporciona um sinal costimulatório independente de TCR que aumenta quer transcripcionalmente quer pós-transcripcionalmente a expressão de IL-2 e outras linfoquinas imunoregulatórias. A interacção LFA-3/CD2 induz a fosforilação da tirosina de vários segundos mensageiros intracelulares, a mobilização de Ca^{2+} , e a produção de cAMP, resultando na elaboração de uma pluralidade de citocinas, nomeadamente IL-2 e IFN- γ (6). Deste modo, parece que as três moléculas costimulatórias podem estar a cooperar aumentando a activação dependente dos antígenos das células T, assim

como a sua produção e a resposta aos factores de crescimento de autocrine e de paracrine.

Em conclusão, a invenção demonstra pela primeira vez a capacidade de os vectores induzirem três ou mais moléculas costimulatórias no interior de uma célula, e de activarem de um modo rápido e eficaz as populações de células T CD4⁺ e CD8⁺ até níveis muito mais elevados do que os que se conseguem quando uma ou duas destas moléculas costimulatórias são usadas. Este novo nível de activação de células T tem amplas implicações na concepção e no desenvolvimento de vacinas.

O efeito da tripla de moléculas costimulatórias nas DCs foi completamente inesperado. As DCs são conhecidas pelos peritos na técnica como sendo os APC mais potentes. Os dados apresentados na presente invenção demonstram que quando as DCs são infectadas com o vector "Tricom", a sua capacidade para activar as células T aumenta dramaticamente. Estes estudos demonstram pela primeira vez que uma DC não é o APC mais potente.

Referências

1. Hellstrom, K. E., Chen, L. & Hellstrom, I. (1996) *Cancer Chemother Pharmacol* **38**, S40-1
2. Damle, N. K., Klussman, K., Linsley, P. S. & Aruffo, A. (1992) *J Immunol* **148**, 1985-92
3. Green, J. M., Zheng, X. G., Shimizu, Y., Thompson, C. B. & Turka, L. A. (1994) *Eur J Immunol* **24**, 265-72

4. Guinan, E. C., Gribben, J. G., Boussiotis, V. A., Freeman, G. J. & Nadler, L. M. (1994) *Blood* **84**, 3261-82
5. Hodge, J.W., McLaughlin, J. P., Abrams, S. I., Shupert, W. L., Schlom, J. & Kantor, J. A. (1995) *Cancer Res* **55**, 3598-603
6. Wingren, A. G., Parra, E., Varga, M., Kalland, T., Sjogren, H. O., Hedlund, G. & Dohlsten, M. (1995) *Crit Rev Immunol* **15**, 235-53
7. Parra, E., Wingren, A. G., Hedlund, G., Sjogren, H. O., Kalland, T., Sansom, D. & Dohlsten, M. (1993) *Scand J Immunol* **38**, 508-14
8. Harding, F. A. & Allison, J. P. (1993) *J Exp Med* **177**, 1791-6
9. Hellstrom, K. E., Hellstrom, L. Linsley, P. & Chen, L. (1993) *Ann N. Y. Acad Sci* **690**, 225-30
10. Hodge, J. W., Abrams, S., Schlom, J. & Kantor, J. A. (1994) *Cancer Res* **54**, 5552-5.
11. Uzendoski, K., Kantor, J.A., Abrams, S., Schlom, J., & Hodge, J. W. (1997) *Hum Gene Ther* **8**, 851-60.
12. Lorenz, M.G.O., Kantor, J., Schlom, J., & Hodge, J. W. (1998) *Hum Gene Therapy* **In Press**
13. Gritz, L., Destree, A., Cormier, N., Day, E., Stallard, V., Calazzo, T., Mazzara, G. & Panicali, D. (1990) **64**, 5948-57.
14. Mazzara, G.P., Destree, A. & Mahr, A. (1993) *Methods Enzymol* **217**, 557-81.
15. Jenkins, S., Gritz, L., Fedor, C.H., O'Neill, E.M., Cohen, L.K., & Panicali, D.L. (1991) *AIDS Res Hum Retroviruses* **7**, 991-8.
16. Chakrabarti, Sisler, J.R., & Moss, B. (1997) *Bio Techniques* **23**, 1094-7.

17. Perkus, M.E., Piccini, A., Lipinskas, B.R., & Paoletti, E (1985) *Science* **229**, 981-4.
18. Schmitt, J.F., & Stunnenberg, H.G. (1988) *J Virol* **62**, 1889-97.
19. Venkatesan, S., Baroudy, B.M. & Moss, B. (1981) *Cell* **25**, 805-13.
20. Fox, B.A., Spiess, P.J., Kasid, A., Puri, R., Mule, J.J., Weber, J.S. & Rosenberg, S.A. (1990) *J Biol Response Mod* **9**, 499-511.
21. Abrams, S. I., Dobrzanski, M.J., Wells, D.T., Stanziale, S.F., Zaremba, S., Masuelli, L., Kantor, J., Schlom, J. & Masuelle, L. (1995) *Eur J Immunol* **25**, 2588-87.
- 22.** Sabzevari, H., Propp, S., Kono, D.H. & Theofilopoulos, A.N. (1997) *Eur J Immunol* **27**, 1901-10.
23. Parra, E., Wingren, A.G., Hedlund, G., Bjorklund, M., Sjogren, H.O., Kalland, T., Sansom, D. & Dohlsten, M. (1994) *J Immunol* **153**, 2479-87.
24. Parra, E., Wingren, A.G., Hedlund, G., Kalland, T., & Dohlsten, M. (1997) *J Immunol* **158**, 637-42.
25. Sperling, A.I., Auger, J.A., Ehst, B.D., Rulifson, I.C., Thompson, C.B., & Bluestone, J.A. (1996) *J Immunol* **157**, 3909-17.
26. Dubey, C., Croft, M. & Swain, S. L. (1995) *J Immunol* **155**, 45-57.
27. Cavallo, F., Martin-Fontecha, A., Bellone, M., Heltai, S., Gatti, E., Tomaghi, P., Freschi, M., Forni, G., Dellabona, P. & Casorati, G. (1995) *Eur J Immunol* **25**, 1154-62.
28. Delespesse, G., Yang, L.P., Ohshima, Y., Demeure, C., Shu, U., Byun, D.G. & Sarfati, M. (1998) *Vaccine* **16**, 1415-9.

29. Minty, A., Chalon., Derocq, J.M., Dumont, X., Guillemot, J.C., Kaghad, M., Labit, C., Leplatois, P., Liauzun, P., Miloux, B. & e outros (1993) *Nature* **362**, 248-50.
30. Schmitt, E., Germann, T., Goedert, S., Hoehn, P., Huels, C., Koelsch, S., Kuhn, R., Muller, W., Palm, N. & Rude, E. (1994) *J Immunol* **153**, 3989-96.
31. Chakrabarti, S., Brechling, K. e Moss, B. (1985) *Mol. Cell. Biol.* **5**:3403-3409.
32. Chakrabarti, S., Sisler, J.R. e Moss, B. (1985) *Bio Techniques* **23**:1094-1097.
33. Gillard, S., Spehner, D., Drillien, R., e Kim, A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:5573-5577.
34. Morgan, J.R., e Roberts, B.E. (1994) *J. Virol.* **51**: 283-297.
35. Panicali, D., Grzelecki, A., e Huang, C. (1986) *Gene* **47**: 193-199.
36. Sambrook, J., Fritsch, E.F., e Maniatis, T., eds. *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
37. Schmitt, J.F.C. e Stunnenberg, H.G. (1988) *J. Virol.* **62**: 1889-1897.
38. Smith, K., Stallard, V., Ross, J., Hart, C., Cormier, N., Cohen, L., Roberts, B., e Payne, L. (1993) *Vaccine* **11**: 43-53.
39. Venkatesan, S., Baroudy, B.M., e Moss, B. (1981) *Cell* **125**: 805-813.
40. Bacchetti, S., e Graham, F.L. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* **74**: 1590-1594, 1977.
41. Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. e Steinman, R.M. (1992) *J. Exp. Med.* **176**: 1693-702.

42. Sallustro, F., & Lanzavecchia, A. (1994) J. Exp. Med. 179: 1109-8.
43. Fields, R.C., Osterholzer, J.J., Fuller, J.A., Thomas, E.K., Geaghty, P.J. & Mule, J.J. (1998) J. Immunother. 21, 323-39.
44. Zaremba e outros Cancer Res. 57: 4570-4577, 1997.
45. Gong, J. e outros Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 6279-6283, 1998.
46. Correale, P. e outros 1998, J. Immunol. 161 (6): 3186-94.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[0253]

<110> O Governo dos Estados Unidos da América como

<120> Um vector recombinado expressando múltiplas moléculas
costimulatorias e seus usos

<130> 20264292PC

<140> TBA

<141> 1999-11-12

<150> 60 /111,582

<151> 1998-12-09

<160> 41

<170> Pantenina Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 1

Lys	Thr	Trp	Gly	Gln	Tyr	Trp	Glx	Tyr
1			5					

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 2

Ile	Thr	Asp	Gln	Val	Pro	Pro	Ser	Val
1			5					

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 3

Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala
1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 4

Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu Arg Leu
1 5

10

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 5

Val Leu Tyr Arg Tyr Gly Ser Phe Ser Val

	1	5
--	---	---

10

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 6

Ala Ala Thr Val Ile Leu Gly Val Leu
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 7

Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu
1 5

<210> 8

<211> 9

<213> Sequência Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 8

5

<211> 9

<213> Sequência Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 9

5

<211> 9

<213> Sequência Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 10

Tyr Met Asn Gly Thr Met Ser Gln Val

1

5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 11

Ser Glu Ile Trp Arg Asp Ile Asp Phe

1

5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 12

Ala Phe Leu Pro Trp His Arg Leu Phe

1

5

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 13

**Gln Asn Ile Leu Leu Ser Asn Ala Pro Leu Gly Pro Gln
Phe Pro**

1

5

10

15

210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 15

Ser Tyr Leu Gln Asp Ser Asp Pro Asp Ser Phe Gln Asp

1

5

10

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 15

Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr

1

5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 16

Ser Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Lys Leu

1

5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 17

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr

1

5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 18

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val

1

5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 19

Ala Ala Arg Ala Val Phe Leu Ala Leu
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 20

Tyr Arg Pro Arg Pro Arg Arg Tyr
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 21

Val Leu Pro Asp Val Phe Ile Arg Cys

1

5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 22

Ala Tyr Gly Leu Asp Phe Tyr Ile Leu

1

5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 23

Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu

1

5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 24

Tyr	Leu	Ser	Gly	Ala	Asp	Leu	Asn	Leu
1					5			

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 25

Ser	Tyr	Leu	Asp	Ser	Gly	Ile	His	Phe
1					5			

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 26

Glu	Glu	Lys	Leu	Ile	Val	Val	Leu	Phe
1					5			

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 27

Ala	Cys	Asp	Pro	His	Ser	Gly	His	Phe	Val
1					5			10	

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 28

Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 29

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 30

Try Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr
1 5 10

<210> 31

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 31

**Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
Gly Val Thr Ser Ala**

1

5

10

15

20

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 32

**Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu His Val Ile
Ser Asn Asp Val Cys Ala**

1	5	10	15
	20		
Gln	Val	His	Pro
	Gln	Lys	Val
		Thr	Lys
	25	30	

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 33

Phe	Leu	Thr	Pro	Lys	Lys	Leu	Gln	Cys	Val
	1			5				10	

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 34

Lys	Leu	Gln	Cys	Val	Asp	Leu	His	Val
	1				5			

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 35

Val	Ile	Ser	Asn	Asp	Val	Cys	Ala	Gln	Val
1			5					10	

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 36

Gln	Val	His	Pro	Gln	Lys	Val	Thr	Lys
1					5			

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 39

Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu

1

5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 40

Ala Ser Asn Glu Asn Met Asp Ala Met

1

5

<210> 41

<211> 2297

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 41

atgacocatga	ttaogocaag	ogogcaatta	acooctacta	aagggaacaa	aagctgggta	60
coogggoooo	octogaggtc	gaoggtatog	ataagcttga	tatcgaattt	ogaggtogac	120
atgacacogg	gcacccagtc	toctttcttc	ctgctgctgc	toctcacagt	gcttacagct	180
accacagoc	ctaaacocgc	aacagttgtt	aogggttctg	gtcatgcaag	ctctaoccca	240
ggtaggagaaa	aggagacttc	ggctacocag	agaagttcag	tgccagctc	tactgagaag	300
aatgctgtga	gtatgacaag	octgatatog	aattooggtg	tcoggggctc	cacogcocc	360
ccagocacog	gtgtcacctc	ggocccggac	accaggcogg	ccccgggcag	tactgcacca	420
ccggcacatg	gogtaacatc	agcacctgat	acaagacctg	cacctggatc	caocgogcog	480
octgogacog	gagtgaogtc	ggogoccgac	acgogococg	ctccogggtc	aacagctcct	540
ccogctcatg	gggttacttc	tgctocagat	actogocag	ctccagggtc	gaogggoccc	600
octgctcag	gtgtaacatc	ogccocggat	accagacogg	cccctggcag	caocgcacog	660
ccogoccatg	gagttacaag	tgcacocgat	acocggcogg	caccoggaag	tacogctcca	720
octgcacacog	gggtcaccaag	ogogocagac	actogacctg	ogccagggtc	gactgococct	780
ccgggoccatg	gtgtgacctc	agtcocctgac	acaaggcocag	cccagggttc	aaoggcacct	840
ccagcacacog	gagtcaogtc	tgcacocgac	acocgtocag	ctccgggtag	tacagoccca	900
ccogcacatg	gogtcaogag	ogctocggat	acgagacogg	ogcctgctag	cactctgggtg	960

cacaaggca	octctgocag	ggctaccaca	accccagoca	gcaagagcac	tocattotca	1020
attococagoc	aacactctga	tactocatoc	acoottgoca	gocatagcac	caagactgat	1080
gocagtagca	ctcaccatag	caoggtacot	octctcaoct	octccaatca	cagactttct	1140
ccccagttgt	ctactggggt	ctctttcttt	ttoctgtctt	ttcacatttc	aaaoctocag	1200
tttaatttct	ctctggaaga	tcccagcaoc	gactactaoc	aagagctgca	gagagacatt	1260
tctgaaatgt	ttttgagat	ttataaacia	gggggttttc	tgggoccttc	caatattaag	1320
ttcaggocag	gatctgtggt	ggtacaattg	actctggoc	tcogagaagg	tacatcaat	1380
gtocacgag	tggagacaca	gttcaatcag	tataaaaagg	aagcagocct	togatataac	1440
ctgacgatoc	cagagctcag	cgtgagtgat	gtgcaatttc	ctttctctgc	ccagtctggg	1500
gctggggtgc	caggctcccc	catogogctg	ctggtgctgg	tctgtgttct	ggttgogctg	1560
gocattgtct	attocattgc	cttggtgtgc	tgtcagtgoc	gocgaagaa	ctaogggcag	1620
ctggacatct	ttocagocog	ggataoctac	catoctatga	gogagtaoc	caoctaccac	1680
acocatgggc	gctatgtgoc	coctagcagt	acogatogta	gocctatga	gaaggtttct	1740
gcaggtaatg	gtggcagcag	octctcttac	acaaaocag	cagtggcagc	cacttctgoc	1800
aactgttagg	ggcagctgc	cogctgagct	gagtggcag	ccagtgcac	tocactocac	1860
tcaggttctt	cagggcacga	ccoctgcaoc	ctgtttgggc	tggtagctg	ggagttcagg	1920
tgggctgctc	acagocctct	tcagaggc	caocaatttc	toggacactt	ctcagtggtg	1980
ggaagctcat	gtgggocct	gagggtcat	gocgggaag	tgttgtgtg	ggggctocca	2040
agaggactgg	cccagagagc	octgagatag	oggggatoca	ctagttctag	agoggogoca	2100
ccogogtgga	gctccaattc	goccaatagt	gagtgtatt	acgcgogctc	actggocgta	2160
gttttacaac	gtogtgactg	ggaaaaoctg	gogttacaa	cttaatogct	tgcacacat	2220
ccoctttogc	agctggogta	atacgaagag	gocgacgat	cgcccttoca	acagttgogc	2280
acotgaatgg	caatgga					2297

REIVINDICAÇÕES

1. Um vector recombinado que compreende sequências de ácidos nucleicos estranhas que codificam três moléculas costimulatórias diferentes, uma da família B7 que consiste por B7-1 e B7-2 ou homólogos humanos ou uma porção funcional dos mesmos, e duas seleccionadas de um grupo que consiste por ICAM-1, por LFA-3, por 4-1BBL, por CD59, por CD40, por CD70, por OX-40L, por VCAM-1 ou por homólogos humanos ou porções funcionais dos mesmos.

2. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 1, em que as referidas três moléculas costimulatórias são B7-1, ICAM-1 e LFA-3.

3. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 2, em que as referidas moléculas costimulatórias são derivadas dos humanos, derivadas dos símios ou derivadas da murina.

4. O vector recombinado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos estranha que codifica pelo menos uma de entre citoquina, quimoquina, Flt-3L, ou combinações das mesmas.

5. O vector recombinado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, compreendendo ainda um marcador seleccionavel.

6. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 5, em que o marcador seleccionavel é seleccionado de entre o grupo que consiste por lacZ gene, por quinase de timidina,

por gpt, por GUS e por um gene da gama de hospedeiros da vaccinia K1L.

7. O vector recombinado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, compreendendo ainda pelo menos um promotor derivado de uma fonte eucariótica, de uma fonte procariótica ou de uma fonte viral.

8. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 7, em que o promotor é seleccionado de entre o grupo que consiste por um promotor antecipado de SV40, por um promotor de RSV, por um promotor principal de adenovírus posterior, por um promotor I antecipado imediato CMV humano, por um promotor de poxvirus, por um promotor de 30K, por um promotor 13, por um promotor de sE/L, por um promotor de 7,5, por um promotor de 40K e por um promotor de C1.

9. O vector recombinado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, seleccionado de entre o grupo que consiste por um vírus baseado numa bactéria, num vírus e num ácido nucleico.

10. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 9, em que o referido vector de vírus é seleccionado de entre o grupo que consiste por poxvirus, por adenovírus, por vírus de Herpes, por alfavírus, por retrovírus, por picornavírus e por iridovírus.

11. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por ser um poxvirus recombinado.

12. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 11, em que o poxvírus recombinado é ortopox, avipox, capripox ou suipox.

13. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 12, em que o avipox é pox de aviário, pox de canário ou seus derivados.

14. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 12, em que o ortopox é vaccínia, a estirpe de Vaccínia de Copenhaga, a estirpe de vaccínia de Wyeth, a NYVAC, a estirpe da vaccínia MVA, a pox do rato ou a pox do coelho.

15. O poxvírus recombinado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 11 a 14, compreendendo ainda pelo menos um promotor de poxvírus capaz de controlar a expansão do DNA estranho.

16. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo referido vector de bactéria ser um vector plasmida.

17. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 16 que compreende (a) pelo menos um promotor de poxvírus, (b) as sequências de ácido nucleico estranhas que codificam LFA-3, ICAM-1 e pelo menos uma molécula B7, (c) sequências de DNA que ladeiam a estrutura de elementos (a) e (b), sendo as sequências de ladeamento de ambas as extremidades 5' e 3' homologas a uma região de genoma de poxvírus parental em que os elementos (a) e (b) vão ser inseridos de modo a fazerem a recombinação com um poxvírus concebido para produzir um poxvírus recombinado capaz de exprimir sequências de ácidos nucleicos estranhas que codificam três

moléculas costimulatórias, LFA-3, ICAM-1 e pelo menos uma molécula B7.

18. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 16 designado como pT5064 depositado junto da ATCC com o N° de Acesso 203482.

19. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 16 designado como pT5049 depositado junto da ATCC com o N° de Acesso 203481.

20. O vector recombinado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 19, compreendendo ainda uma sequência de ácidos nucleicos estranha que codifica pelo menos um antígeno alvo ou um epítopo imunológico do mesmo.

21. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 20, em que o antígeno alvo tem uma sequência de amino ácidos seleccionada de entre o grupo que vai desde a SEQ ID NO: 2 até à SEQ ID NO: 40.

22. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 20, em que o antígeno alvo é seleccionado de entre o grupo que consiste por um antígeno específico do tumor, pelo antígeno associado ao tumor (TAA), pelo antígeno específico do tecido, pelo antígeno bactericida, pelo antígeno viral, pelo antígeno da levedura, pelo antígeno dos fungos, pelo antígeno dos protozoários, e pelo antígeno parasita e pelo mitogénio.

23. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 22, em que o antígeno bactericida é derivado de uma bactéria seleccionada de entre o grupo que consiste por Clamídia,

por Micobactéria, por Legionela, por Meningioccus, por Streptococcus do Grupo A, por Hemophilus influenzae, por Salmonella e por Listeria.

24. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 22, em que o antígeno viral é derivado de um vírus seleccionado de um grupo que consiste por Lentivírus, pelo vírus do Herpes, pelo vírus da Hepatite, pelo Ortomixovírus e pelo Papilomavírus.

25. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 24, em que o Lentivírus é HIV-1 ou HIV-2.

26. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 24, em que o vírus do Herpes é HSV ou CMV.

27. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 24, em que o vírus da Hepatite é o vírus da Hepatite A, da Hepatite B, da Hepatite C, da Hepatite d ou da Hepatite E.

28. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 24, em que o Ortomixovírus é o vírus da gripe.

29. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 22, em que o antígeno associado com o tumor, o antígeno específico do tumor ou o antígeno específico do tecido é seleccionado de entre o grupo que consiste por CEA, por MART-1, por MARGE-3, por GP-100, por MUC-1, por MUC-2, por oncogene rãs com mutação por pontos, por p53 com mutação normal ou por pontos, por p53 exagerado, por CA-125, por PSA, por C-erb/B2, por BRCA I, por BRCA II, por PSMA, por tirosinase, por TRP-1, por TRP-2, por NY-ESO-1, por TAG72,

por KSA, por HER-2/neu, por bcr-abl, por pax3-fkhr, por ews-fli-1, por TAAs modificados, por variações cortadas de TAAs, por epitopes e por seus epitopes agonistas.

30. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 29, em que o antígeno é CEA (6D) tendo um amino ácido de ácido aspartico na posição de amino ácido 576.

31. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 29, em que o antígeno é PSA ou PSMA.

32. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 29, em que o antígeno é MUC-1 ou uma porção do mesmo.

33. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 22, em que o antígeno de amido ou de fungo é derivado de um amido ou de um fungo seleccionado de entre o grupo que consiste por *Aspergillus*, por *Nocardia*, por *Histoplasma*, por *Candida* e por *Cryptosporidia*.

34. O vector recombinado de acordo com a reivindicação 22, em que o antígeno parasita é derivado das espécies *Plasmodium*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii*, *Trypanosoma*, da espécie *Leishmania*.

35. Uma célula hospedeira isolada compreendendo o vector recombinado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 34.

36. A célula hospedeira de acordo com a reivindicação 35 que compreende ainda uma sequência de ácido nucleico

estranha que codifica pelo menos um antígeno alvo ou um epítopo imunológico do mesmo.

37. A célula hospedeira de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 e 36, caracterizada por a referida célula ser um antígeno que apresenta a célula ou um precursor da mesma, uma célula pré-maligna, uma célula hiperplásica ou uma célula de tumor.

38. A célula hospedeira de acordo com a reivindicação 37, em que a referida célula que apresenta o antígeno é uma célula dendrítica ou um precursor ou um derivado da mesma, um monócito, um macrófago, uma célula B, um fibroblastoma ou uma célula de músculo.

39. A célula hospedeira de acordo com a reivindicação 37, em que a célula que apresenta o antígeno é derivada da espinal medula, do baço, da pele, do sangue periférico, do tumor, do nódulo linfático ou do músculo.

40. A célula hospedeira de acordo com a reivindicação 37, em que a célula que apresenta o antígeno é uma célula de progenitor que apresenta o antígeno, uma célula que apresenta o antígeno ou uma célula trabalhada que apresenta o antígeno.

41. A célula hospedeira de acordo com a reivindicação 38, em que o referido derivado dendrítico é uma célula dendrítica tratada com TNF- α , uma célula dendrítica tratada com CD-40, ou uma sub-população de células aderentes

42. A célula hospedeira de acordo com a reivindicação 36, em que a sequência de ácido nucleico estranha que codifica pelo menos um antígeno alvo ou um epítipo imunológico do mesmo é fornecida por um vector recombinado, por RNA ou por DNA, de um lisato de células de tumor ou por fusão com uma célula de tumor que compreende a referida sequência.

42. Uma composição farmacêutica que compreende pelo menos um vector recombinado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 34, e um veículo farmacologicamente aceitável.

44. A composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 43, que compreende um poxvírus recombinado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 11 a 15 e opcionalmente como um segundo vector recombinado um poxvírus que compreende pelo menos uma sequência de ácido nucleico estranha de acordo com pelo menos um antígeno alvo ou um epítipo imunológico do mesmo.

45. A composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 43-44 que compreende ainda uma citoquina, uma chemoquina ou Flt-3L.

46. A composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 43-44 adequada para a administração por via intravenosa, subcutânea, intra linfática, intratumoral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrarectal, intra vaginal, intra nasal ou por via oral ou por infusão na bexiga ou por raspagem.

47. Uma composição farmacêutica que compreende as células dendríticas e seus derivados de acordo com a reivindicação 38 e um veículo farmacologicamente aceitável.

48. Um processo in vitro destinado a aumentar a resposta imune específica do antígeno numa célula isolada do sistema imune, caracterizado por serem usados ou o vector recombinado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 34 ou as células hospedeiras de acordo com as reivindicações de 35 a 42.

49. Um processo de acordo com a reivindicação 48, em que as células hospedeiras de acordo com qualquer uma das reivindicações de 35 a 42 são usadas e que compreende ainda, de um modo opcional, uma etapa de impulsionar as referidas células com um antígeno alvo ou com um epítopo do mesmo.

50. O processo de acordo com a reivindicação 48, em que as células isoladas do sistema imune são linfócitos T e que é caracterizado por compreender a etapa de exposição de um linfócito T isolado a uma célula hospedeira de acordo com qualquer uma das reivindicações de 35 a 42, de um modo isolado ou em combinação com um antígeno alvo ou com um epítopo imunológico do mesmo.

51. Um processo de acordo com a reivindicação 50, em que os referidos linfócitos T são autólogos com um indivíduo.

52. O uso do vector recombinado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 34, para a preparação de um medicamento para o tratamento ou para a prevenção do cancro ou das doenças causadas por um microrganismo patogénico.

53. O uso do vector recombinado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 34, para a preparação de um medicamento para o tratamento ou para a prevenção dos estados pré-neoplásicos ou hiperplásicos.

54. O uso do vector recombinado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 34, para a preparação de um medicamento destinado a aumentar a resposta imune.

55. O uso de uma célula hospedeira de acordo com qualquer uma das reivindicações de 37 a 42, isolada ou em combinação com um antigénio alvo, para a preparação de um medicamento para a imunoterapia ou para a vacinação.

56. Um processo para a produção de um poxvirus recombinado que compreende a permissão de que o vector recombinado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 19 seja recombinado com um genoma de poxvirus parental.

57. Um conjunto para a produção de um poxvirus recombinado que compreende o vector recombinado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 19 e, opcionalmente, um poxvirus parental.

58. Um processo para avaliar in vitro a eficácia de uma vacina contra um antigénio alvo que compreende a determinação do numero e da função dos linfócitos alvo específicos dos antigénios na presença da célula que apresenta antigénio de acordo com a reivindicação 37, em que um aumento no número, na função ou numa combinação destes factores em relação da linfócitos alvo específicos

dos antígenos é indicador da eficácia da vacina contra um antígeno alvo.

59. Um processo de triagem de péptidos imunogénicos de entre uma pluralidade de péptidos compreendendo:

(a) a impulsão das células que apresentam o antígeno infectadas com um vector recombinado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 34, com uma pluralidade de péptidos de modo a formarem células que apresentam antígenos impulsados por péptidos;

(b) a medição da imunoreactividade linfóide na presença das células que apresentam o antígeno impulsadas com péptidos,

em que a imunoreactividade aumentada é indicadora de um péptido imunogénico na célula que apresenta o antígeno impulsada com o péptido.

60. O processo de acordo com a reivindicação 59, em que a fonte da multiplicidade de péptidos é uma biblioteca de péptidos combinados.

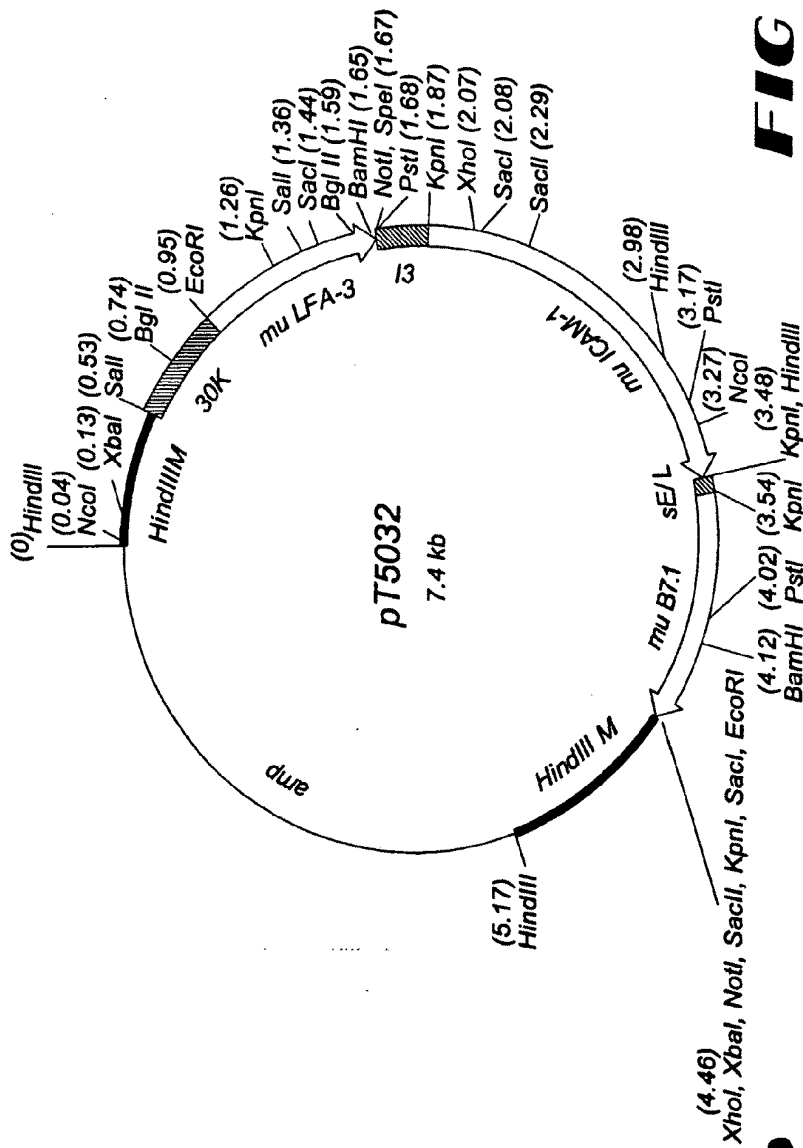


FIG 1



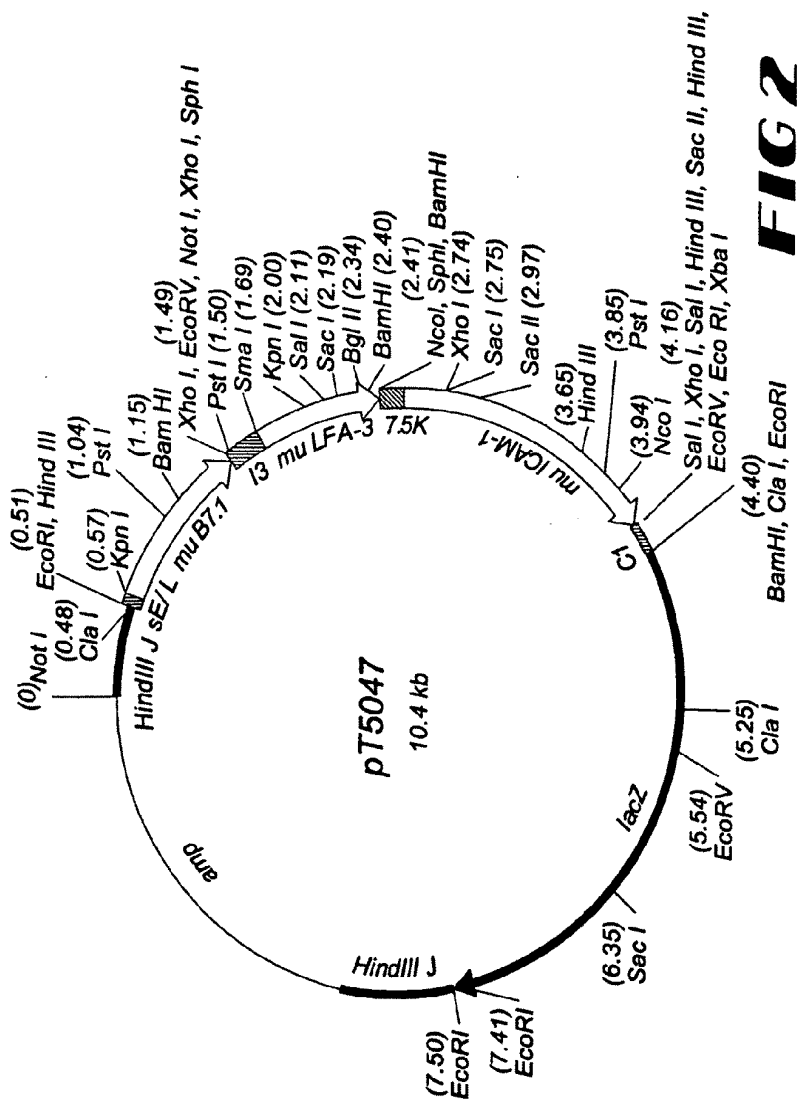


FIG 2



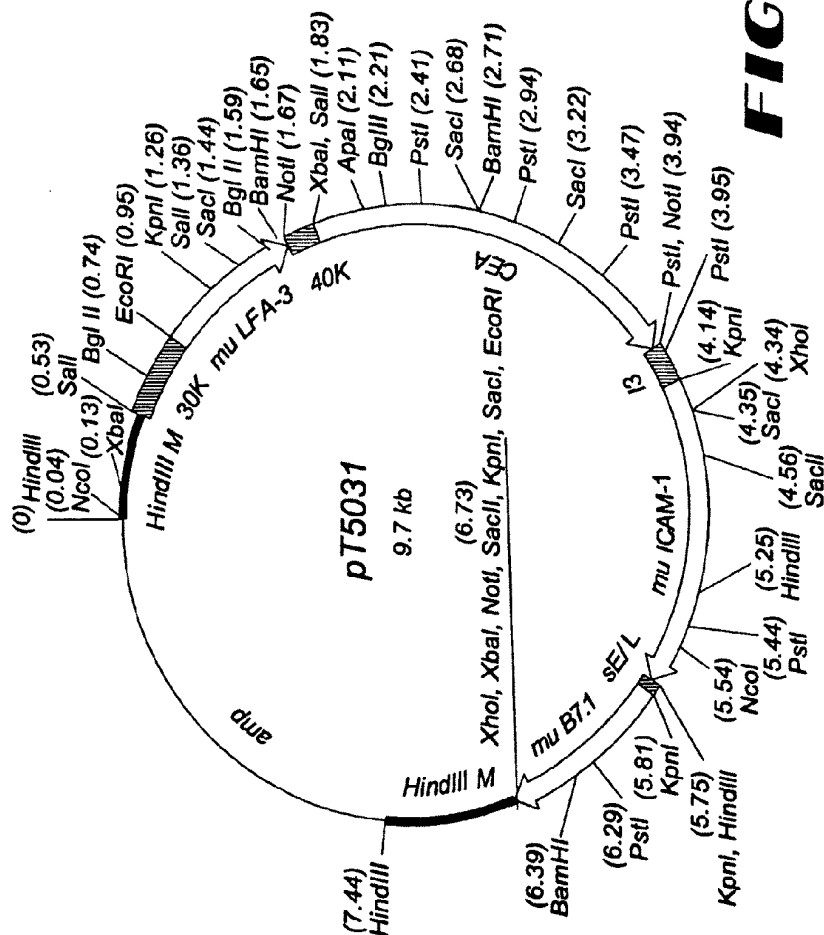


FIG 3



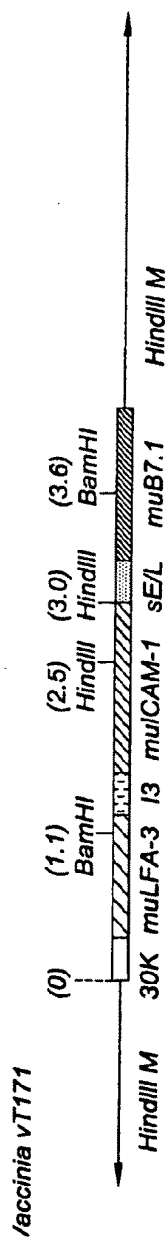


FIG 4A

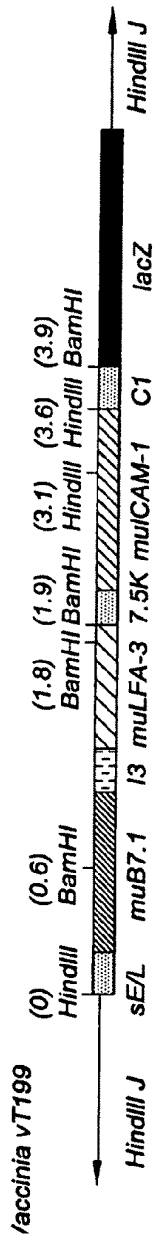


FIG 4B

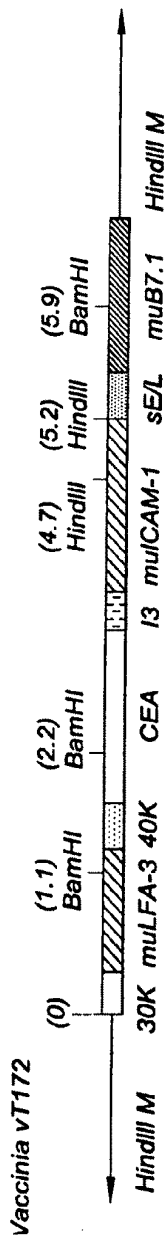


FIG 4C



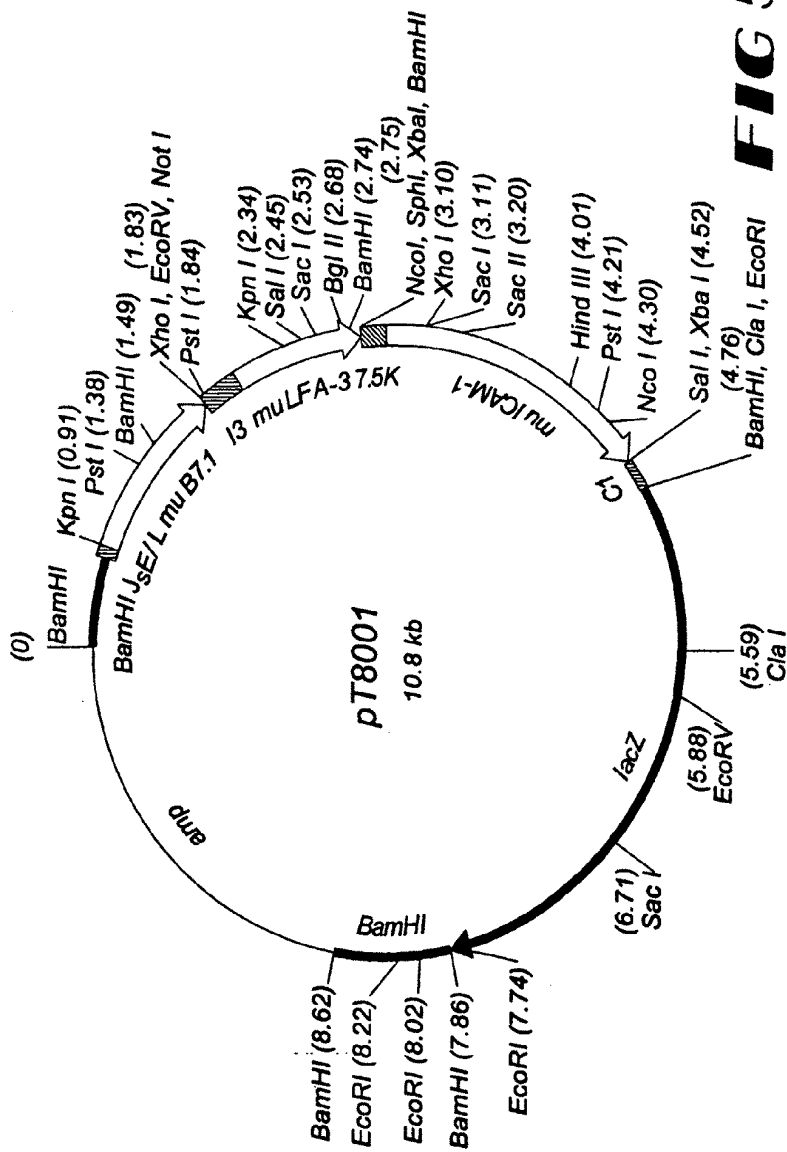


FIG 5



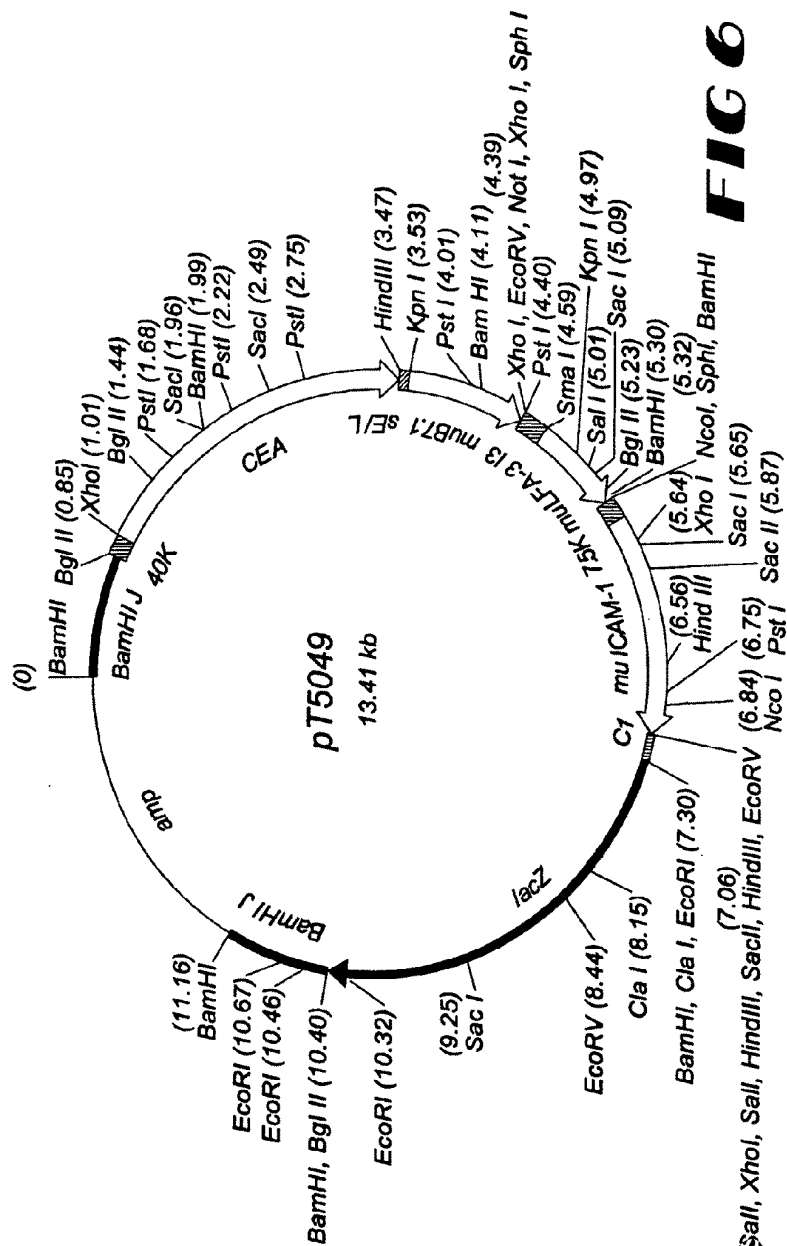


FIG 6



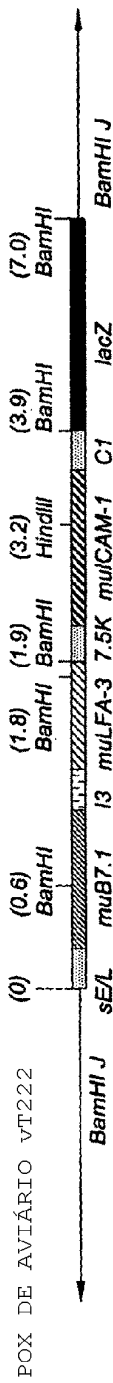


FIG 7A

POX DE AVIÁRIO VT194

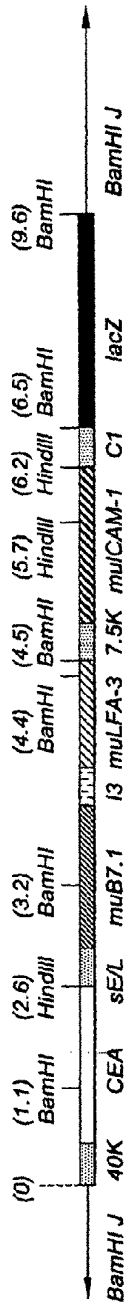


FIG 7B

POX DE AVIÁRIO F-MUC-1/TRICOM



FIG 7C

POX DE AVIÁRIO rF-TAA/TRICOM



FIG 7D



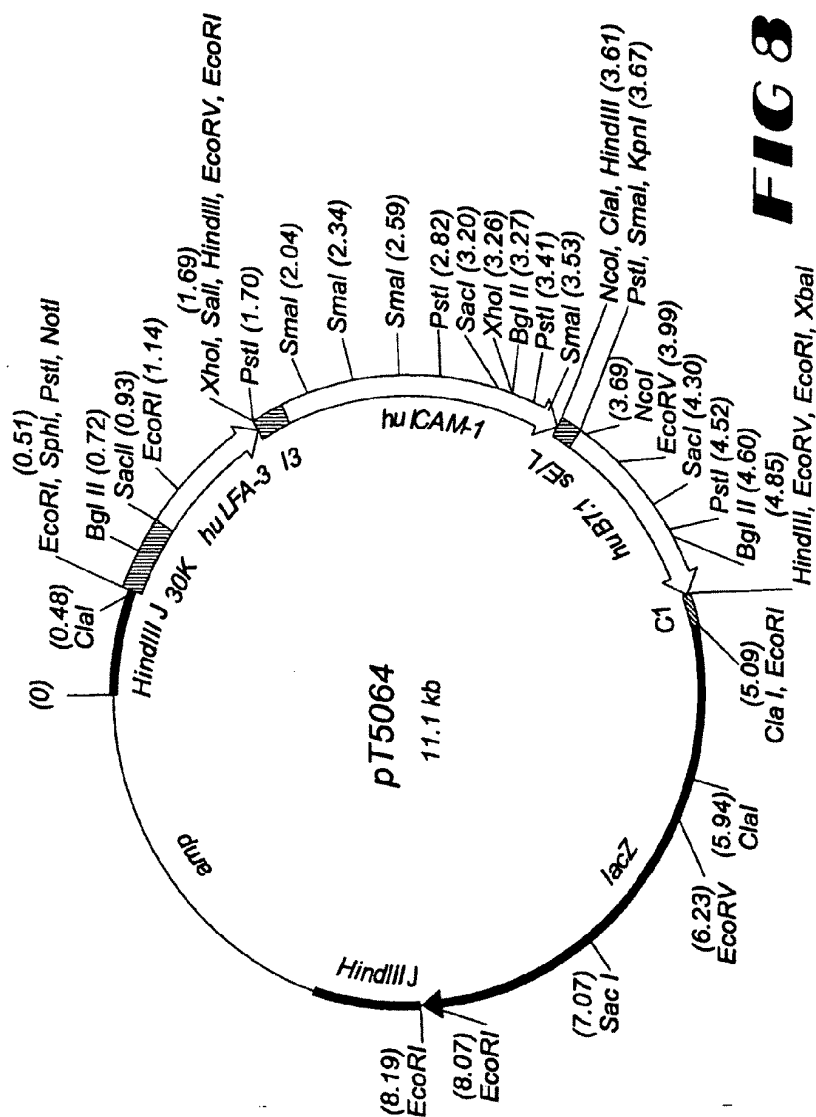


FIG 8



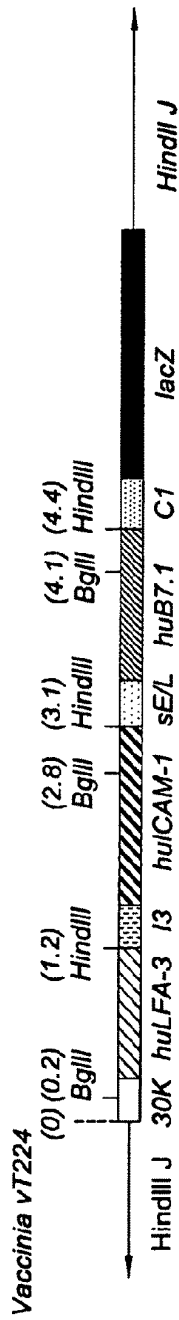


FIG 9A

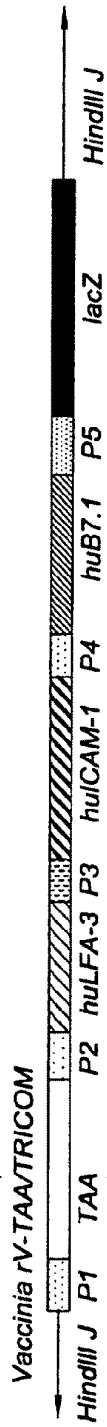


FIG 9B

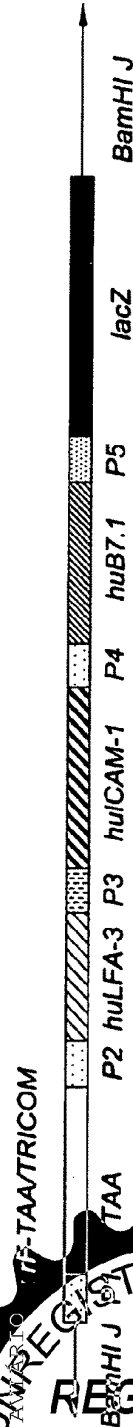


FIG 9C



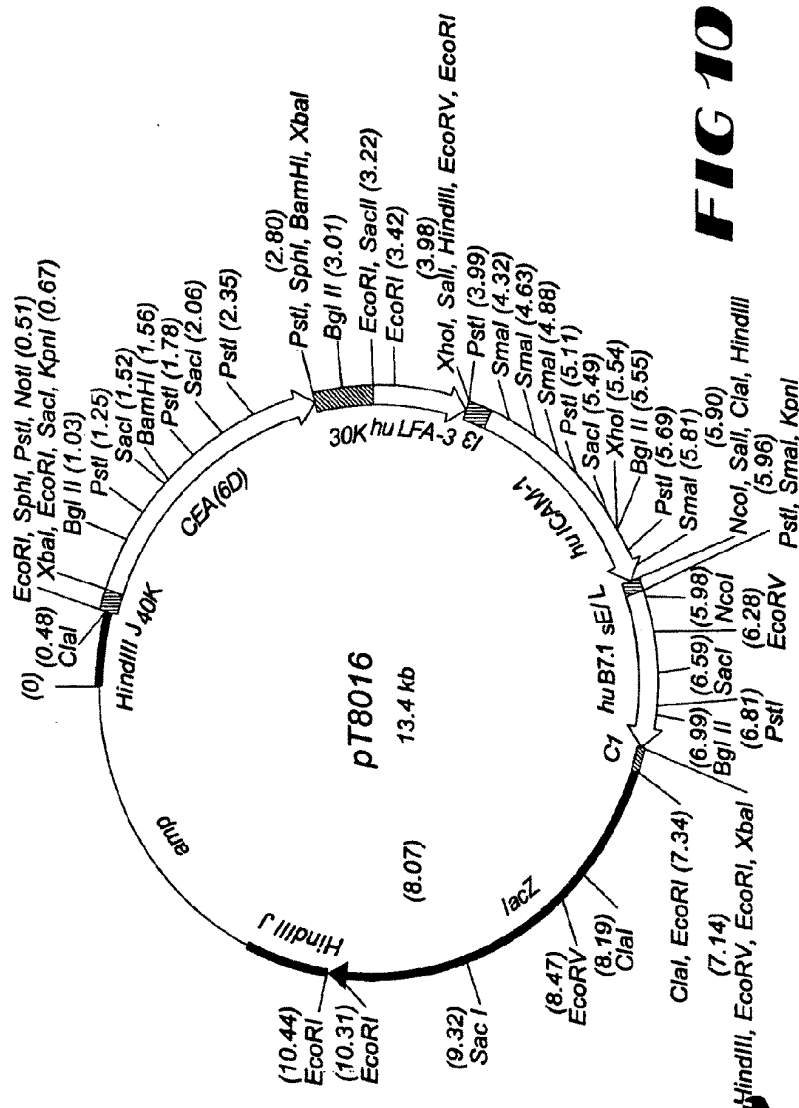


FIG 10



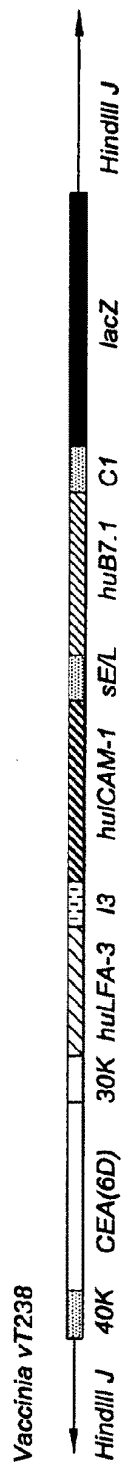


FIG 11



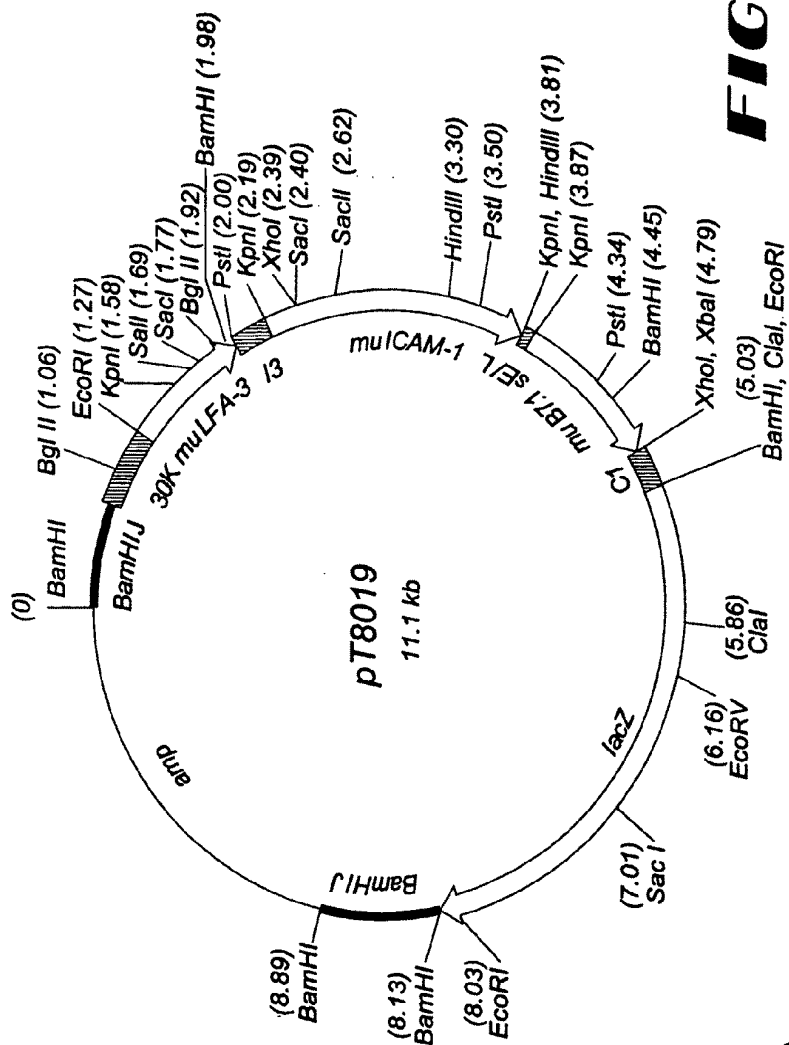


FIG 12



POX DE AVIÁRIO VT251

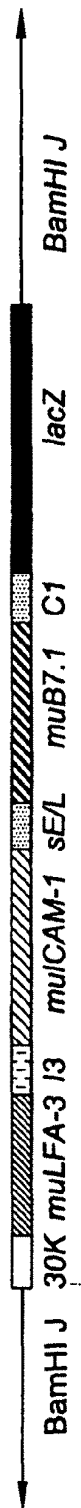


FIG 13A

POX DE AVIÁRIO VT232



FIG 13B



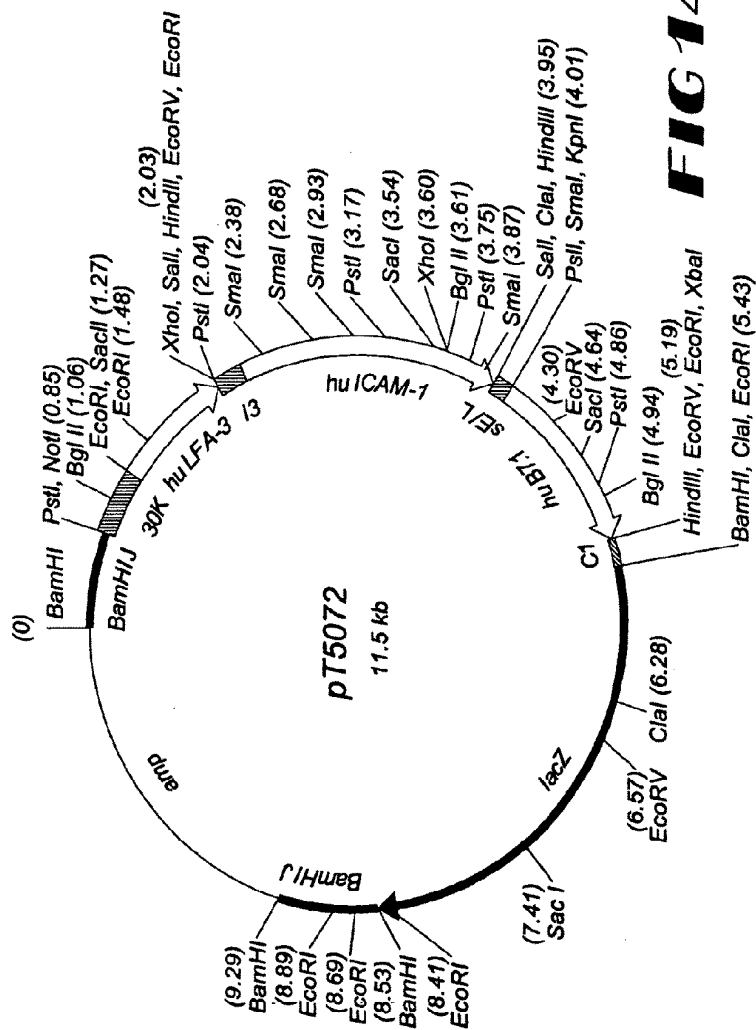


FIG 14



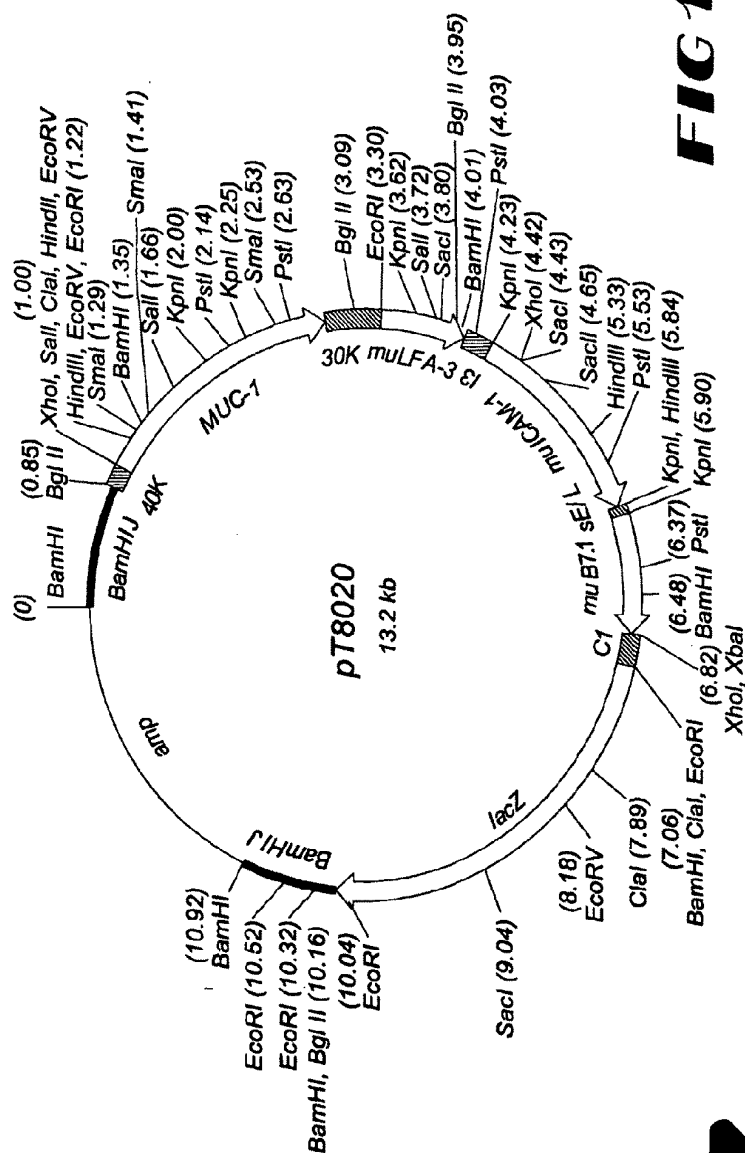


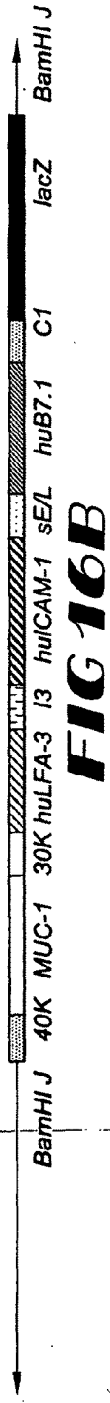
FIG 15



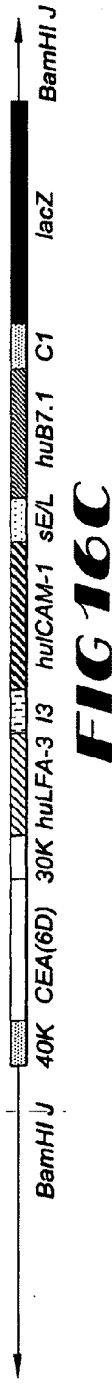
POX DE AVIÁRIO vt250



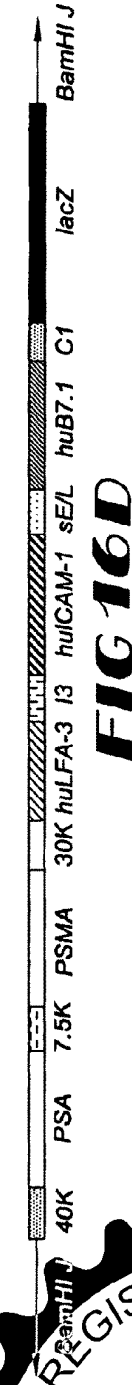
POX DE AVIÁRIO vt242



POX DE AVIÁRIO vt236



POX DE AVIÁRIO vt257



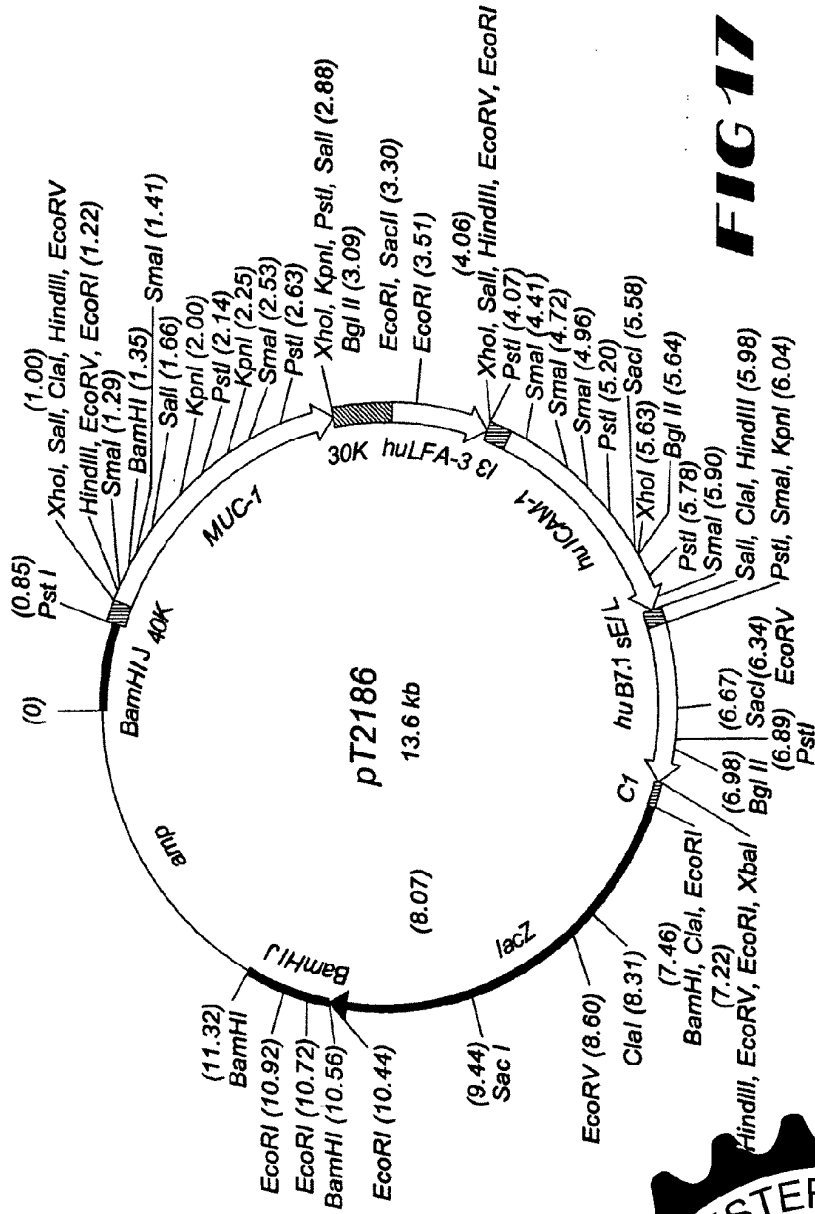


FIG 17



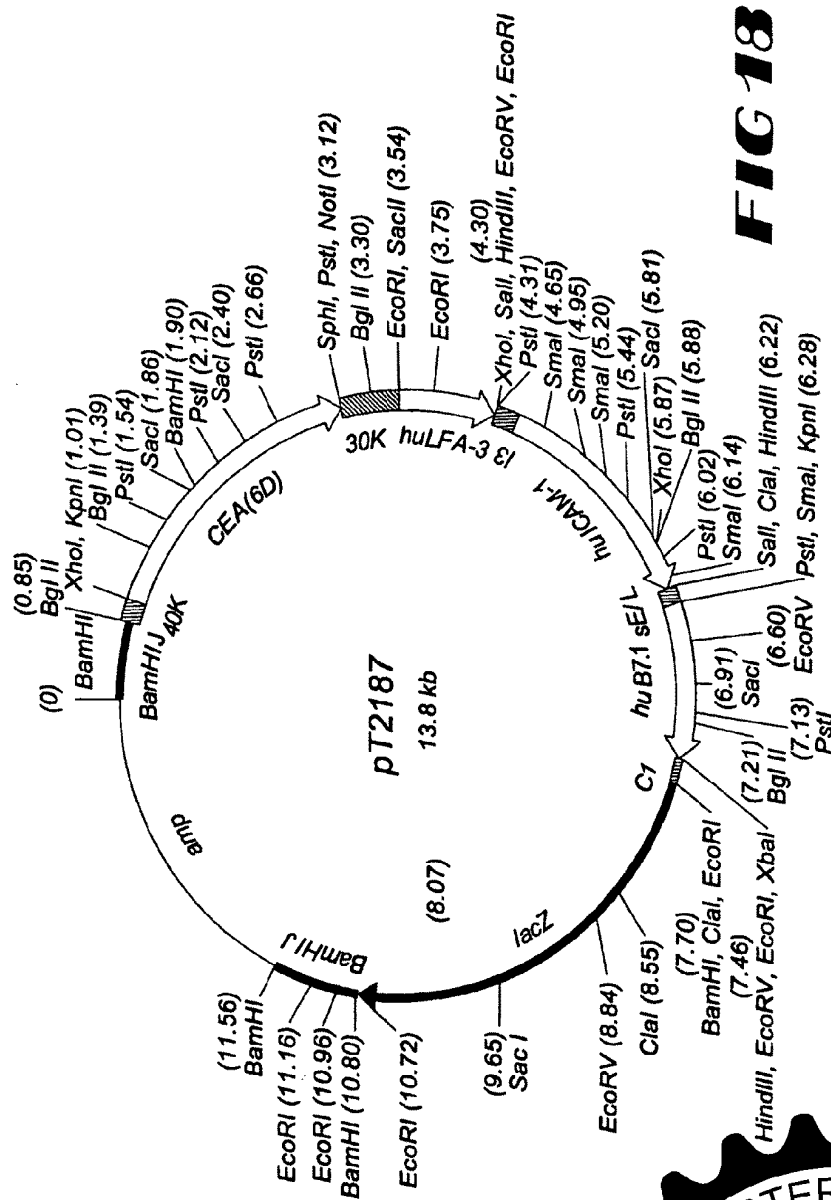


FIG 18



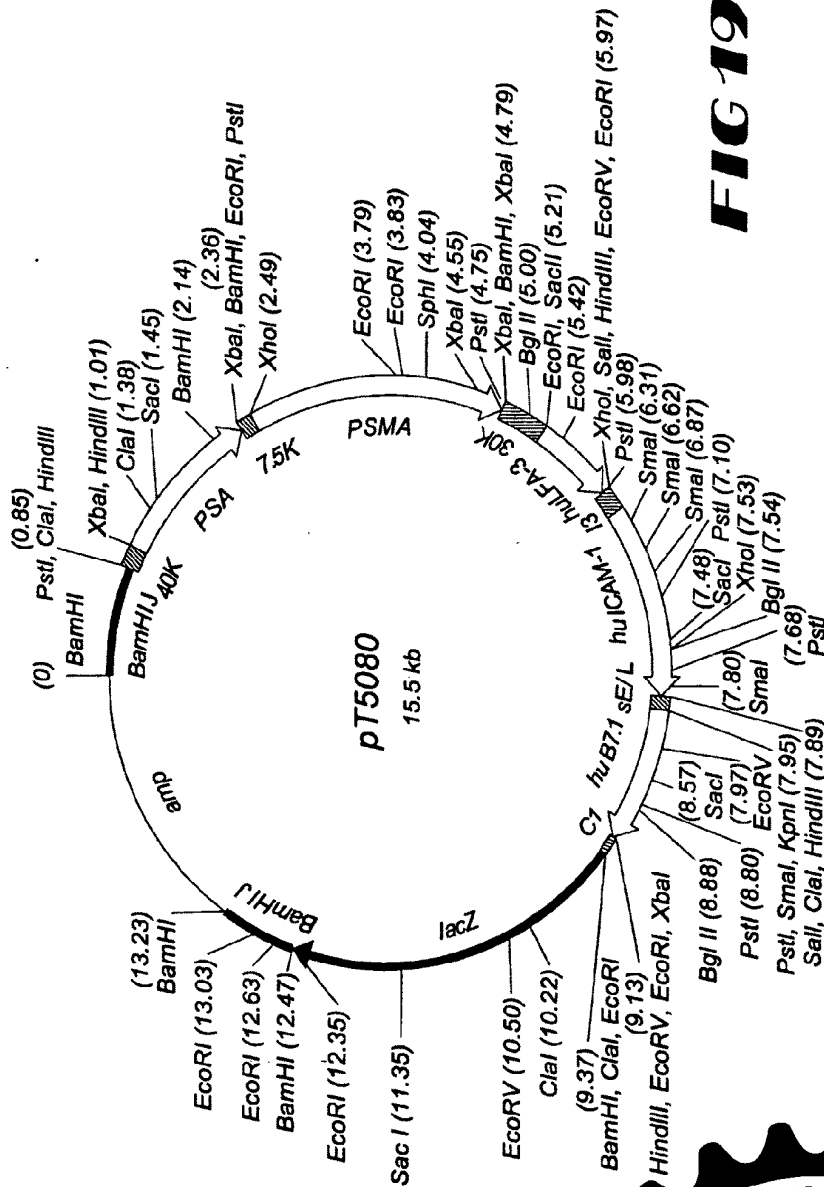


FIG 19



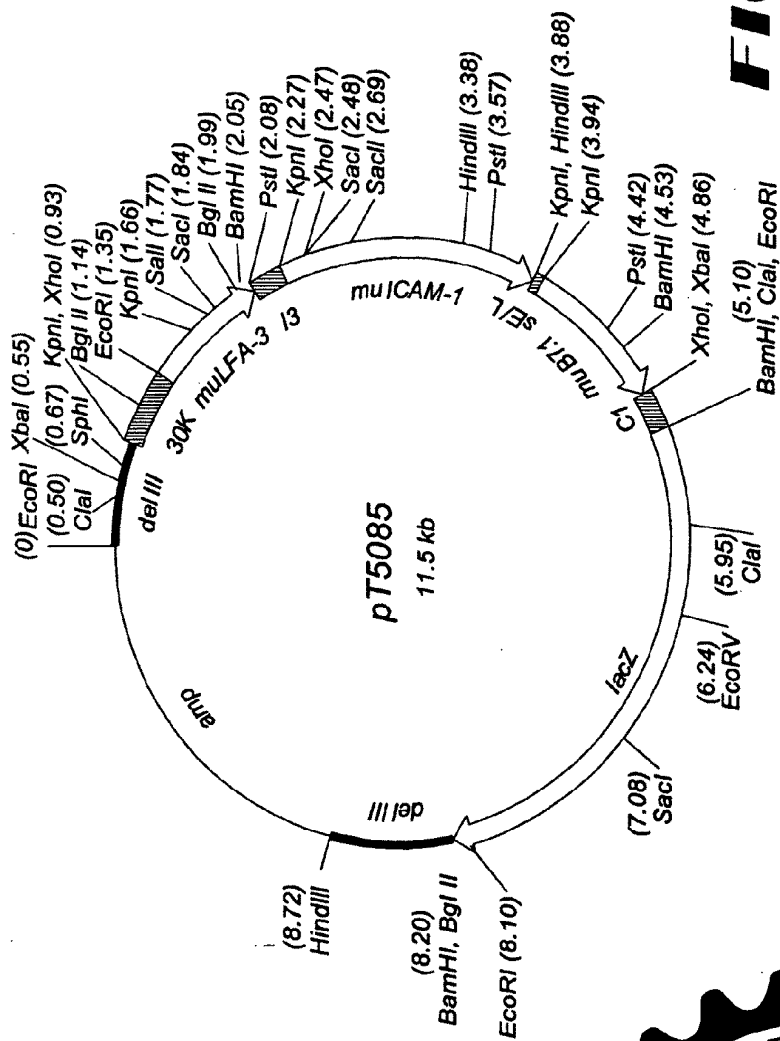


FIG 20





del. III 30K muLFA-3 lacZ C1 muB7.1 sE/L del. III

FIG 21A

[illegible]

FIG 21B



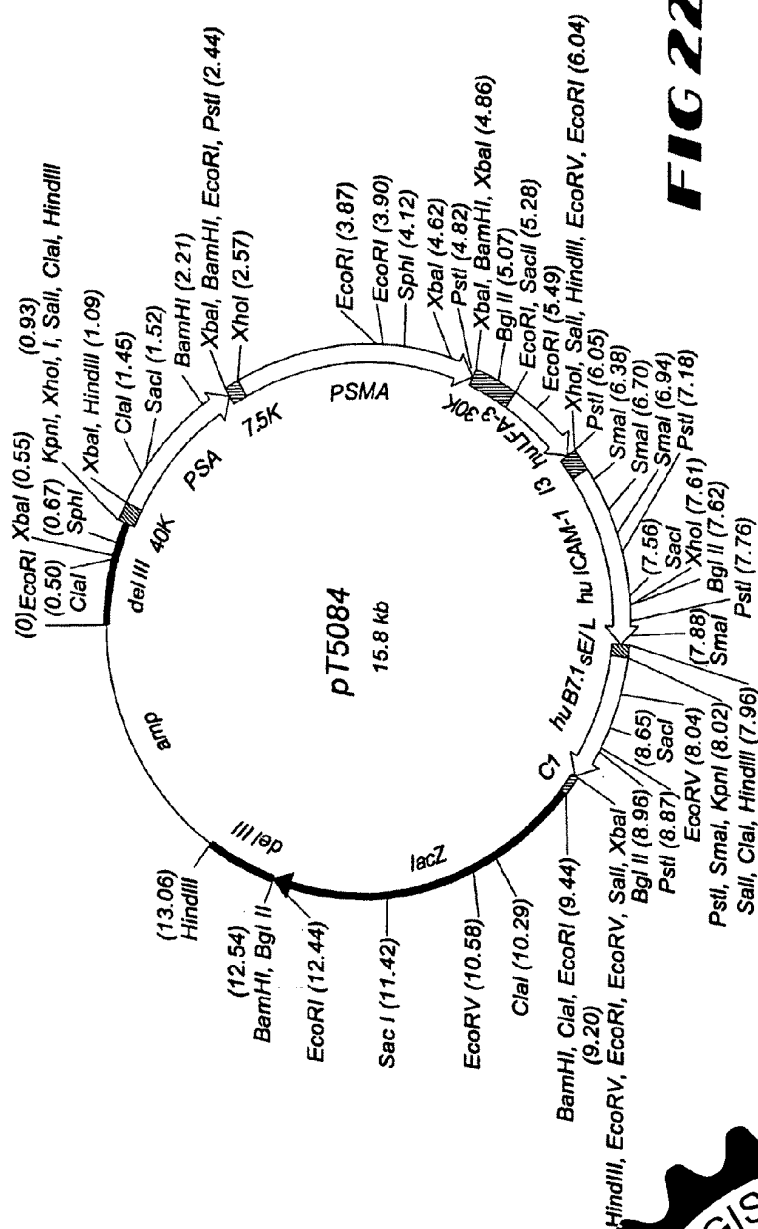


FIG 22



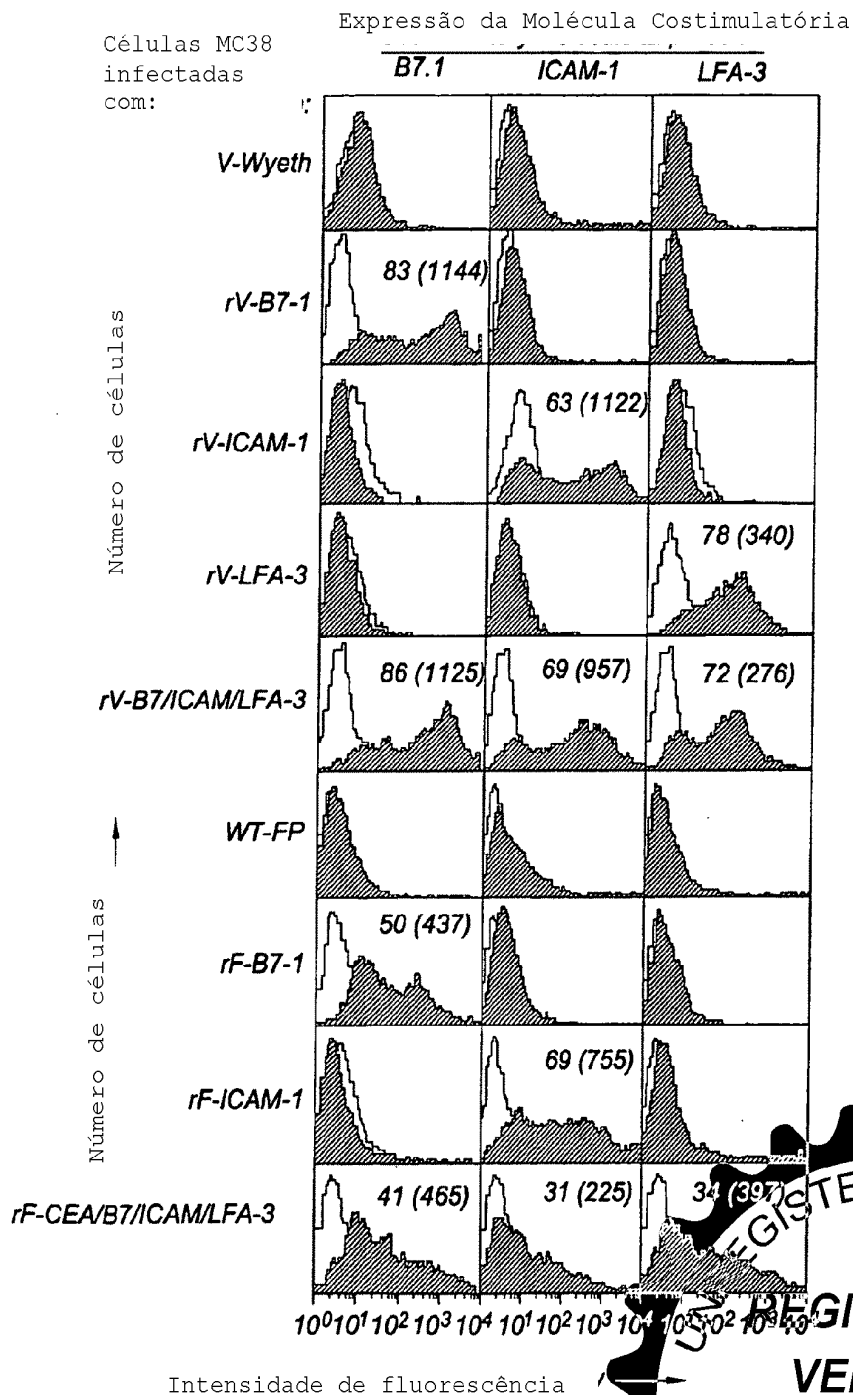


FIG 23





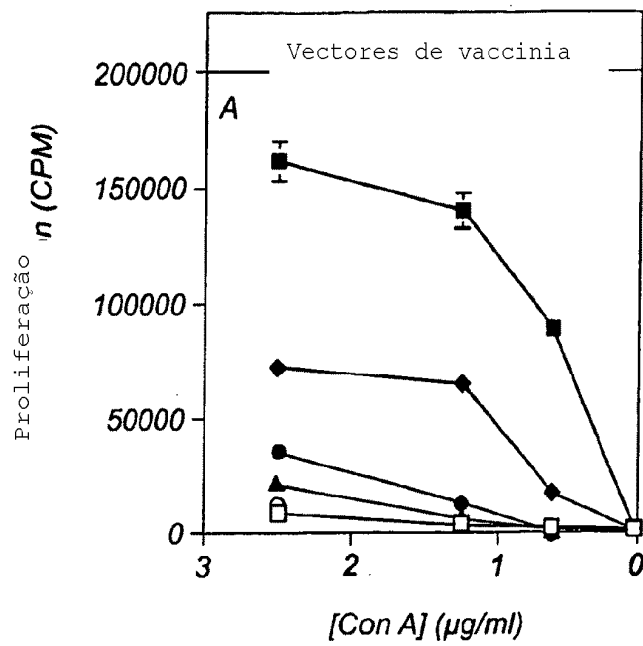


FIG 24A

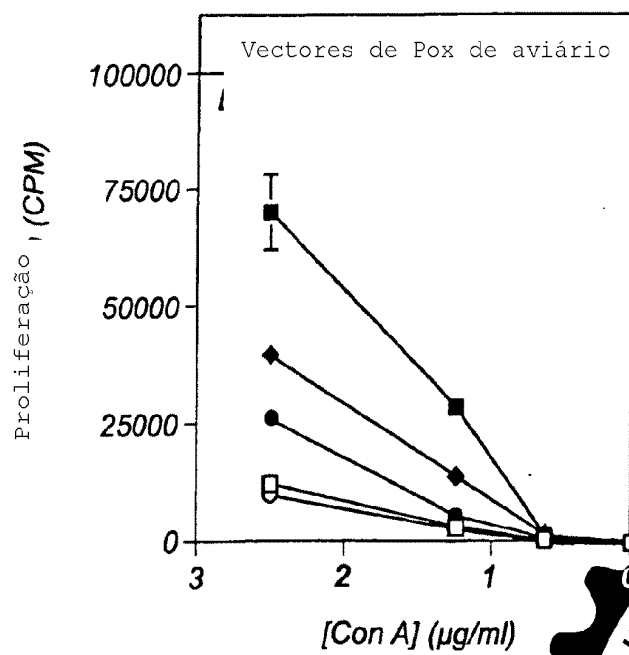


FIG 24B



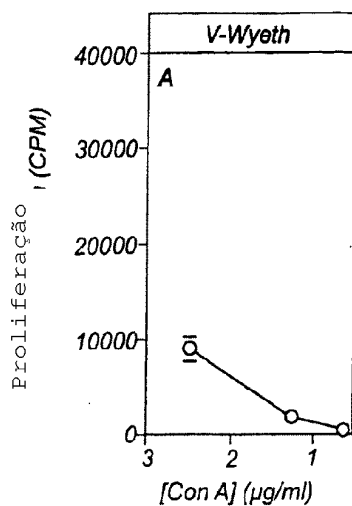


FIG 25A

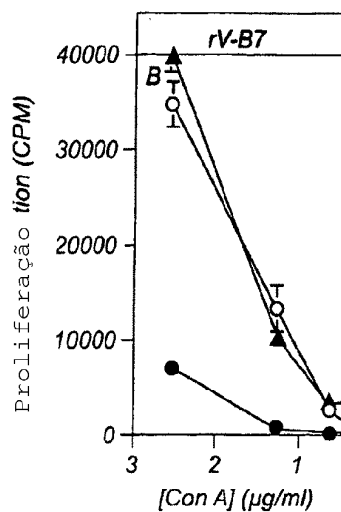


FIG 25B

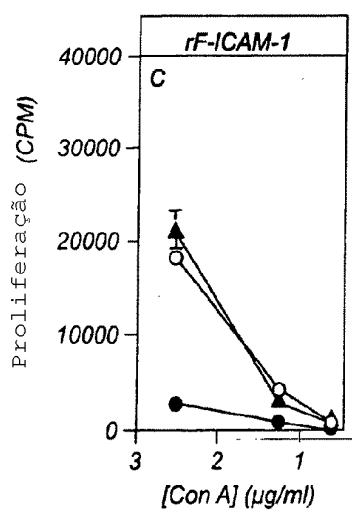


FIG 25C

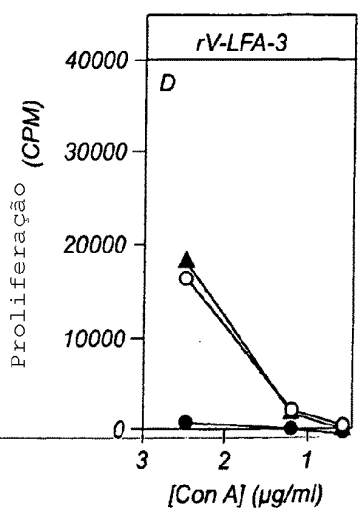


FIG 25D



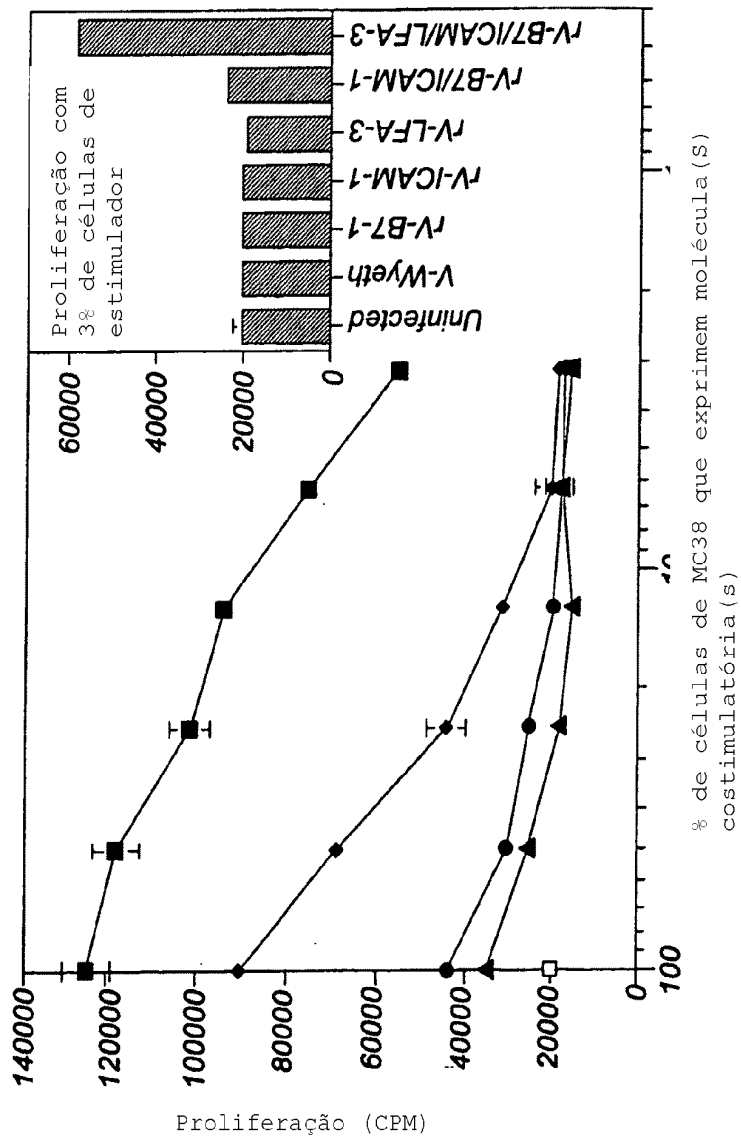
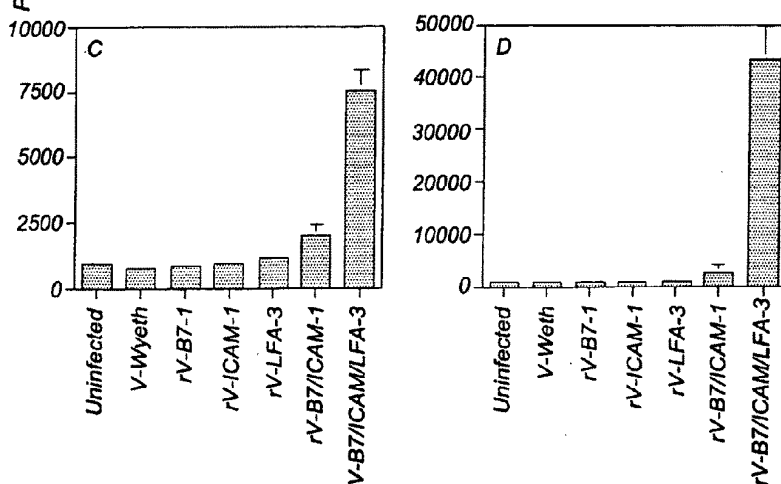
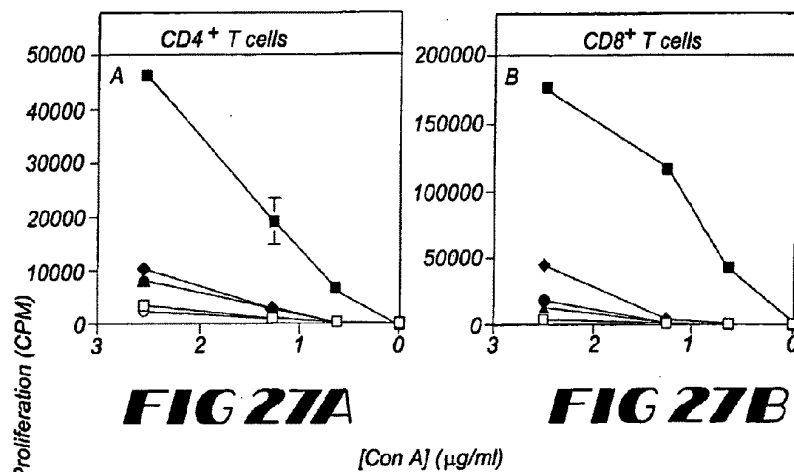


FIG 26

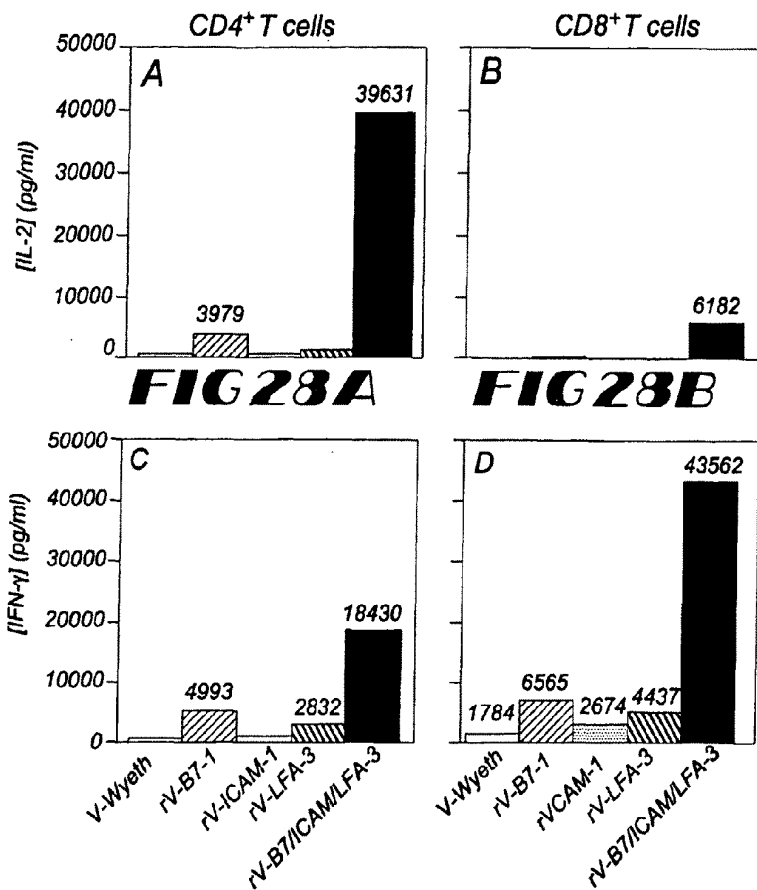




Células de estimulador MC38 infectadas com:

FIG 27C **FIG 27D**



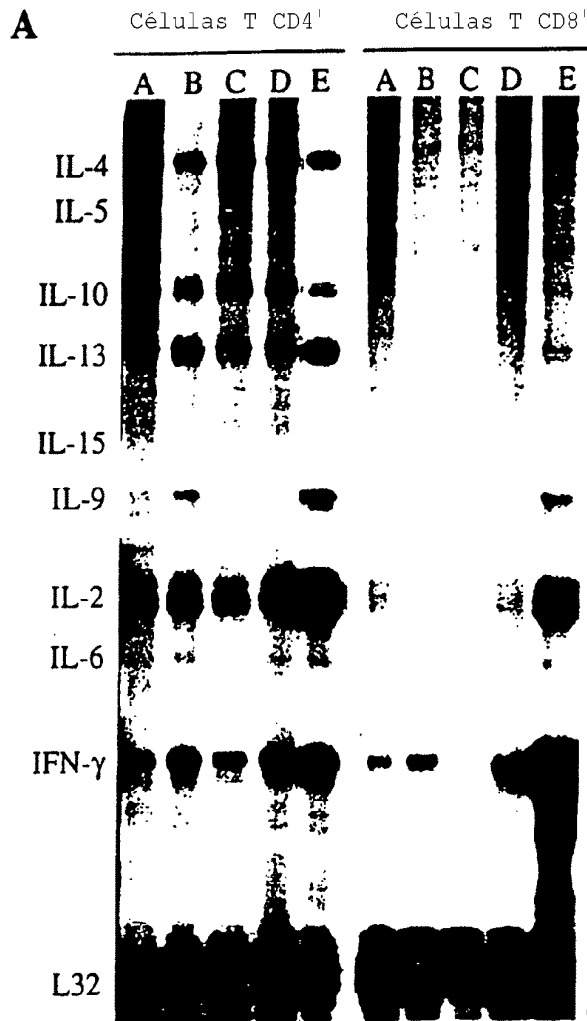


Células de estimulador MC38 infectadas com:

FIG 28C **FIG 28D**



FIGURE 29



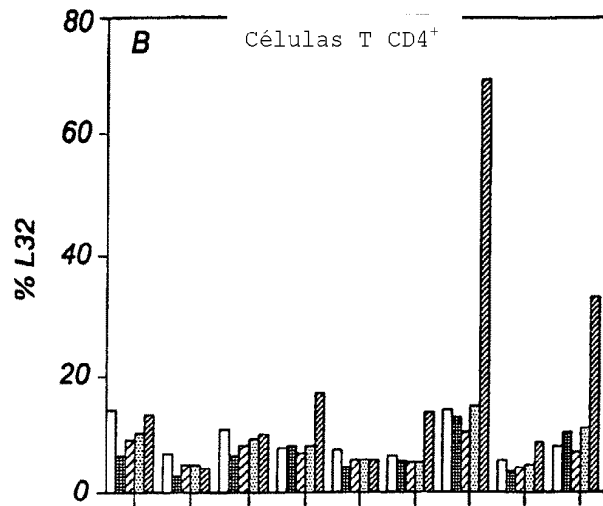


FIG 29B

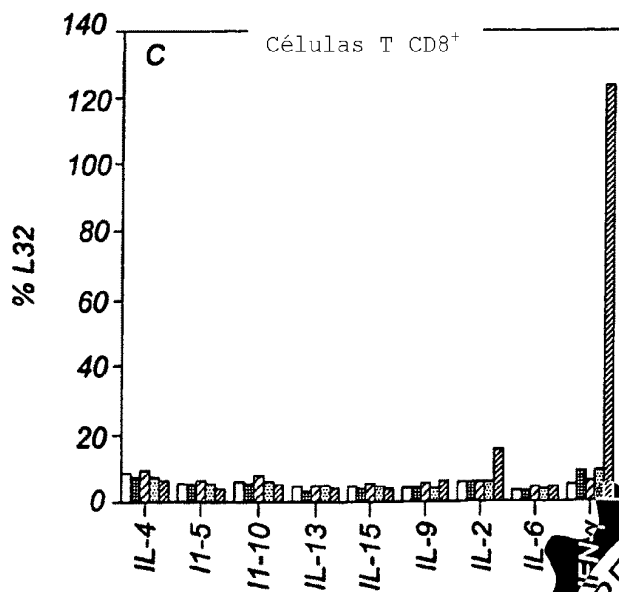


FIG 29C



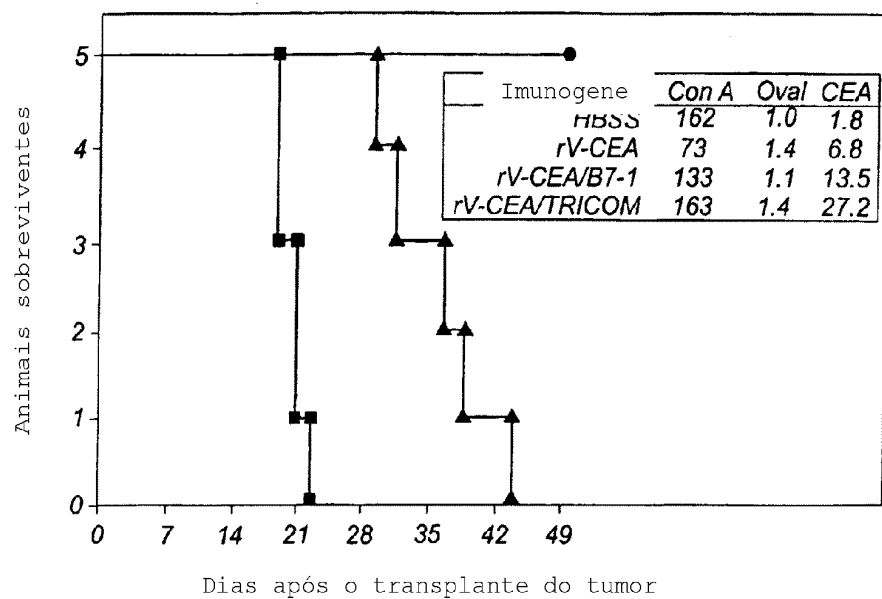


FIG 30



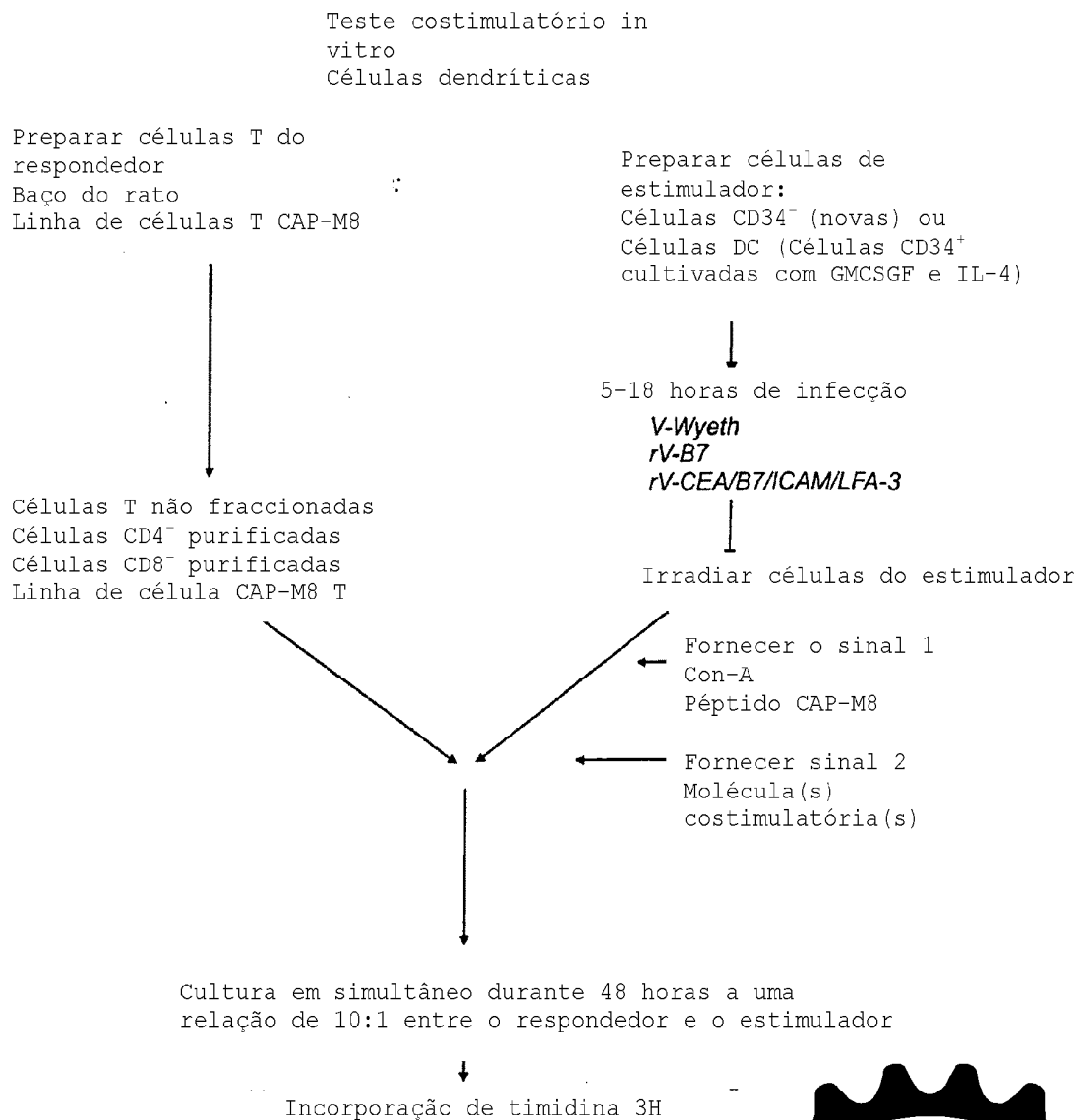


FIG 31



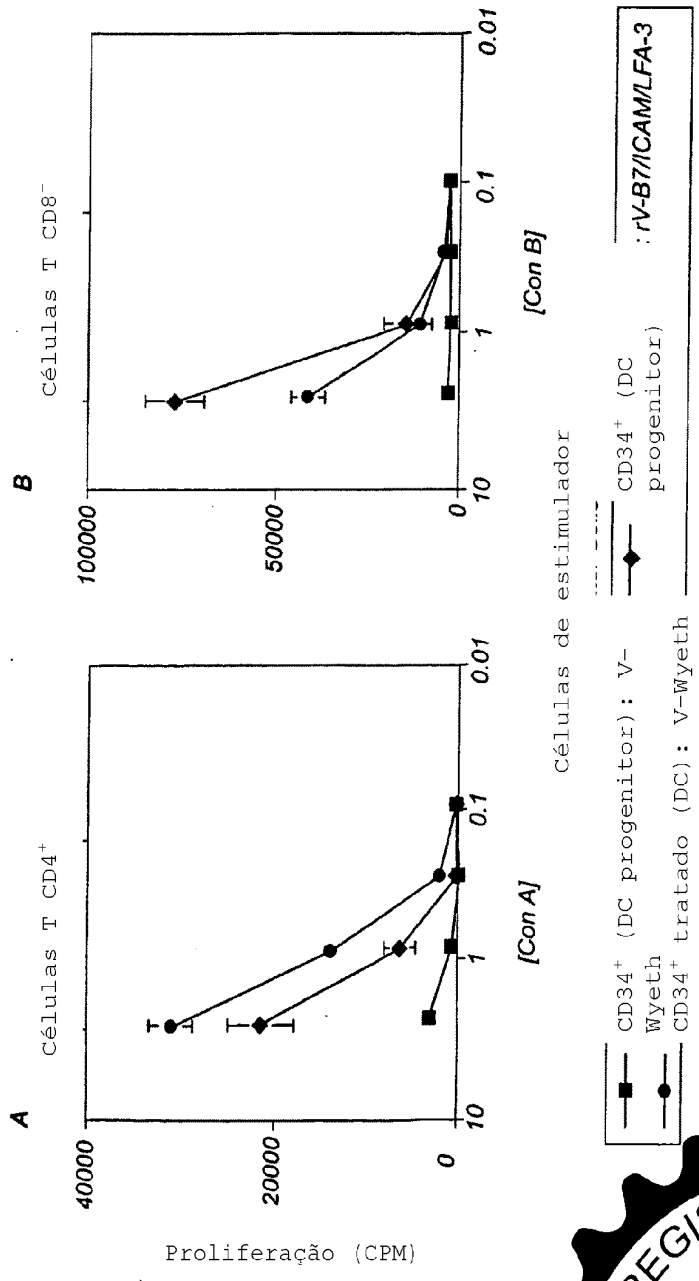


FIG 32A

FIG 32B



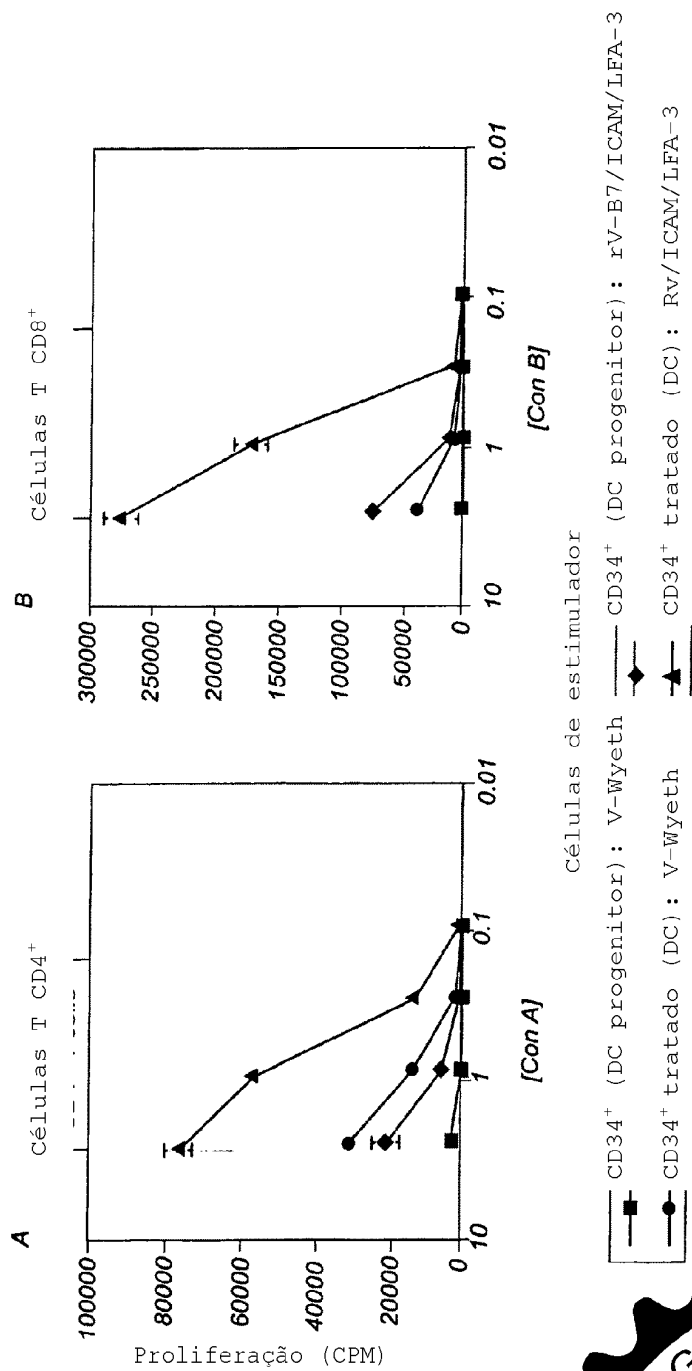


FIG 33B

FIG 33A



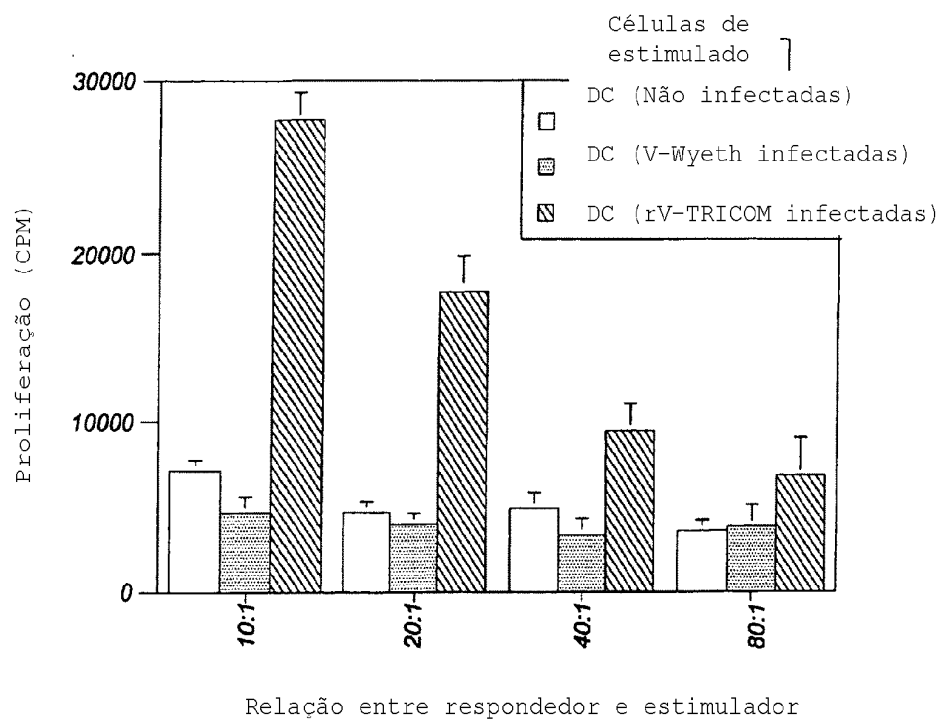


FIG 34



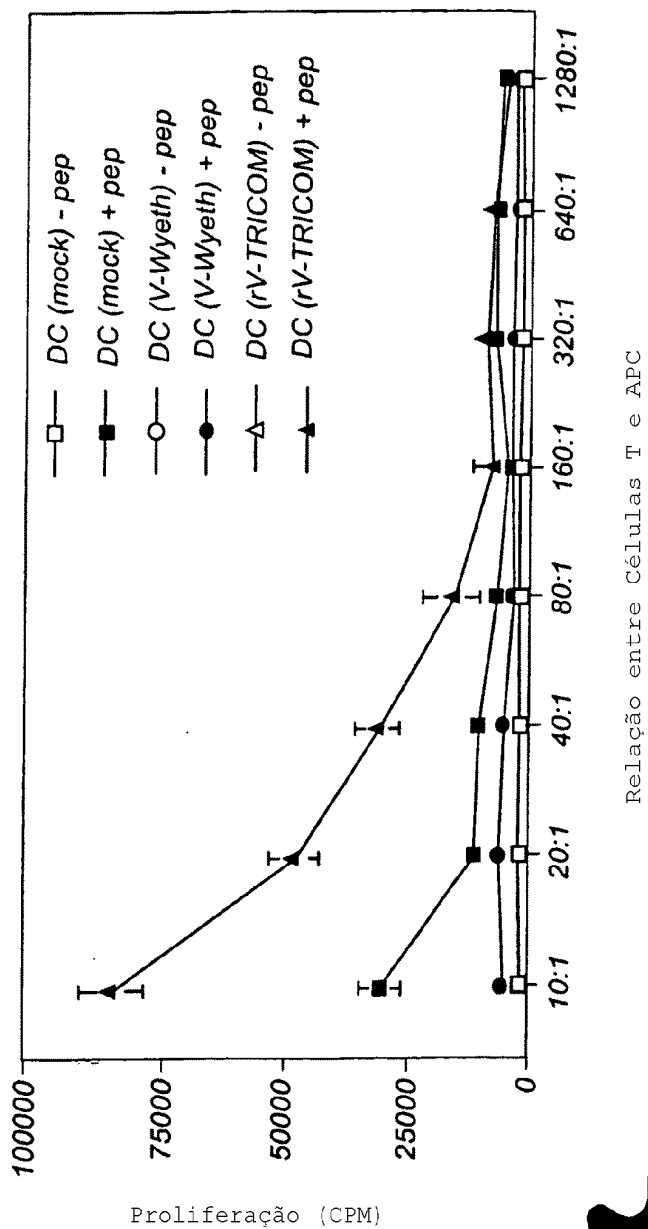


FIG 35



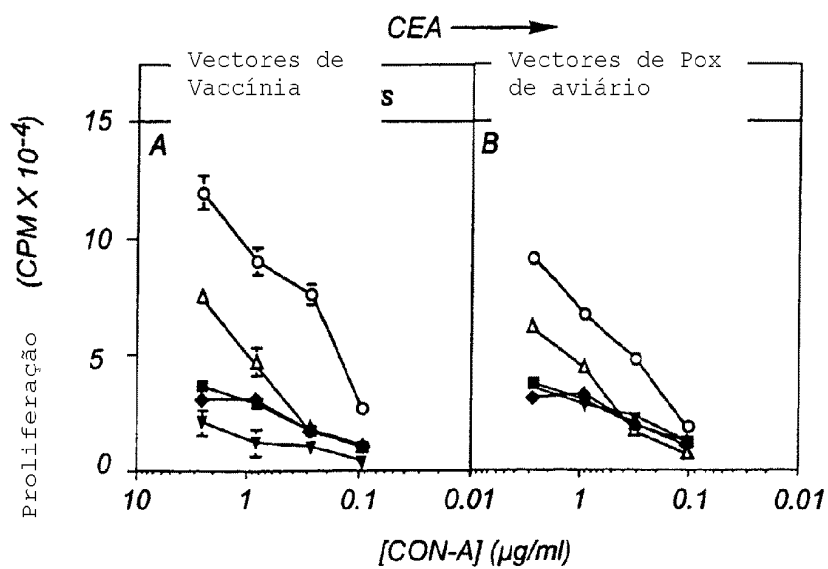


FIG 36A **FIG 36B**



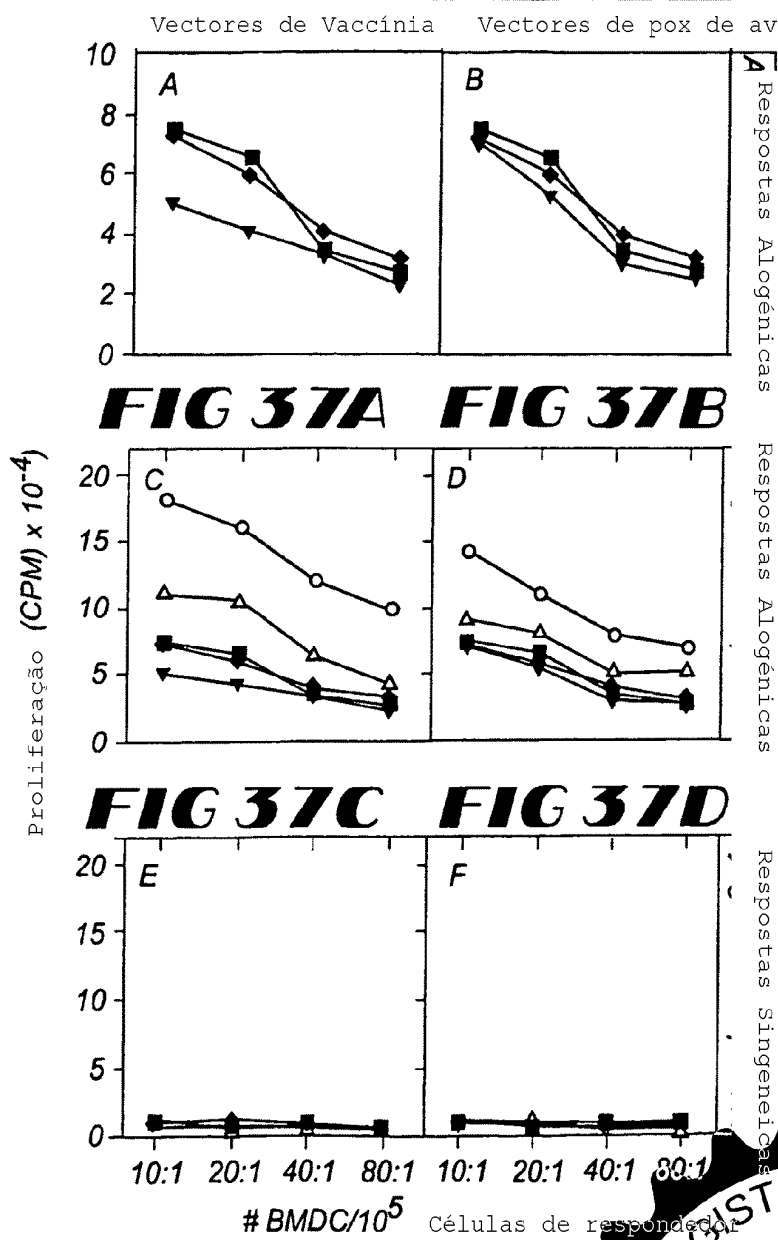


FIG 38A FIG 38B

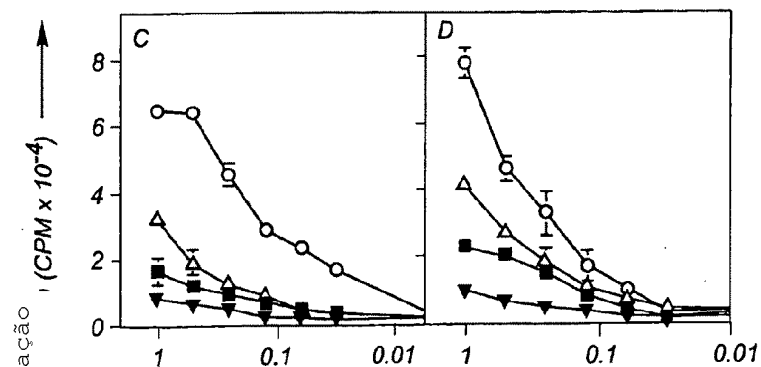


FIG 38C FIG 38D

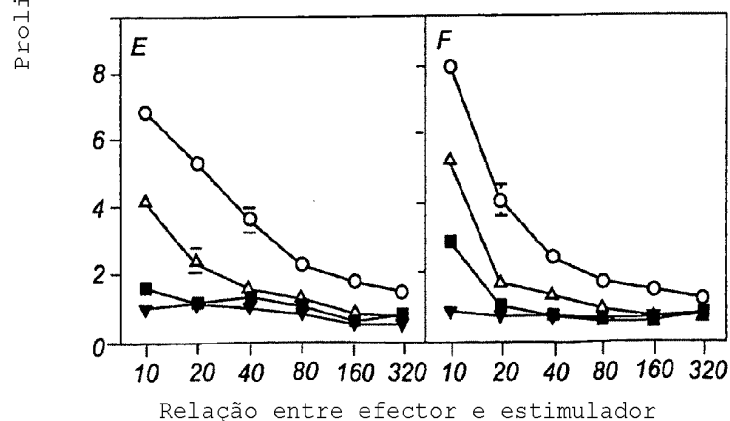


FIG 38F FIG 38E



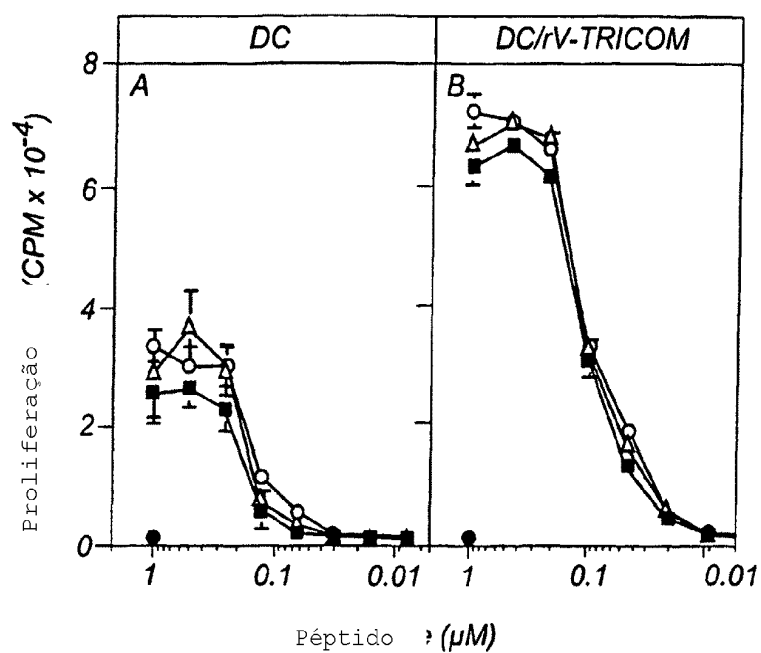


FIG 39A

FIG 39B



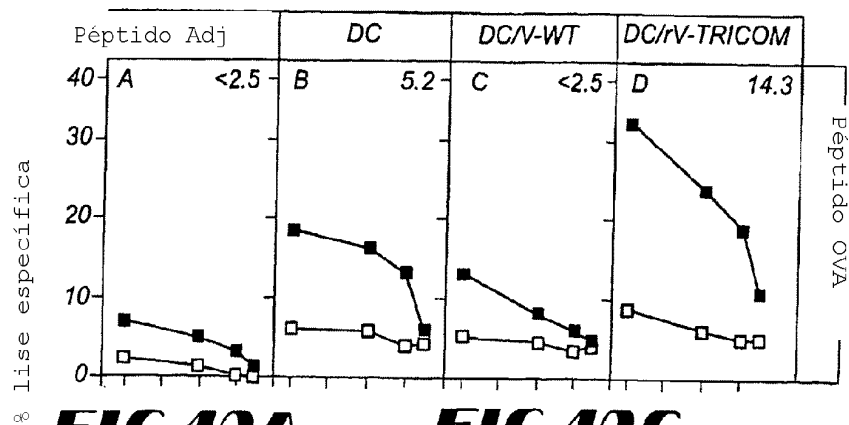


FIG 40A

FIG 40C

FIG 40B

FIG 40D

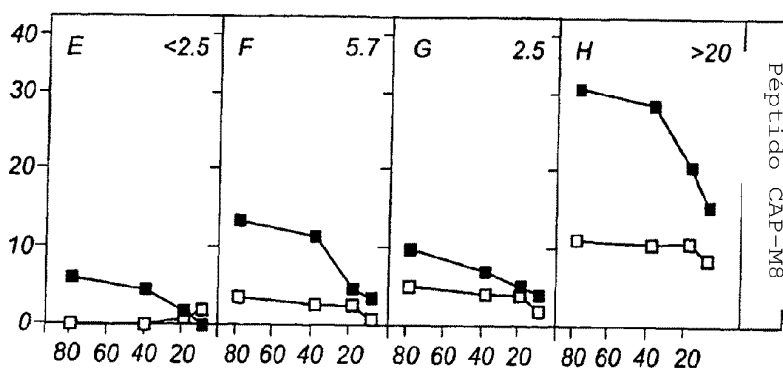


FIG 40E

FIG 40G

FIG 40F

FIG 40H





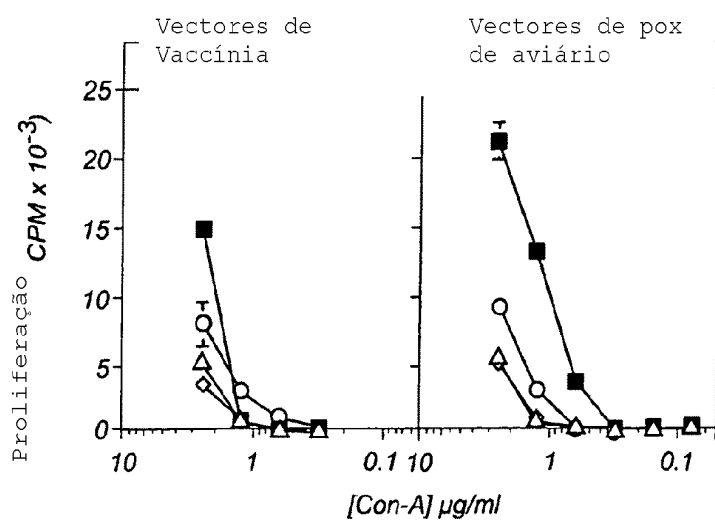


FIG 42A

FIG 42B



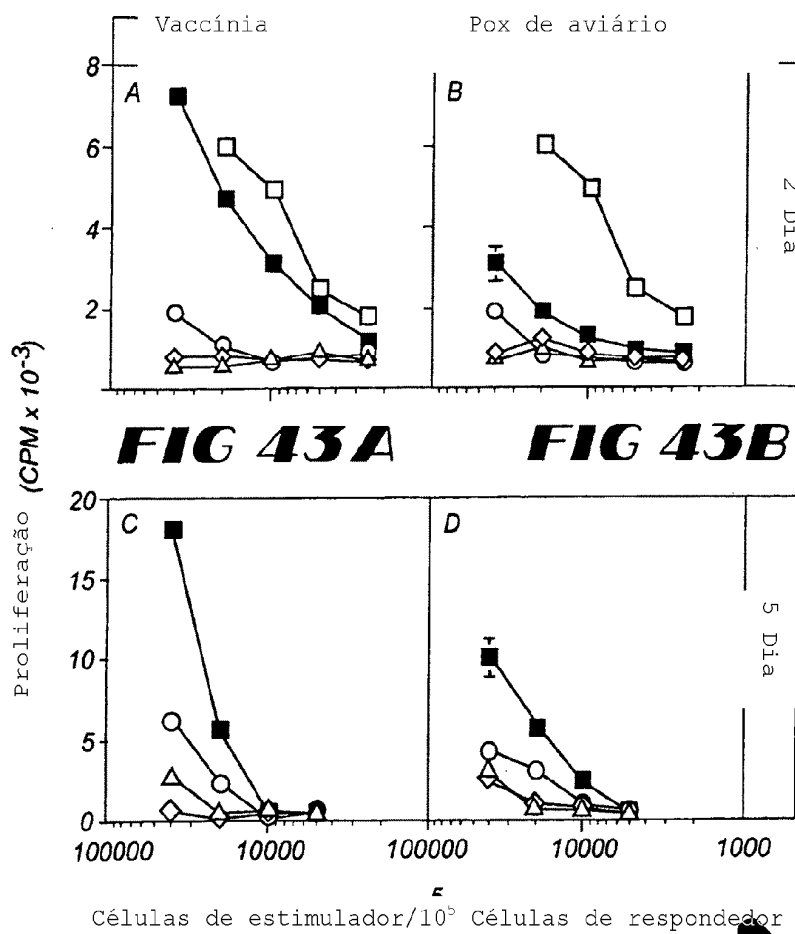
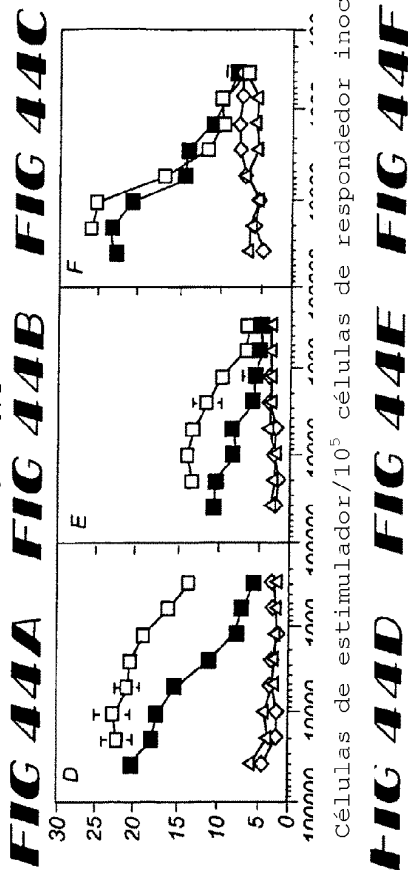
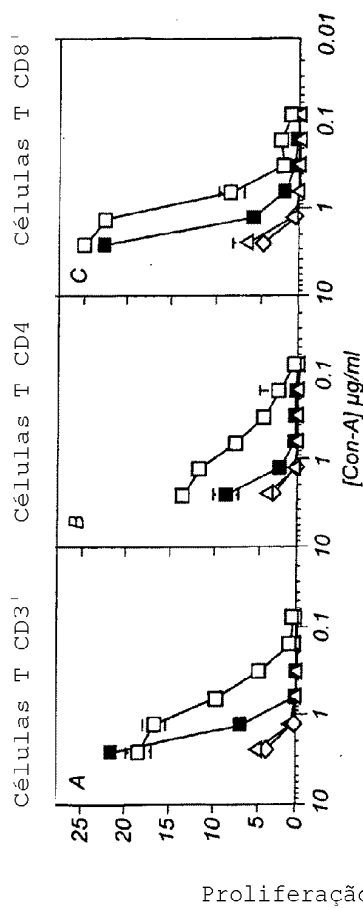
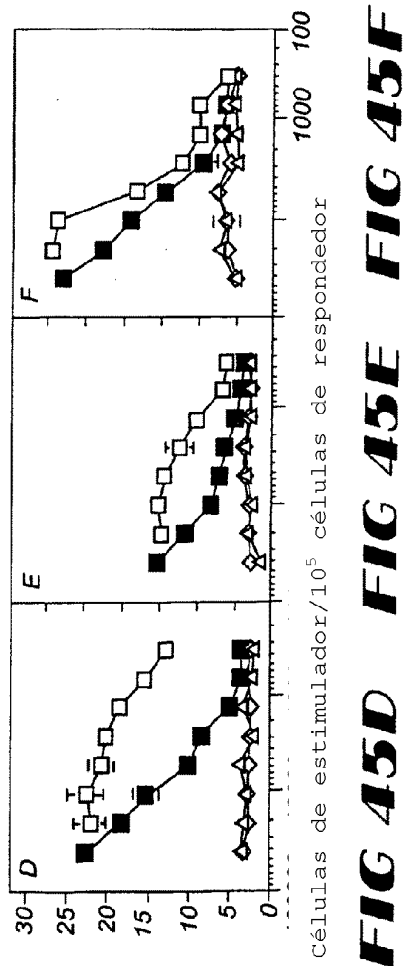
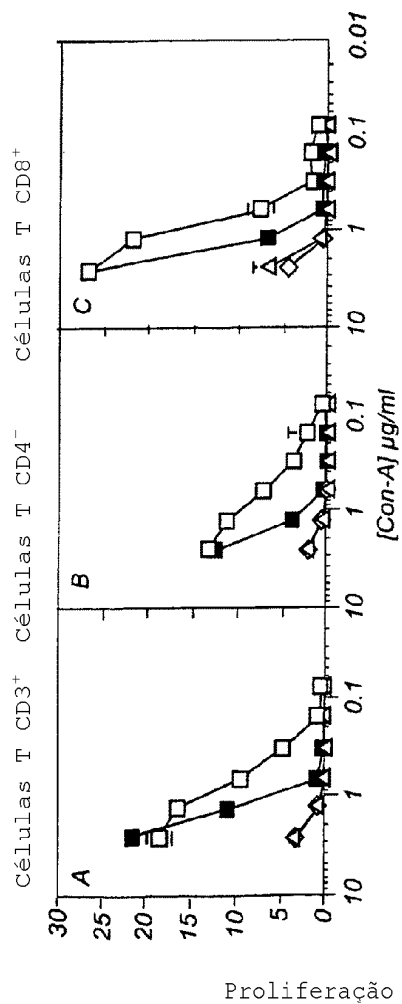


FIG 43C

FIG 43D







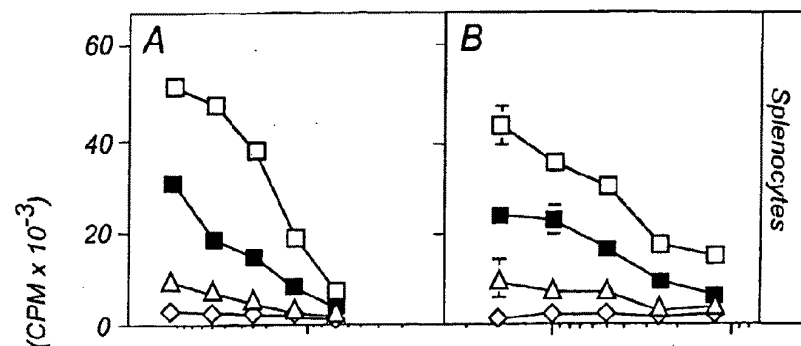
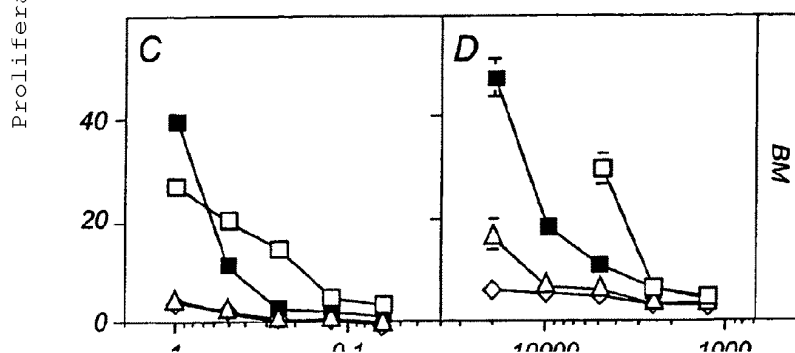


FIG 46A **FIG 46B**



Péptido Cap M8, μ M Células de estimulador 5 x 10⁴ Células de respondedor

FIG 46C **FIG 46D**



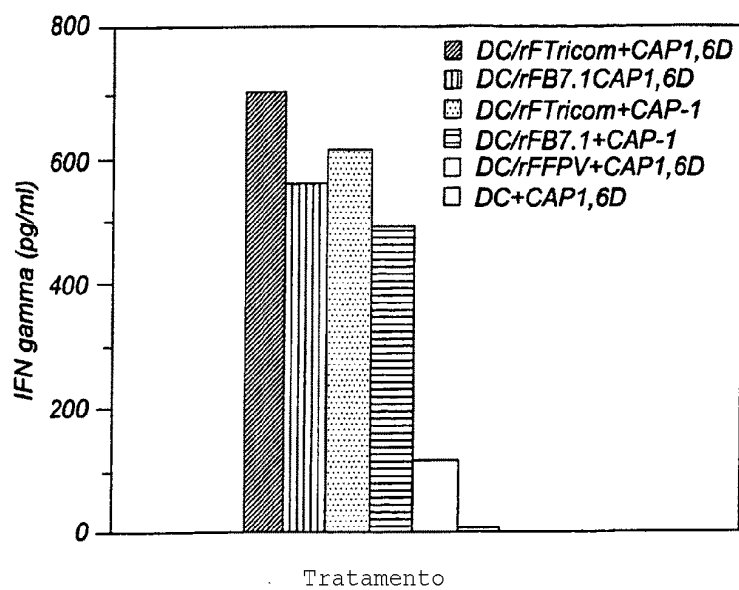


FIG 47



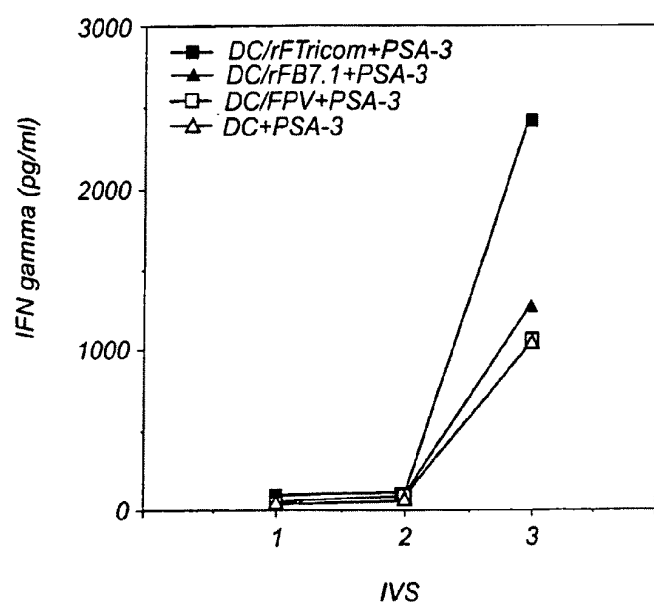


FIG 48



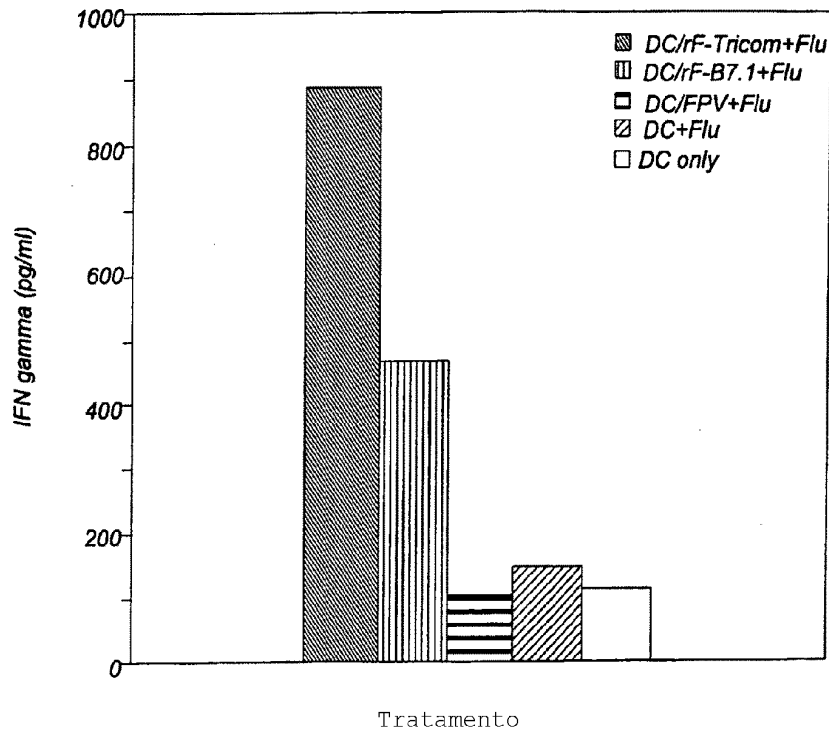


FIG 49



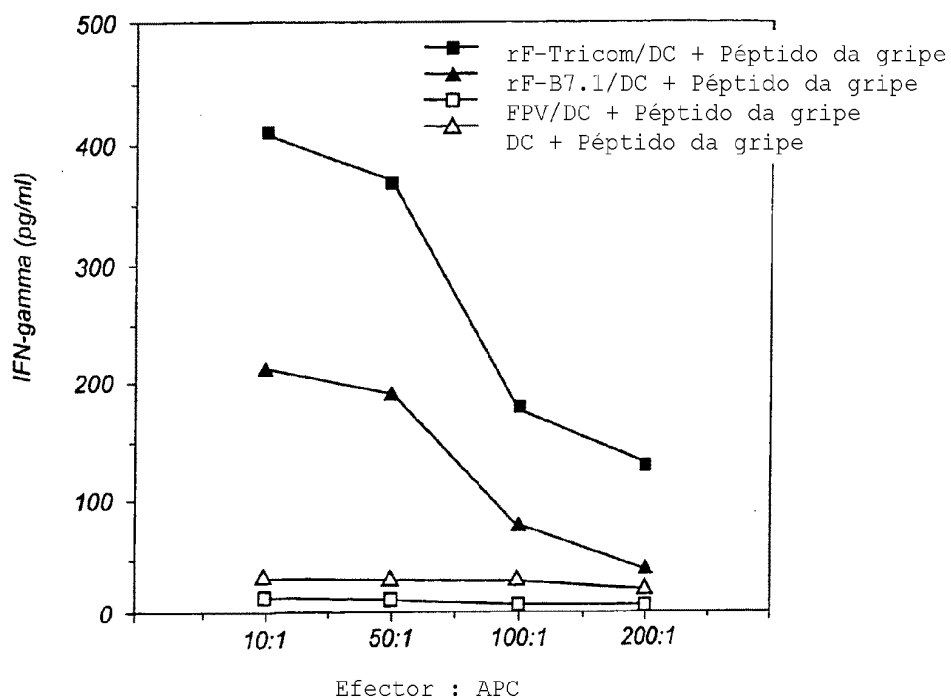


FIG 50



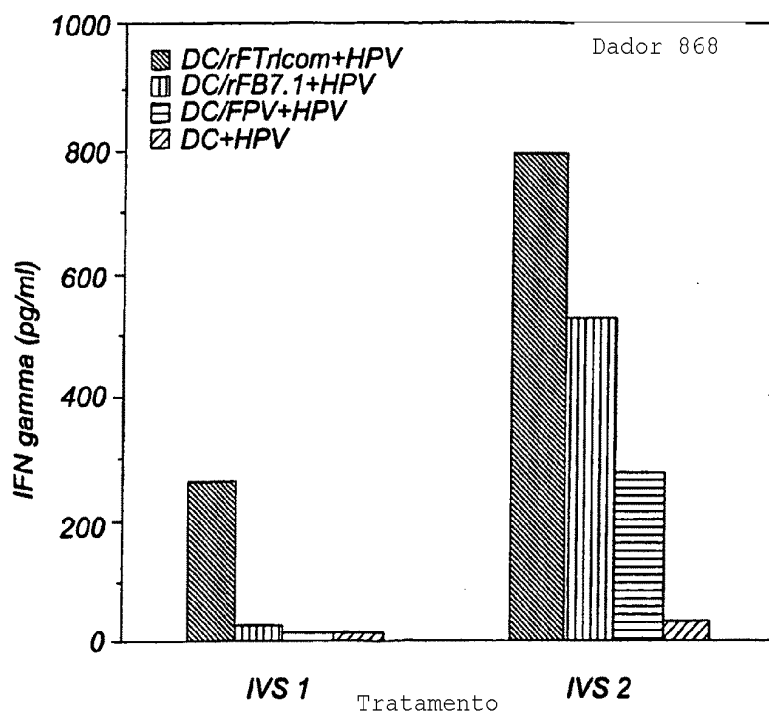


FIG 51



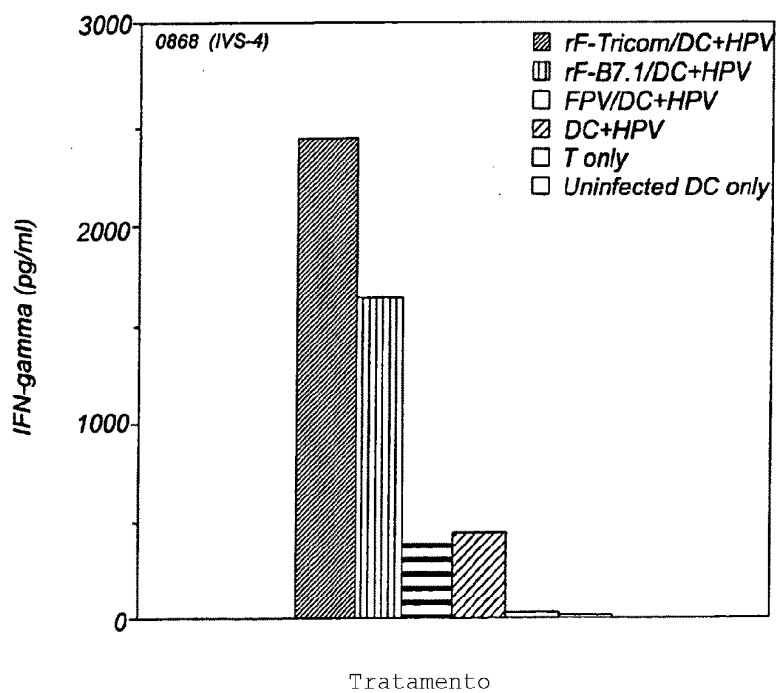


FIG 52



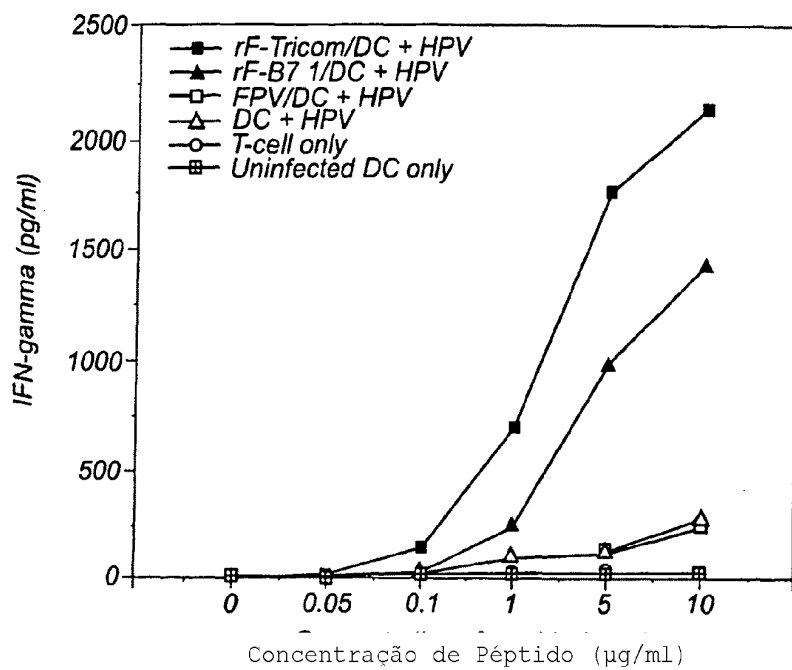


FIG 53



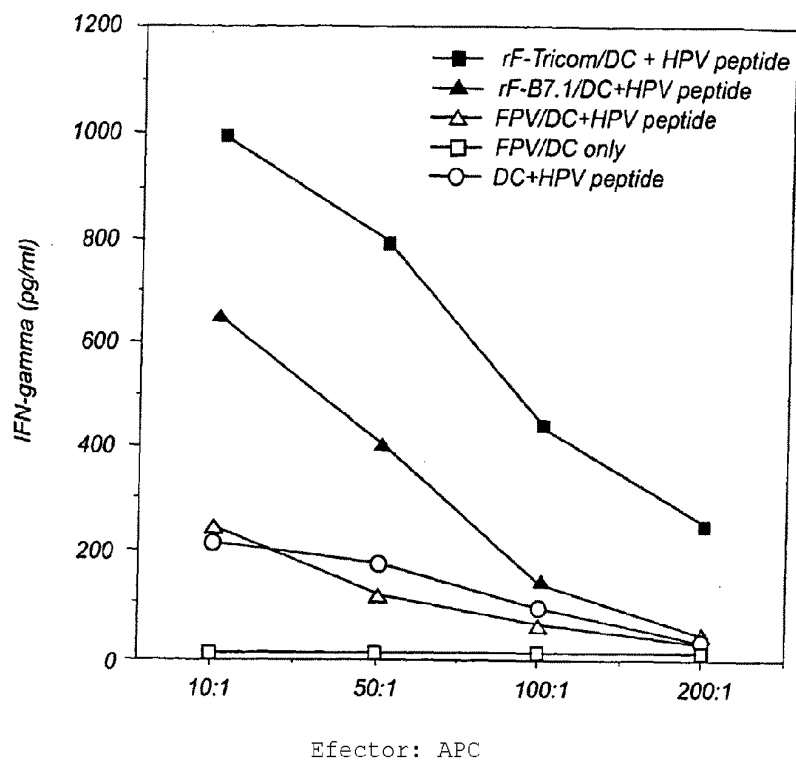


FIG 54

