

(11) Número de Publicação: **PT 1379273 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 39/39 (2007.10) **A61K 48/00** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2001.11.26	(73) Titular(es): POWDERJECT VACCINES, INC.
(30) Prioridade(s): 2000.11.27 US 724315	235 EAST 42ND STREET NEW YORK, NY 10017-5755 US
(43) Data de publicação do pedido: 2004.01.14	(72) Inventor(es):
(45) Data e BPI da concessão: 2009.09.16 231/2009	JOEL R. HAYNES US JOSHUA E. ARRINGTON US
	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ADJUVANTES À BASE DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

(57) Resumo:

RESUMO

"ADJUVANTES À BASE DE ÁCIDOS NUCLEICOS"

Descreve-se moléculas de ácidos nucleicos recombinantes. As moléculas têm duas sequências de ácidos nucleicos, em que a primeira sequência de ácidos nucleicos é uma região de codificação da subunidade A truncada obtida ou derivada de uma endotoxina bacteriana de ADP-ribosilação e a segunda sequência de ácidos nucleicos é uma região de codificação da subunidade B truncada. Descreve-se também vectores e composições contendo estas moléculas. Descreve-se também métodos para melhorar uma resposta imune contra um antigénio de interesse utilizando estas moléculas e composições de ácidos nucleicos recombinantes.

DESCRIÇÃO

"ADJUVANTES À BASE DE ÁCIDOS NUCLEICOS"

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção relaciona-se com os campos da biologia molecular e imunologia, e genericamente relaciona-se com técnicas de imunização com ácidos nucleicos. Mais especificamente, a invenção relaciona-se com polinucleótidos que codificam um adjuvante, e com estratégias de imunização que utilizam esses polinucleótidos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Foram descritas na arte técnicas para a injeção de ADN e ARNm em tecido de mamíferos para fins de imunização contra um produto de expressão. Demonstrou-se que as técnicas, aqui designadas "imunização com ácidos nucleicos", desencadeiam respostas imunes tanto humorais como mediadas por células. Por exemplo, demonstrou-se que soros de murganhos imunizados com uma construção de ADN que codifica a glicoproteína do envelope, gp160, reagem com gp160 recombinante em imunoensaios, e demonstrou-se que linfócitos dos murganhos injectados proliferam em resposta a gp120 recombinante. Wang *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4156-4160. Analogamente, murganhos imunizados com um gene da hormona do crescimento humana (hGH) demonstraram uma resposta imune baseada em anticorpos. Tang *et al.* (1992) *Nature* 356: 152-154. Demonstrou-se que a injeção intramuscular de ADN que codifica a nucleoproteína

da gripe activada por um promotor de mamífero desencadeia uma resposta de células T citotóxicas (CTL) CD8+ que pode proteger murganhos contra a estimulação letal subsequente com o vírus. Ulmer *et al.* (1993) *Science* 259: 1745-1749. Os estudos imuno-histoquímicos do sítio da injeção mostraram que o ADN foi absorvido pelos mieloblastos, e foi possível demonstrar a produção citoplasmática de proteína viral durante pelo menos 6 meses. A US 5980898 relaciona-se com imunização transcutânea.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Um objectivo principal da invenção é proporcionar uma composição adjuvante à base de polinucleótidos tal como definida nas reivindicações anexas.

A primeira e segunda sequências de ácidos nucleicos podem estar presentes na mesma ou em diferentes construções de ácidos nucleicos. As regiões de codificação da subunidade truncada podem ser obtidas ou derivadas da mesma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação e, em certas formas de realização preferidas, a exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação é uma toxina da cólera (CT, do inglês "cholera toxin") ou uma enterotoxina termolábil de *E. coli* (LT, do inglês, "labile enterotoxin"). Além disso, pelo menos uma das regiões de codificação da subunidade truncada pode ser geneticamente modificada para destoxificar o péptido da subunidade por ela codificado, por exemplo em que a região de codificação da subunidade A truncada foi modificada geneticamente para afectar negativamente ou inactivar a actividade da ADP-ribosil transferase no produto de expressão constituído pelo péptido da subunidade.

É também um objectivo principal da invenção proporcionar uma composição adjuvante à base de polinucleótidos contendo uma primeira e segunda sequências

de ácidos nucleicos, em que a primeira sequência de ácidos nucleicos é uma região de codificação da subunidade A modificada obtida ou derivada de uma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação, e a segunda sequência de ácidos nucleicos é uma região de codificação da subunidade B obtida ou derivada de uma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação. A região de codificação da subunidade A modificada e a referida região de codificação da subunidade B codificam cada uma delas uma subunidade peptídica madura, e a região de codificação da subunidade A modificada foi modificada geneticamente para resultar na deleção de um motivo KDEL ou RDEL C-terminal no péptido da subunidade por ela codificado.

Tal como acima, a primeira e segunda sequências de ácidos nucleicos podem estar presentes na mesma ou em diferentes construções de ácidos nucleicos. As regiões de codificação da subunidade truncada podem ser obtidas ou derivadas da mesma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação e, em certas formas de realização preferidas, a exotoxina bacteriana ribosilante de ADP é uma toxina da cólera (CT) ou uma enterotoxina termolábil de *E. coli* (LT). Além disso, pelo menos uma das regiões de codificação da subunidade truncada pode ser geneticamente modificada para destoxificar o péptido da subunidade por ela codificado, por exemplo em que a região de codificação da subunidade A truncada foi modificada geneticamente para alterar ou inactivar a actividade de ADP-ribosil transferase no produto de expressão do péptido da subunidade.

Em certos aspectos da invenção, as composições acima referidas podem ser proporcionadas em forma de partículas, por exemplo em que as composições são partículas adequadas para administração a partir de um dispositivo para administração de partículas. A este respeito, as presentes composições podem ser revestidas nas mesmas ou numa partícula transportadora diferente formando

um núcleo e por isso são adequadas para administração utilizando uma técnica de transfecção mediada por partículas. As partículas transportadoras que formam um núcleo preferidas vão ter um diâmetro médio de cerca de 0,1 a 10 μm , e podem compreender um metal tal como ouro. Consequentemente, é um objectivo adicional da invenção proporcionar um dispositivo de administração de partículas carregado com (por exemplo, contendo) uma composição em partículas tal como aqui definida.

É também um objectivo principal da invenção proporcionar a utilização de uma composição contendo uma primeira e segunda sequência de ácidos nucleicos, em que cada sequência inclui uma região de codificação para uma subunidade de uma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação no fabrico de um medicamento para melhorar uma resposta imune num indivíduo vertebrado contra um antigénio de interesse no referido indivíduo. O antigénio de interesse e a composição são administrados ao indivíduo as subunidades da toxina codificadas por uma primeira e segunda sequências de ácidos nucleicos são expressas numa quantidade suficiente para desencadear uma resposta imune melhorada contra o antigénio. A primeira sequência de ácidos nucleicos contém uma região de codificação da subunidade A truncada obtida ou derivada de uma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação, e a segunda sequência de ácidos nucleicos contém uma região de codificação da subunidade B truncada obtida ou derivada de uma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação, contudo com a condição de que cada uma das regiões de codificação da subunidade truncada tem uma deleção 5' e codifica um péptido da subunidade que não tem péptido de sinal bacteriano amino terminal.

Um objectivo principal relacionado da invenção é proporcionar um método para melhorar uma resposta imune contra um antigénio de interesse num indivíduo. O método genericamente envolve: (a) administrar o antigénio de

interesse ao indivíduo; (b) proporcionar uma composição adjuvante compreendendo primeira e segunda sequências de ácidos nucleicos, em que a primeira sequência de ácidos nucleicos é uma região de codificação da subunidade A truncada obtida ou derivada de uma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação, e a segunda sequência de ácidos nucleicos é uma região de codificação da subunidade B truncada obtida ou derivada de uma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação; e (c) administrar a composição adjuvante ao indivíduo, com o que por introdução no indivíduo, a primeira e segunda sequências de ácidos nucleicos são expressas para proporcionar péptidos das subunidades numa quantidade suficiente para desencadear uma resposta imune melhorada contra o antigénio de interesse. As regiões de codificação da subunidade estão truncadas porque cada região de codificação tem uma deleção 5' e codifica um péptido da subunidade que não tem péptido de sinal bacteriano amino terminal.

Ainda outro objectivo principal da invenção é proporcionar a utilização de uma composição compreendendo uma primeira e segunda sequência de ácidos nucleicos, em que cada sequência inclui uma região de codificação para uma subunidade de uma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação no fabrico de um medicamento para melhorar uma resposta imune num indivíduo vertebrado contra um antigénio de interesse no referido indivíduo. O antigénio de interesse e a composição são administrados ao indivíduo de tal modo que as subunidades de toxina codificadas por uma primeira e segunda sequências de ácidos nucleicos são expressas numa quantidade suficiente para desencadear uma resposta imune melhorada contra o antigénio. A primeira sequência de ácidos nucleicos contém uma região de codificação da subunidade A modificada obtida ou derivada de uma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação, e a segunda sequência de ácidos nucleicos contém uma região de

codificação da subunidade B obtida ou derivada de uma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação, contudo com a condição de que a região de codificação da subunidade A modificada e a região de codificação da subunidade B codifica cada uma delas um péptido de subunidade matura, e com a condição adicional de que a região de codificação da subunidade A modificada foi modificada geneticamente para delecionar um motivo KDEL ou RDEL C-terminal no péptido da subunidade por ela codificada.

É um objectivo principal relacionado da invenção proporcionar um método para melhorar uma resposta imune contra um antigénio de interesse num indivíduo, em que o método envolve: (a) administrar o antigénio de interesse ao indivíduo; (b) proporcionar uma composição adjuvante compreendendo uma primeira e segunda sequências de ácidos nucleicos, em que a primeira sequência de ácidos nucleicos é uma região de codificação da subunidade A modificada obtida ou derivada de uma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação, e a segunda sequência de ácidos nucleicos é uma região de codificação da subunidade B obtida ou derivada de uma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação; e (c) administrar a composição adjuvante ao indivíduo, com o que, por introdução no indivíduo, a primeira e segunda sequências de ácidos nucleicos são expressas para proporcionar péptidos das subunidades numa quantidade suficiente para desencadear uma resposta imune melhorada contra o antigénio de interesse. As subunidades regiões de codificação das subunidades estão modificadas na medida em que cada uma codifica um péptido de subunidade matura, mas a região de codificação da subunidade A foi modificada geneticamente para delecionar um motivo KDEL ou RDEL C-terminal no péptido da subunidade por ela codificada.

Nas utilizações e métodos da invenção, a administração das composições adjuvantes envolve a transfecção de células do indivíduo com uma composição

adjuvante de polinucleótido de acordo com a presente invenção. Cassetes e/ou vectores de expressão contendo as moléculas de ácidos nucleicos da presente invenção podem ser utilizadas para transfectar as células, e a transfecção é realizada em condições que permitem a expressão dos péptidos das subunidades no seio do indivíduo. O método pode abranger ainda um ou mais passos de administração ao indivíduo de pelo menos uma composição secundária.

O procedimento de transfecção realizado durante a imunização pode ser efectuado *in vivo* ou *ex vivo* (por exemplo, para obtenção de células transfectadas que são subsequentemente introduzidas no indivíduo antes da realização de um passo de imunização secundária). Quando se utilize a transfecção *in vivo*, as moléculas de ácidos nucleicos podem ser administradas ao indivíduo por meio de injeção intramuscular ou intradérmica de ADN do plasmídeo ou, de preferência, administradas ao indivíduo utilizando uma técnica de administração mediada por partículas. As composições de vacinas (contendo o antigénio de interesse) podem ser proporcionadas na forma de qualquer composição de vacina adequada, por exemplo, na forma de uma composição de subunidades de péptidos, na forma de uma composição de vacina de ácidos nucleicos ou na forma de uma composição de vacina de vírus da gripe completo ou fraccionado.

Em certos métodos, o antigénio de interesse e a composição adjuvante são administrados ao mesmo sítio no indivíduo. Por exemplo, a composição adjuvante e o antigénio de interesse podem ser administrados simultaneamente (por exemplo, proporcionados numa única composição de vacina). Em certas formas de realização preferidas, o adjuvante e, opcionalmente o antigénio de interesse, é administrado em forma de partículas, por exemplo em que a composição adjuvante foi revestida numa partícula transportadora que forma um núcleo e é administrada ao indivíduo utilizando uma técnica de

administração mediada por partículas.

Nestes métodos, a administração das composições adjuvantes de polinucleótido da presente invenção de preferência resulta numa resposta imune celular aumentada contra o antígeno de interesse co-administrado. Essa resposta imune melhorada pode ser genericamente caracterizada por títulos aumentados de linfócitos T CD4+ e/ou CD8+ produtores de interferões, actividade de linfócitos T citotóxicos (CTL) específicos para o antígeno, e uma resposta imune semelhante a células auxiliares T de tipo 1 (Th1) contra o antígeno de interesse (caracterizada por títulos aumentados de anticorpo específico do antígeno das subclasses tipicamente associadas à imunidade celular (por exemplo, IgG2a), normalmente com uma redução concomitante de títulos de anticorpos das subclasses tipicamente associadas à imunidade humoral (por exemplo, IgG1)) em vez de uma resposta imune semelhante a células T auxiliares de tipo 1 (Th2) como a que é normalmente produzida quando se imuniza um indivíduo utilizando uma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação adjuvante tal como CT ou LT.

As vantagens da presente invenção incluem, mas não estão limitadas à aptidão das presentes composições adjuvantes para proporcionar um efeito adjuvante significativo e melhorar assim a imunogenicidade de um antígeno co-administrado num indivíduo imunizado, bem como a aptidão para favorecer uma resposta imune semelhante a Th1 contra o antígeno co-administrado que é vantajosa num produto de vacina.

Estes e outros objectivos, aspectos, formas de realização e vantagens da presente invenção irão prontamente ocorrer aos que têm experiência corrente da matéria com base na descrição aqui apresentada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é um mapa de restrição e um mapa funcional do plasmídeo pPJV2002 que contém uma sequência de codificação truncada para um péptido da subunidade A da toxina da cólera (CT) (CTA), em que o plasmídeo contém ainda o promotor do gene precoce imediato do citomegalovírus humano (hCMV) e a sequência do intrão A associado, e a sequência de codificação para o péptido do sinal do activador de plasminogénio de tecido humano para permitir a secreção de células de mamífero do produto de expressão de CTA truncado. A figura contém ainda a sequência de ácidos nucleicos completa (SEQ ID NO: 1) para o plasmídeo pPJV2002.

A Figura 2 é um mapa de restrição e mapa funcional do plasmídeo pPJV2003 que contém uma sequência de codificação truncada para um péptido da subunidade B da toxina da cólera (CT) (CTB), em que o plasmídeo contém ainda o promotor do gene precoce imediato do hCMV e a sequência do intrão A associado, e a sequência de codificação para o péptido do sinal do activador do plasminogénio de tecidos humano para permitir a secreção de células de mamífero do produto de expressão de CTB truncado. A figura contém ainda a sequência de ácidos nucleicos completa (SEQ ID NO: 2) para o plasmídeo pPJV2003.

A Figura 3 é um mapa de restrição e mapa funcional do plasmídeo pPJV2006 que contém uma sequência de codificação truncada para um péptido de CTA, em que a sequência de codificação de CTA truncada foi adicionalmente modificada para delecionar um motivo KDEL C-terminal no péptido da subunidade por ela codificada. O plasmídeo contém ainda o promotor do gene precoce imediato do hCMV e

a sequência de intrão A associado, e a sequência de codificação para o péptido do sinal de activador de plasminogénio de tecidos humano para permitir a secreção de células de mamífero do produto de expressão de CTA truncado. A figura contém ainda a sequência de ácidos nucleicos completa (SEQ ID NO: 3) para o plasmídeo pPJV2006.

A Figura 4 é um mapa de restrição e mapa funcional do plasmídeo pPJV2004 que contém uma sequência de codificação truncada de um péptido da subunidade A da enterotoxina termolábil de *E. coli* (LT) (LTA), em que o plasmídeo contém ainda o promotor do gene precoce imediato do hCMV e a sequência do intrão A associado, e a sequência de codificação para o péptido do sinal de activador de plasminogénio dos tecidos humano para permitir a secreção de células de mamífero do produto de expressão de LTA truncado. A figura contém ainda a sequência de ácidos nucleicos completa (SEQ ID NO: 4) para o plasmídeo pPJV2004.

A Figura 5 é um mapa de restrição e mapa funcional do plasmídeo pPJV2005 que contém uma sequência de codificação truncada para um péptido da subunidade B de LT (LTB), em que o plasmídeo contém ainda o promotor do gene precoce imediato do hCMV e a sequência de intrão A associado, e a sequência de codificação para o péptido do sinal do activador de plasminogénio dos tecidos humano para permitir a secreção de células de mamífero do produto de expressão de LTB truncado. A Figura contém ainda a sequência de ácidos nucleicos completa (SEQ ID NO: 5) para o plasmídeo pPJV2005.

A Figura 6 é um mapa de restrição e mapa funcional do plasmídeo pPJV2007 que contém uma sequência de

codificação truncada para um péptido de LTA, em que a sequência de codificação de LTA truncada foi adicionalmente modificada para delecionar um motivo RDEL C-terminal no péptido da subunidade por ela codificada. O plasmídeo contém ainda o promotor do gene precoce imediato do hCMV e a sequência do intrão A associado, e a sequência de codificação para o péptido do sinal de activador de plasminogénio dos tecidos humano para permitir a secreção de células de mamífero do produto de expressão de LTA truncado. A figura contém ainda a sequência de ácidos nucleicos completa (SEQ ID NO: 6) para o plasmídeo pPJV2007.

A Figura 7 mostra os resultados do ELISA realizado no Exemplo 5. O histograma representa a concentração recíproca logarítmica do anticorpo anti-gp120 presente nos animais que recebem, da esquerda para a direita na figura, Formulação #1 contendo o vector pWRG7054 vazio ("EmpVec"); Formulação #2 contendo o EmpVec (pWRG7054) e o plasmídeo pCIA-EnvT ("gp120"); Formulação #3 contendo o EmpVec (pWRG7054) combinado com os vectores adjuvantes pPJV2002 e pPJV2003 ("CTA/B"); Formulação #4 contendo o plasmídeo pCIA-EnvT ("gp120") combinado com os vectores adjuvantes pPJV2002 e pPJV2003 ("CTA/B"); Formulação #5 contendo o plasmídeo pCIA-EnvT ("gp120") combinado com os vectores adjuvantes pPJV2006 e pPJV2003 ("CTAKDEL/B"); ou nenhuma composição de vacina e/ou adjuvante ("natural").

A Figura 8 mostra os resultados do ELISA *in situ* realizado no Exemplo 5. O histograma representa o nível relativo da produção de IFN- γ específica para gp120 nos esplenócitos obtidos de animais que recebem, da esquerda para a direita na figura, Formulação #1 contendo o vector pWRG7054 vazio ("EmpVec"); Formulação #2 contendo o EmpVec (pWRG7054) e o plasmídeo pCIA-EnvT ("gp120"); Formulação #3

contendo o EmpVec (pWRG7054) combinado com os vectores adjuvantes pPJV2002 e pPJV2003 ("CTA/B"); Formulação #4 contendo o plasmídeo pCIA-EnvT ("gp120") combinado com os vectores adjuvantes pPJV2002 e pPJV2003 ("CTA/B"); ou Formulação #5 contendo o plasmídeo pCIA-EnvT ("gp120") combinado com os vectores adjuvantes pPJV2006 e pPJV2003 ("CTA-KDEL/B").

A Figura 9 ilustra os resultados do ensaio ELISPOT realizado no Exemplo 5. O histograma representa os níveis relativos de esplenócitos produtores de IFN- γ obtidos de animais que recebem, da esquerda para a direita na figura, Formulação #1 contendo o vector pWRG7054 vazio ("EmpVec"); Formulação #2 contendo o EmpVec (pWRG7054) e o plasmídeo pCIA-EnvT ("gp120"); Formulação #3 contendo o EmpVec (pWRG7054) combinado com os vectores adjuvantes pPJV2002 e pPJV2003 ("CTA/B"); Formulação #4 contendo o plasmídeo pCIA-EnvT ("gp120") combinado com os vectores adjuvantes pPJV2002 e pPJV2003 ("CTA/B"); ou Formulação #5 contendo o plasmídeo pCIA-EnvT ("gp120") combinado com os vectores adjuvantes pPJV2006 e pPJV2003 ("CTA-KDEL/B").

A Figura 10 mostra os resultados do ELISA realizado no Exemplo 6. Nesta figura, os valores da média geométrica da absorvência representam a concentração do anticorpo anti-HBcAg presente em amostras de soro (a quatro diluições diferentes) colhido na imunização de reforço (semana 6 do estudo) de animais que recebem ou Formulação #1 contendo o plasmídeo do vector HBcAg/HBsAg (pWRG7193); ou Formulação #2 contendo o plasmídeo do vector HBcAg/HBsAg (pWRG7193) combinado com os vectores adjuvantes pPJV2002 e pPJV2003 ("CTA/B").

A Figura 11 mostra os resultados do ELISA realizado no Exemplo 6. Nesta figura, os valores da média geométrica

da absorvência representam a concentração de anticorpo anti HBcAg presente em amostras de soro (a quatro diluições diferentes) colhidas 2 semanas após a imunização de reforço (semana 8 do estudo) de animais que recebem ou Formulação #1 contendo o plasmídeo do vector HBcAg/HBsAg (pWRG7193); ou Formulação #2 contendo o plasmídeo do vector HBcAg/HBsAg (pWRG7193) combinado com os vectores adjuvantes pPJV2002 e pPJV2003 ("CTA/B").

A Figura 12 mostra os resultados do ELISA realizado no Exemplo 7. O histograma representa as razões log IgG1::IgG2a logarítmicas de cada grupo de imunização que recebe, da esquerda para a direita na figura, Formulação #1 contendo o plasmídeo pM2-FL ("M2") combinado com o controlo do plasmídeo do vector vazio (pWRG7054); Formulação #2 contendo o plasmídeo pM2-FL combinado com os vectores adjuvantes CTA/B de pPJV2002 e pPJV2003 ("M2 + CT"); ou Formulação #7 contendo o plasmídeo pM2-FL combinado com os vectores adjuvantes LTA/B pPJV2004 e pPJV2005 ("M2 + LT").

As Figuras 13A-13D mostram os resultados dos ensaios ELISPOT de IFN- γ e IL4 utilizados para avaliar a resposta imune à superfície do vírus da Hepatite B e antígenos do núcleo num primeiro estudo do Exemplo 8. Os histogramas representam o número de manchas por 1×10^5 células de baço dos vários grupos experimentais.

A Figura 14 mostra os resultados de sobrevivência do estudo de estimulação com vírus HSV-2 realizado no Exemplo 9.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

Antes de descrever a presente invenção em pormenor,

entender-se-á que esta invenção não está limitada às moléculas especificamente exemplificadas ou aos parâmetros de processo que podem, é claro, variar. Entender-se-á também que a terminologia aqui utilizada é apenas para efeitos da descrição de formas de realização específicas da invenção, e não tem intenção de ser limitativa. Além disso, a prática da presente invenção vai utilizar, salvo indicação em contrário, métodos convencionais de virologia, microbiologia, biologia molecular, técnicas de ADN recombinante e imunologia, de que todos estão dentro do conhecimento corrente na arte. Essas técnicas estão plenamente explicadas na literatura. Ver, por exemplo, Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *ADN Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); e *Fundamental Virology*, 2nd Edition, vol. I & II (B. N. Fields e D. M. Knipe, eds.).

Deve notar-se que, tal como utilizadas nesta especificação e reivindicações anexas, as formas no singular "um", "uma" e "o, a" incluem referentes plurais salvo se o teor claramente determinar o contrário.

Definições

Salvo outra definição, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que o vulgarmente entendido por uma pessoa com conhecimentos correntes da matéria à qual respeita a invenção. Embora vários métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos aqui descritos possam ser utilizados na prática da presente invenção, os materiais e métodos preferidos estão aqui descritos.

Na descrição da presente invenção, serão utilizados os termos seguintes, e pretendem ser definidos tal como

indicado adiante.

O termo "adjuvante" pretende significar material ou composição capaz de especificamente ou não especificamente alterar, aumentar, direccionar, redireccionar, potenciar ou iniciar uma resposta imune específica para o antigénio. Assim, a co-administração de um adjuvante com um antigénio pode resultar em que seja necessária uma dose mais baixa ou menos doses de antigénio para se obter uma resposta imune desejada no indivíduo ao qual o antigénio é administrado, ou a co-administração pode resultar numa resposta imune qualitativamente e/ou quantitativamente diferente no indivíduo. A eficácia de um adjuvante pode ser determinada pela administração do adjuvante com uma composição de vacina em paralelo com uma composição de vacina só a animais e comparando a imunidade mediada por anticorpos e/ou celular nos dois grupos utilizando ensaios normalizados tais como radioimunoensaio, ELISA, ensaios CTL e outros semelhantes, todos bem conhecidos na arte. Tipicamente, numa composição de vacina, o adjuvante é uma unidade separada do antigénio, embora uma única molécula possa ter propriedades adjuvantes e antigénicas.

Uma "composição adjuvante" pretende significar qualquer composição farmacêutica contendo um adjuvante. As composições adjuvantes podem ser administradas nos métodos da invenção enquanto em qualquer forma farmacêutica adequada, por exemplo, como um líquido, pó, creme, loção, emulsão, gel ou outro semelhante. Contudo, as composições adjuvantes preferidas vão estar na forma de partículas. Pretende-se, embora não esteja sempre afirmado explicitamente, que as moléculas tenham actividade biológica semelhante ao péptido de tipo selvagem ou purificado ou adjuvantes químicos.

O termo "péptido" é utilizado no seu sentido mais lato para referir um composto de duas ou mais subunidades

de aminoácidos, análogos de aminoácidos, ou outros peptidomiméticos. As subunidades podem estar ligadas por ligações peptídicas ou por outras ligações, por exemplo éster, éter, etc. Tal como aqui utilizado, o termo "aminoácido" refere-se a aminoácidos naturais e/ou não naturais ou sintéticos, incluindo glicina e ambos os isómeros ópticos D ou L, e análogos de aminoácidos e peptidomiméticos. Um péptido de três ou mais aminoácidos é vulgarmente chamado um "oligopéptido" se a cadeia peptídica for curta. Se a cadeia peptídica for longa, o péptido é tipicamente referido como um "polipéptido" ou uma "proteína".

Um "antigénio" refere-se a qualquer agente, genericamente uma macromolécula, que pode desencadear uma resposta imunológica num indivíduo. O termo pode ser utilizado para referir a uma macromolécula indivíduo ou uma população homogénea ou heterogénea de macromoléculas antigénicas. Tal como aqui utilizado, "antigénio" é genericamente usado para fazer referência a uma molécula de péptido ou hidrato de carbono que contém um ou mais epitopos. Para efeitos da presente invenção, os antigénios podem ser obtidos ou derivados de uma qualquer fonte apropriada. Além disso, para efeitos da presente invenção, um "antigénio" inclui um péptido que tem modificações, tais como deleções, adições e substituições (genericamente conservadoras quanto à natureza) em relação à sequência nativa, desde que o péptido mantenha imunogenicidade suficiente. Estas modificações podem ser deliberadas, por exemplo através de mutagénese dirigida ao sítio, ou podem ser acidentais, tais como através de mutações de hospedeiros que produzem os antigénios.

Uma "resposta imune" contra um antigénio de interesse é o desenvolvimento num indivíduo de uma resposta imune humoral e/ou celular a esse antigénio. Para efeitos da presente invenção, uma "resposta imune humoral" refere-

se a uma resposta imune mediada por moléculas de anticorpo, enquanto uma "resposta imune celular" é uma mediada por linfócitos T e/ou outros leucócitos.

O termo "imunização com ácidos nucleicos" é aqui utilizado para referir a introdução de uma molécula de ácido nucleico que codifica um ou mais antigénios seleccionados numa célula hospedeira para a expressão *in vivo* do antigénio ou antigénios. O termo também abrange a introdução de uma molécula de ácido nucleico que codifica um ou mais adjuvantes seleccionados numa células hospedeira para a expressão *in vivo* do adjuvante ou adjuvantes. A molécula de ácido nucleico pode ser introduzida directamente no indivíduo receptor, tal como por injeção intramuscular ou intradérmica corrente; administração de partículas transdérmica; inalação; topicamente, ou pelas vias de administração oral, intranasal ou mucosal. A molécula alternativamente pode ser introduzida *ex vivo* em células que foram retiradas de um indivíduo. Neste último caso, células contendo a molécula de ácido nucleico de interesse são reintroduzidas no indivíduo de modo que possa ser montada uma resposta imune contra o antigénio codificado pela molécula de ácido nucleico, ou de tal modo que o adjuvante codificado pela molécula de ácido nucleico possa exercer o seu efeito adjuvante.

Os termos "molécula de ácido nucleico" e "polinucleótido" são aqui utilizados intercambiavelmente e referem-se a uma forma polimérica de nucleótidos de qualquer comprimento, quer desoxirribonucleótidos ou ribonucleótidos, ou os seus análogos. Os polinucleótidos podem ter qualquer estrutura tridimensional, e podem desempenhar qualquer função, conhecida ou desconhecida. Os exemplos não limitativos de polinucleótidos incluem um gene, um fragmento de gene, exões, intrões, ARN mensageiro (ARNm), ARN de transferência, ARN ribossómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos

ramificados, plasmídeos, vectores, ADN isolado de qualquer sequência, ARN isolado de qualquer sequência, sondas de ácidos nucleicos e iniciadores.

Um polinucleótido é tipicamente constituído por uma sequência específica de quatro bases nucleotídicas: adenina (A); citosina (C); guanina (G); e timina (T) (uracilo (U) por timina (T) quando o polinucleótido é ARN). Assim, o termo sequência de ácidos nucleicos é a representação alfabética de uma molécula de polinucleótido. Esta representação alfabética pode ser introduzida em bases de dados de um computador que tem uma unidade de processamento central e utilizada para aplicações de bioinformática tais como a pesquisa de genómica funcional e homologia.

Um "vector" é capaz de transferir sequências de ácido nucleico para células alvo (por exemplo, vectores virais, vectores não virais, veículos em partículas e lipossomas). Tipicamente, "construção de vector", "vector de expressão" e "vector de transferência do gene" significam qualquer construção de ácido nucleico capaz de direccionar a expressão de um gene de interesse e que pode transferir sequências do gene para células alvo. Assim, o termo inclui veículos de clonagem e expressão, bem como vectores virais. Um "plasmídeo" é um vector na forma de um elemento genético extracromossómico.

Uma sequência de ácidos nucleicos que "codifica" um adjuvante e/ou antígeno seleccionado é uma molécula de ácido nucleico que é transcrita (no caso de ADN) e traduzida (no caso de ARNm) num polipéptido *in vivo* quando colocado sob o controlo de sequências reguladoras apropriadas. As fronteiras da sequência de codificação são determinadas por um codão de iniciação no terminal 5' (amino) e um codão de terminação da tradução no terminal 3' (carboxilo). Para efeitos da invenção, essas sequências de ácidos nucleicos podem incluir, mas não estão limitadas a, ADNc de ARNm viral, procariota ou eucariota, sequências

genómicas de ADN ou ARN viral ou procariota, e até sequências de ADN sintéticas. Uma sequência de terminação da transcrição pode estar localizada 3' em relação à sequência de codificação.

Um "promotor" é uma sequência de nucleótidos que inicia e regula a transcrição de um polinucleótido que codifica um polipéptido. Os promotores podem incluir promotores indutíveis (em que a expressão de uma sequência de polinucleótido ligada operativamente ao promotor é induzida por um analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), promotores repressíveis (em que a expressão de uma sequência de polinucleótido ligada operativamente ao promotor está reprimida por um analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), e promotores constitutivos. Pretende-se que o termo "promotor" ou "elemento de controlo" inclua as regiões promotoras de comprimento total e segmentos funcionais (por exemplo, controla a transcrição ou tradução) destas regiões.

"Ligado operativamente" refere-se a uma disposição de elementos em que os componentes assim descritos estão configurados para efectuar a sua função usual. Assim, um dado promotor ligado operativamente a uma sequência de ácidos nucleicos é capaz de efectuar a expressão dessa sequência quando as enzimas apropriadas estão presentes. O promotor não precisa de estar contíguo à sequência, desde que funcione para dirigir a sua expressão. Por conseguinte, por exemplo, sequências transcritas mas não traduzidas interpostas podem estar presentes entre a sequência promotora e a sequência de ácidos nucleicos e a sequência promotora pode ainda ser considerada "ligada operativamente" à sequência de codificação.

"Recombinante" é aqui utilizado para descrever uma molécula de ácido nucleico (polinucleótido) de origem genómica, de ADNc, semissintética, ou sintética, que, em virtude da sua origem ou manipulação, não está associada à

totalidade ou a uma porção do polinucleótido ao qual está associada na natureza e/ou está ligada a um polinucleótido diferente daquele ao qual está ligada na natureza. Duas sequências de ácidos nucleicos que estão contidas dentro de uma única molécula de ácido nucleico recombinante são "heterólogas" relativamente uma à outra quando não estão normalmente associadas uma à outra na natureza.

Um "polinucleótido isolado" é uma molécula de ácido nucleico separada e discreta do organismo completo no qual a molécula é encontrada na natureza; ou uma molécula de ácido nucleico desprovida, na totalidade ou em parte, das sequências normalmente a ela associadas na natureza; ou uma sequência, tal como existe na natureza, mas que tem sequências heterólogas (como definidas a seguir) em associação com ela. A sequência é "derivada de ou obtida a partir de" uma molécula se tiver a mesma ou substancialmente a mesma sequência de pares de bases que uma região da molécula fonte, o seu ADNc, os seus complementos, ou se apresentar identidade de sequência como descrito adiante.

As técnicas para determinar a "identidade de sequências" ou "homologia de sequências" de ácidos nucleicos e aminoácidos também são conhecidas na arte. Tipicamente, essas técnicas incluem a determinação da sequência dos nucleótidos do ARNm para um gene e/ou a determinação da sequência de aminoácidos por ele codificada, e a comparação destas sequências com uma segunda sequência de nucleótidos ou aminoácidos. Em geral, "identidade" refere-se a uma correspondência exacta nucleótido-a-nucleótido ou aminoácido-a-aminoácido de duas sequências de polinucleótidos ou polipéptidos, respectivamente. Duas ou mais sequências (de polinucleótido ou de aminoácidos) podem ser comparadas por determinação da sua "identidade percentual". A identidade percentual de duas sequências, sejam sequências de ácidos nucleicos ou de

aminoácidos, é o número de emparelhamentos exactos entre duas sequências alinhadas dividido pelo comprimento das sequências mais curtas e multiplicado por 100. Um alinhamento aproximado para sequências de ácidos nucleicos é proporcionado pelo algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981). Este algoritmo pode ser aplicado à sequência de aminoácidos por utilização da matriz de avaliação desenvolvida por Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M. O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C., EUA, e normalizada por Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14(6): 6745-6763 (1986). Uma implementação exemplificativa deste algoritmo para determinar a identidade percentual de uma sequência é proporcionada pelo Genetics Computer Group (Madison, WI) na aplicação utilitária "BestFit". Os parâmetros implícitos para este método estão descritos no *Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual*, Version 8 (1995) (disponível de Genetics Computer Group, Madison, WI). Um método preferido para estabelecimento da identidade percentual no contexto da presente invenção é utilizar o pacote MPSRCH de programas com direitos de autor da Universidade de Edimburgo, desenvolvido por John F. Collins e Shane S. Sturrok, e distribuído por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). A partir desta série de pacotes pode ser utilizado o algoritmo de Smith-Waterman em que os parâmetros por defeito são utilizados para a tabela de avaliação (*scores*) (por exemplo, penalização de abertura de intervalo (*gap open penalty*) 12, penalização por extensão do intervalo (*gap extension penalty*) um, e um intervalo (*gap*) de seis). A partir dos dados gerados o valor da "Emparelhamento" ("*Match*") reflecte a "identidade da sequência". Outros programas adequados para calcular a identidade percentual ou semelhança entre sequências são genericamente conhecidos na arte, por exemplo, outro

programa de alinhamento é o BLAST, utilizado com parâmetros implícitos. Por exemplo, BLASTN e BLASTP podem ser usados utilizando os seguintes parâmetros implícitos: código genético = padrão; filtro = nenhum; cadeia = ambas; corte = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descrições = 50 sequências; classificar por = HIGH SCORE; Bases de dados = não redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traduções GenBank CDS + Swiss protein + Spupdate + PIR. Pormenores destes programas podem ser encontrados na seguinte morada da Internet: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

Alternativamente, a homologia pode ser determinada por hibridação de polinucleótidos em condições que foram duplexes estáveis entre regiões homólogas, seguida por digestão com nuclease(s) específicas de cadeia simples, e determinação do tamanho dos fragmentos digeridos. Duas sequências de ADN ou de polipéptidos são "substancialmente homólogas" entre si quando as sequências apresentam pelo menos cerca de 80%-85%, de preferência pelo menos cerca de 90%, e mais preferencialmente pelo menos cerca de 95%-98% de identidade das sequências num comprimento definido das moléculas, determinada utilizando os métodos referidos acima. Tal como aqui utilizado, substancialmente homólogo também se refere a sequências que apresentam identidade completa com a sequência de ADN ou de polipéptido especificada. As sequências de ADN que são substancialmente homólogas podem ser identificadas numa experiência de hibridação de Southern, por exemplo, condições estritas, como definido para esse sistema específico. Por exemplo, condições de hibridação estritas podem incluir formamida a 50%, 5x solução de Denhardt, 5x SSC, SDS a 0,1% e 100 g/mL de ADN de esperma de salmão desnaturado e as condições de lavagem podem incluir 2x SSC, SDS a 0,1% a 37 °C seguido por 1x SSC, SDS a 0,1% a 68 °C. A definição de condições hibridação apropriadas está dentro da experiência na arte. Ver, por exemplo, Sambrook et al., *supra*; *ADN Cloning*,

supra; *Nucleic Acid Hybridization*, *supra*.

O termo administração "transdérmica" significa administração intradérmica (por exemplo, na derme ou epiderme), transdérmica (por exemplo, "percutânea") e transmucosa, isto é, administração por passagem de um agente para a ou através da pele ou tecido mucoso. Ver, por exemplo, *Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives*, Hadgraft e Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989); *Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications*, Robinson e Lee (eds.), Marcel Dekker Inc., (1987); e *Transdermal Delivery of Drugs*, Vols. 1-3, Kydonieus e Berner (eds.), CRC Press, (1987). Assim, o termo abrange a administração de um agente utilizando um dispositivo de administração de partículas (por exemplo, uma seringa sem agulha) como os descritos na patente U.S. Nº 5630796, bem como a administração utilizando dispositivos de administração mediada por partículas como os descritos na patente U.S. Nº 5865796.

Por "partícula transportadora que forma um núcleo" significa-se um elemento transportador no qual é revestido um ácido nucleico hóspede (por exemplo, ADN, ARN) para conferir um tamanho de partícula definido bem como uma densidade suficientemente elevada para atingir o momento necessário para penetração na membrana celular, tal que a molécula hóspede possa ser administrada utilizando técnicas mediadas por partículas (ver, por exemplo, patente U.S. Nº 5100792). As partículas transportadoras que formam um núcleo tipicamente incluem materiais tais como tungstênio, ouro, platina, ferrite, poliestireno e látex. Ver por exemplo, *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer*, (1994) Yang, N. ed., Oxford University Press, New York, NY, páginas 10-11.

Por "dispositivo de administração de partículas" significa-se um instrumento que administra uma composição em partículas transdermicamente sem a ajuda de uma agulha

convencional para perfurar a pele. Os dispositivos de administração de partículas para utilização com a presente invenção são discutidos ao longo deste documento.

Tal como aqui utilizado, o termo "tratamento" inclui qualquer dos seguintes: a prevenção de infecção ou reinfeção; a redução ou eliminação de sintomas; e a redução ou eliminação completa de um agente patogénico. O tratamento pode ser efectuado profilacticamente (antes da infecção) ou terapeuticamente (depois da infecção).

Os termos "indivíduo" e "sujeito" são aqui utilizados intercambiavelmente para referir qualquer membro do subfilo dos cordados, incluindo, sem limitação, seres humanos e outros primatas, incluindo primatas não humanos tais como chimpanzés e outras espécies de símios e macacos; animais de exploração tais como gado bovino, ovelhas, porcos, cabras e cavalos; animais domésticos tais como cães e gatos; animais de laboratório incluindo roedores como murganhos, ratos e cobaios; aves, incluindo aves domésticas, selvagens e de caça tais como frangos, perús e outros galináceos, patos, gansos e outros semelhantes. Os termos não indicam uma idade específica. Assim, pretende-se que estejam abrangidos tanto indivíduos adultos como recém-nascidos. Os métodos aqui descritos destinam-se a utilização em qualquer das espécies de vertebrados acima referidas, uma vez que os sistemas imunes de todos esses vertebrados funcionam de modo semelhante.

Súmula geral

Antes da descrição da presente invenção em pormenor, deve entender-se que esta invenção não está limitada a formulações ou parâmetros de processo específicos dado que podem, é claro, variar. Deve-se também entender que a terminologia aqui utilizada é para efeitos da descrição de formas de realização específicas da

invenção, e não pretende ser limitativa.

A presente invenção proporciona novas composições contendo sequências de ácidos nucleicos, em que a primeira sequência da composição é uma sequência de codificação de uma subunidade A obtida ou derivada de uma toxina bacteriana de ADP-ribosilação, e a segunda sequência da composição é uma sequência de codificação de uma subunidade B obtida ou derivada de uma toxina bacteriana de ADP-ribosilação. A primeira e segunda sequências são úteis em métodos de imunização em que são administradas a um indivíduo para proporcionar um efeito adjuvante (contra um antigénio de interesse co-administrado) no indivíduo imunizado. As toxinas bacterianas de ADP-ribosilação são uma família de exotoxinas bacterianas aparentadas e incluem a toxina da difteria (DT), toxina pertussis (PT), toxina da cólera (CT), as toxinas termolábeis de *E. coli* (LT1 e LT2), endotoxina A de *Pseudomonas*, exotoxina S de *Pseudomonas*, exoenzima de *B. cereus*, toxina de *B. sphaericus*, toxinas C2 e C3 de *C. botulinum*, exoenzima de *C. limosum*, bem como as toxinas de *C. perfringens*, *C. spiriforma* e *C. difficile*, *Staphylococcus aureus* EDIN, e mutantes da toxina bacteriana de ADP-ribosilação tais como CRM₁₉₇, um mutante da toxina da difteria não tóxico (ver, por exemplo, Bixler et al. (1989) *Adv. Exp. Med. Biol.* 251: 175; e Constantino et al. (1992) *Vaccine*). A maioria das toxinas bacterianas de ADP-ribosilação estão organizadas como um multímero A:B, em que a subunidade A contém a actividade de ADP-ribosiltransferase, e a subunidade B actua como a unidade de ligação. As toxinas bacterianas de ADP-ribosilação preferidas para utilização nas composições da presente invenção incluem a toxina da cólera e as toxinas termolábeis de *E. coli*.

A tóxina da cólera (CT) e as enterotoxinas lábeis (LT) de *E. coli* são produtos da secreção das suas respectivas estirpes bacterianas enterotóxicas que são imunogénios

potentes e apresentam forte toxicidade quando administradas sistematicamente, oralmente ou por via mucosa. Sabe-se que a CT e a LT proporcionam efeitos adjuvantes para o antigénio quando administradas pelas vias intramuscular ou oral. Estes efeitos adjuvantes foram observados a doses abaixo da necessária para toxicidade. As duas toxinas são moléculas extremamente semelhantes, e são pelo menos cerca de 70-80% homólogas ao nível dos aminoácidos.

As toxinas CT e LT são hexâmeros, constituídas por uma única molécula de uma subunidade A rodeada por um anel em forma de donute composto por 5 moléculas da subunidade B. A subunidade A possui uma actividade de ADP-ribosilase que resulta em modificações da proteína G que levam a regulação positiva da cAMP e proteína quinase A após internalização da subunidade A numa célula de mamífero. A subunidade A pode ser cortada por proteases exógenas dando os fragmentos A1 e A2 ligados por uma única ponte dissulfureto. A subunidade A da CT contém um motivo peptídico KDEL no terminal C (RDEL para a subunidade A de LT) que está associado à recuperação de proteínas da rede trans-Golgi para o ER. Isto é provavelmente importante para o transporte do fragmento A ao compartimento celular correcto para toxicidade após a internalização, e retenção da toxina dentro desse compartimento celular. A subunidade A1 entra no citoplasma da célula e desencadeia o efluxo de Cl ao catalisar a ADP-ribosilação de uma proteína G, que activa a adenilato ciclase conduzindo a níveis elevados de cAMP. O cAMP elevado faz com que a proteína quinase A fosforile e abra o canal de cloreto regulador da condutância transmembranar da fibrose cística.

O papel principal do fragmento A2 é na interacção com a subunidade B. A internalização da toxina é mediada pelas cinco cópias da subunidade B que têm actividade de ligação ao gangliósido GM1, um glicosfingolípido encontrado ubiquamente na superfície das células de

mamífero.

A importância relativa das subunidades A e B para a adjuvantividade é controversa. Há especulação no campo que a actividade tóxica da subunidade A pode modular os efeitos adjuvantes associados à subunidade B. Alguns estudos demonstram que mutações na subunidade A suprimem a actividade adjuvante enquanto que outros mostram que as mutações da subunidade A bloqueiam a actividade de ADP-ribosilase não têm efeito na adjuvantividade. Outros relatórios mostram níveis variáveis de efeitos adjuvantes para as subunidades B purificadas ou preparações de subunidades B recombinantes. É provável que as subunidades A e B tenham funções separadas que contribuem independentemente para a adjuvantividade. Estas funções são actividade de ADP-ribosilase e actividade activação de receptores, respectivamente. No que se refere à subunidade da LT em particular, a ligação ao receptor GM1 em células B resulta em activação policlonal, ocorre na ausência de proliferação significativa e envolve a regulação positiva de várias moléculas importantes tais como MHC da classe II, B7, CD40, ICAM-1 e IL2-R α . Para células T, a adição de holotoxinas de CT ou LT ou subunidades B recombinantes a células T estimuladas com concanavilina A resulta numa redução da incorporação de timidina. Não foram descritos efeitos destas moléculas em macrófagos e células dendríticas. Em culturas de PBMC, EtxB estimula um nível elevado de TNF- α e produção de IL-10 mas não de IL-12. Isto é consistente com as observações de respostas predominantemente semelhantes a Th2 associadas à utilização das formas CT e LT como adjuvantes.

É portanto uma característica surpreendente da presente invenção que a administração das presentes composições adjuvantes de polinucleótidos produzam de preferência uma resposta imune semelhante a Th1 aumentada contra o antigénio de interesse co-administrado, em vez da

resposta semelhante a Th2 que seria esperada a partir da utilização de uma composição adjuvante de exotoxina de ADP-ribosilação.

Sequências de codificação de subunidades de exotoxina de ADP-ribosilação

Numa forma de realização, é proporcionada uma composição que inclui uma ou mais moléculas de ácidos nucleicos recombinantes, contendo as referidas uma ou mais moléculas uma primeira e segunda sequências de ácidos nucleicos em que (a) a primeira sequência de ácidos nucleicos é uma região de codificação de um péptido da subunidade A truncada obtida ou derivada de uma exotoxina de ADP-ribosilação, e (b) uma segunda sequência de ácidos nucleicos é uma região de codificação de um péptido da subunidade B truncada obtida ou derivada de uma exotoxina de ADP-ribosilação. As regiões de codificação proporcionam péptidos de subunidades "truncadas" na medida em que cada uma das referidas regiões de codificação das subunidades foi geneticamente alterada de modo a criar uma deleção 5', com o que o péptido das subunidades codificadas não tem um péptido do sinal bacteriano amino terminal.

Noutra forma de realização, é proporcionada uma composição que inclui uma ou mais moléculas de ácidos nucleicos recombinantes, contendo as referidas uma ou mais moléculas uma primeira e segunda sequências de ácidos nucleicos em que (a) a primeira sequência de ácidos nucleicos é uma região de codificação de um péptido da subunidade A, modificado, maturo, obtida ou derivada de uma exotoxina de ADP-ribosilação, e (b) a segunda sequência de ácidos nucleicos é uma região de codificação de um péptido da subunidade B madura obtida ou derivada de uma exotoxina de ADP-ribosilação. A primeira sequência de ácidos

nucleicos contém uma região de codificação que proporciona um péptido da subunidade A "modificado" na medida em que a referida região de codificação foi geneticamente alterada para deletar um KDEL ou RDEL C-terminal de quatro resíduos de aminoácidos normalmente encontrada no péptido da subunidade codificada.

Ainda noutra forma de realização, é proporcionada uma composição que inclui uma ou mais moléculas de ácidos nucleicos recombinantes, contendo as referidas uma ou mais moléculas uma primeira e segunda sequências de ácidos nucleicos em que (a) a primeira sequência de ácidos nucleicos é uma região de codificação de um péptido da subunidade A truncada e modificada, obtida ou derivada de uma exotoxina de ADP-ribosilação, e (b) a segunda sequência de ácidos nucleicos é uma região de codificação de um péptido da subunidade B truncado, obtida ou derivada de uma exotoxina de ADP-ribosilação.

Em formas de realização especialmente preferidas, as sequências de codificação da subunidade do péptido da exotoxina de ADP-ribosilação são obtidas ou derivadas de uma toxina da cólera (CT). Noutras formas de realização particularmente preferidas, as sequências de codificação da subunidade do péptido da exotoxina de ADP-ribosilação são obtidas ou derivadas de uma enterotoxina termolábil de *E. coli* (LT), por exemplo LT1 ou LT2.

Porções dos genomas de várias espécies bacterianas enterotóxicas, particularmente as porções que contêm as sequências de codificação de exotoxinas de ADP-ribosilação, são genericamente conhecidas e as suas sequências estão disponíveis ao público, por exemplo na World Wide Web, e/ou estão depositadas em repositórios tais como a base de dados GenBank. Por exemplo, uma entrada do GenBank para as sequências completas dos genes das subunidades A e B de CT pode ser encontrada no sítio VIBCTXABB (Nº de ordem D30053), enquanto que uma entrada do GenBank para as

sequências completas dos genes das subunidades A e B de LT pode ser encontrada no sítio AB0116677 (Nº de ordem AB011677). As variantes ou fragmentos activos destas sequências da toxina também podem ser utilizadas nas composições e métodos da presente invenção. Para uma discussão geral das exotoxinas de ADP-ribosilação, ver por exemplo, Krueger *et al.* (1995) *Clin. Microbiol. Rev.* 8:34-47. Além disso, em certos aspectos da invenção, uma ou ambas das regiões de codificação do péptido da subunidade da toxina podem ser adicionalmente modificadas geneticamente para destoxificar o ou os péptidos da subunidade por elas codificada. Por exemplo, os mutantes da toxina alterada geneticamente que têm uma actividade de ADP-ribosilação alterada, mutações do sítio de clivagem de tripsina, ou uma actividade de ligação alterada, já são conhecidos na arte. Ver, por exemplo, Burnette *et al.* (1994) "Recombinant microbiol ADP-ribosylating toxins of *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae*, and *Escherichia coli* enterotoxigenic: structure, function and toxoid vaccine development", em *Bioprocess Technology*, Burnette *et al.*, eds., páginas 185-203; Rappuoli *et al.* (1995) *Int. Archiv. Allergy Immunol.* 108:327-333; e Rappuoli *et al.* (1996) *Ad. Exp. Med. Biol.* 397:55-60. As sequências que codificam as subunidades da toxina seleccionada são tipicamente inseridas num vector apropriado (por exemplo, uma estrutura base de plasmídeo) utilizando técnicas conhecidas e como se descreve adiante nos Exemplos.

A sequência ou sequências que codificam os péptidos da subunidade de exotoxina de ADP-ribosilação podem ser obtidas e/ou preparadas utilizando métodos conhecidos. Por exemplo, podem ser obtidas preparações substancialmente puras utilizando ferramentas de biologia molecular correntes. Isto é, as sequências de polinucleótidos que codificam as subunidades da toxina descritas anteriormente podem ser obtidas utilizando métodos recombinantes, tais

como bancos de ADNc de separação por exclusão que exprimem as subunidades de toxina, ou derivando a sequência de codificação das subunidades de toxina a partir de um vector conhecido que as inclui. As sequências de codificação das subunidades de toxina de várias estirpes bacterianas estão depositadas na American Type Culture Collection ATCC, e outras ainda estão disponíveis em organizações nacionais e internacionais de saúde tais como Centers of Disease Control (Atlanta, GA). Ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, *supra*, para uma descrição das técnicas utilizadas para obter e isolar as moléculas de ácidos nucleicos. As sequências de polinucleótidos também podem ser produzidas sinteticamente, em vez de clonadas.

Ainda outro método conveniente para isolar moléculas de ácidos nucleicos específicos é pela reacção em cadeia da polimerase (PCR). Mullis *et al.* (1987) *Methods Enzymol.* 155:335-350. Esta técnica utiliza ADN polimerase, usualmente uma ADN polimerase termostável, para replicar uma região de ADN desejada. A região de ADN a ser replicada é identificada por oligonucleótidos de sequência especificada complementar a extremidades opostas e cadeias opostas do ADN desejado para iniciar a reacção de replicação. O produto do primeiro ciclo de replicação é ele próprio um molde para a replicação subsequente, e assim os ciclos sucessivos de replicação repetidos resultam em amplificação geométrica do fragmento de ADN delimitado pelo par de iniciadores utilizado.

Uma vez obtidas as sequências relevantes das subunidades de exotoxina de ADP-ribosilação de interesse, podem ser ligadas umas à outras para dar uma ou mais moléculas de ácidos nucleicos contíguas utilizando técnicas correntes de biologia molecular ou de clonagem. Mas particularmente, depois de ter sido obtida a informação da sequência da combinação de subunidades da toxina seleccionada, as sequências de codificação podem ser

combinadas entre si ou com outras sequências para formar uma sequência híbrida, ou tratadas em separado. Em sequências híbridas, as sequências de codificação dos péptidos das subunidades podem ser posicionadas de qualquer maneira uma em relação à outra, e podem ser incluídas numa única molécula de várias formas, por exemplo, como uma cópia única, repetidas aleatoriamente na molécula como cópias múltiplas, ou incluídas na molécula como repetições em série múltiplas ou motivos repetidos ordenados de maneira diferente.

Embora se possa utilizar qualquer de várias técnicas correntes de biologia molecular para construir essas moléculas de ácido nucleico recombinante, um método conveniente abrange a utilização de um ou mais sítios de restrição únicos num vector de vai-vem ou de clonagem (ou inserir um ou mais sítios de restrição únicos numa sequência do vector adequada) e as técnicas de clonagem correntes para dirigir a sequência ou sequências de codificação dos péptidos das subunidades para localizações alvo específicas dentro de um vector.

Alternativamente, podem ser produzidas moléculas híbridas sinteticamente em vez de serem clonadas. A sequência de nucleótidos pode ser concebida com os codões apropriados para a sequência de aminoácidos específica desejada. Em geral, selecciona-se os codões preferidos para o hospedeiro pretendido em que vai ser expressa a sequência. A sequência completa pode ser então montada a partir de oligonucleótidos de sobreposição preparados por métodos correntes e montados numa sequência de codificação completa. Ver, por exemplo, Edge (1981) *Nature* 292:756; Nambair *et al.* (1984) *Science* (1984) 223:1299; Jay *et al.* (1984) *J. Biol. Chem.* 259:6311.

Uma vez obtidas ou construídas as sequências de codificação dos péptidos da exotoxina de ADP-ribosilação relevantes, as mesmas podem ser inseridas em um ou mais

vectores adequados que sequências de controlo ligadas operativamente à sequência ou sequências inseridas, proporcionando assim cassetes de expressão que permitem a expressão dos péptidos das subunidades da toxina in vivo numa espécie de indivíduo alvo.

Os promotores típicos da expressão de células de mamíferos incluem o promotor do gene de expressão precoce de SV40, um promotor de CMV tal como o promotor do gene imediato de expressão precoce (*immediate early promoter*) de CMV, o promotor LTR do vírus do tumor da mama de murganho, o promotor major de expressão tardia de adenovírus (Ad MLP), e outros sistemas promotores com eficácia adequada. Os promotores não virais, tais como um promotor derivado do gene de metalotioneína de murino, também podem ser utilizados para a expressão de mamíferos. Os promotores indutíveis, repressíveis ou controláveis de outro modo também podem ser utilizados. Tipicamente, as sequências de terminação da transcrição e poliadenilação também vão estar presentes, localizadas 3' em relação a cada codão de terminação da tradução. De preferência, também está presente uma sequência para optimização da iniciação de tradução, localizada 5' em relação a cada sequência de codificação. Os exemplos dos sinais de terminação da transcrição/poliadenilação incluem os derivados de SV40, como descrito em Sambrook *et al.*, *supra*, bem como uma sequência terminadora da hormona de crescimento de bovino. Os intrões, que contêm sítios doadores e aceitadores de *splicing*, também podem ser concebidos na casquete de expressão.

Além disso, os elementos intensificadores podem ser incluídos dentro das cassetes de expressão para aumentar os níveis de expressão. Exemplos de intensificadores adequados incluem o intensificador do gene de expressão precoce de SV40 (Dijkema *et al.* (1985) *EMBO J.* 4:761), o intensificador/promotor derivado da repetição terminal

longa (LTR) do Vírus de Sarcoma de Rous (Gorman *et al.* (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 79:6777), e os elementos derivados do CMV de ser humano ou de murino (Boshart *et al.* (1985) *Cell* 41:521), por exemplo, os elementos incluídos na sequência do intrão A de CMV.

Está incluída uma sequência auxiliar adicional que proporciona a secreção do péptido da subunidade da exotoxina de ADP-ribosilação ligada de uma célula de mamífero. Essas sequências líderes da secreção já são conhecidas pelos especialistas na arte, e incluem, por exemplo, a sequência de sinal líder do activador do plasminogénio do tecido (tpa).

Depois de terem sido produzidas uma ou mais cassetes de expressão adequadas (ou construções de ácidos nucleicos tais como vectores do plasmídeo) que contêm as sequências de codificação dos péptidos das subunidades da exotoxina de ADP-ribosilação de interesse, as cassetes de expressão podem ser proporcionadas num vector de transfecção adequado tal como um vector do plasmídeo de ADN ou um vector viral para administração subsequente a um indivíduo. A este respeito, as composições de polinucleótidos da invenção podem ser utilizadas como composições adjuvantes por si sós, ou co-administradas com um antigénio de interesse, por exemplo, como parte de uma composição de vacina de componentes múltiplos. Por exemplo, numa composição de vacina de componentes múltiplos, as presentes moléculas de ácidos nucleicos (que contêm as sequências de codificação dos péptidos das subunidades de exotoxina de ADP-ribosilação de interesse) podem ser combinadas com moléculas de ácidos nucleicos adicionais que codificam um ou mais antigénios que se sabe que vão ser importantes para proporcionar protecção contra um agente patogénico, por exemplo, as moléculas que contêm sequências que codificam os antigénios de HA ou NA de influenza, ou as moléculas que contêm sequências que codificam os antigénios

de VIH. Alternativamente, a composição de vacina de componentes múltiplos pode conter, além dos polinucleótidos que codificam as subunidades da toxina, o antigénio na forma de vírus completo convencional, vírus fraccionado, polissacárido, ou preparações de vacina das subunidades purificadas como aqui descrito adiante.

Antigénios

As composições e métodos aqui descritos são úteis como adjuvantes de uma resposta imune contra uma ampla variedade de antigénios co-administrados, por exemplo antigénios obtidos ou derivados de células ou tecidos doentes, ou de agentes patogénicos humanos ou animais. Para efeitos da presente invenção, um adjuvante é utilizado para melhorar a resposta imune a um antigénio específico, por exemplo quando um adjuvante é co-administrado com uma composição de vacina, a resposta imune é maior do que a resposta imune desencadeada por uma quantidade equivalente da composição de vacina administrada sem o adjuvante, ou o adjuvante é utilizado para direccionar um tipo ou classe particular de resposta imune contra um antigénio co-administrado. A co-administração de uma "quantidade eficaz" das composições adjuvantes da presente invenção vai ser a quantidade que melhora uma resposta imunológica ao antigénio co-administrado de tal modo que, por exemplo, são necessárias doses menores ou inferiores do antigénio para produzir uma resposta imune eficiente.

Tal como aqui utilizado, o termo "co-administrado", tal como quando uma composição adjuvante que codifica as subunidades da exotoxina de ADP-ribosilação de acordo com a presente invenção é "co-administrada" com um antigénio de interesse (por exemplo, uma composição de vacina), significa a administração simultânea ou concorrente da composição adjuvante e do antigénio, por exemplo, quando os

dois estão presentes na mesma composição ou são administrados em composições separadas quase ao mesmo tempo mas em sítios diferentes, bem como a administração da composição adjuvante e do antigénio em composições separadas em diferentes momentos, incluindo a administração em sítios diferentes. Por exemplo, a composição adjuvante pode ser administrada antes ou depois da administração do antigénio no mesmo sítio ou num sítio diferente. O intervalo entre a administração do adjuvante e do antigénio pode variar desde aproximadamente vários minutos, até várias horas, até vários dias.

Para efeitos da presente invenção, o termo "agente patogénico" é utilizado num sentido lato para se referir a um agente causal específico de uma doença ou patologia, e inclui qualquer agente que proporcione uma fonte de uma molécula que desencadeia uma resposta imune. Assim, os agentes patogénicos incluem, mas não estão limitados a vírus, bactérias, fungos, protozoários, parasitas, células cancerosas e outras semelhantes. Tipicamente, a resposta imune é produzida por um ou mais antigénios de péptido ou hidrato de carbono produzidos pelo agente patogénico. Os métodos para identificar os antigénios adequados, obter e preparar essas moléculas, e determinar depois as dosagens adequadas, avaliar a imunogenicidade adequada e o tratamento com esses antigénios já são bem conhecidos na arte. Ver, por exemplo, Plotkin et al. (1994) *Vaccines*, 2nd Edition, W. B. Saunders, Philadelphia, PA. Exemplos não limitativos de fontes dos antigénios que podem ser utilizados para vacinar indivíduos vertebrados, particularmente mamíferos humanos e não humanos, incluem assim vírus, bactérias, fungos, e outros organismos patogénicos.

Os antigénios virais adequados incluem, mas não estão limitados aos obtidos ou derivados da família de vírus da hepatite, incluindo o vírus da hepatite A (VHA), o

vírus da hepatite B (VHB), o vírus da hepatite C (VHC), o vírus da hepatite delta (VHD), o vírus da hepatite E (VHE) e o vírus da hepatite G (VHG). Ver, por exemplo, as publicações internacionais N°s WO 89/04669; WO 90/11089; e WO 90/14436. O genoma do VHC codifica várias proteínas virais, incluindo E1 e E2. Ver, por exemplo, Houghton *et al.* (1991) *Hepatology* 14:381-388. Os fragmentos genômicos contendo sequências que codificam estas proteínas, bem como fragmentos antigénicos delas, vão encontrar utilização nos presentes métodos. Analogamente, a sequência de codificação do antígeno δ de VHD é conhecida (ver, por exemplo, a patente U.S. N° 5378814).

De modo semelhante, uma grande variedade de proteínas da família do vírus do herpes pode ser utilizada como antígenos na presente invenção, incluindo as proteínas derivadas do vírus do herpes simplex (VHS) dos tipos 1 e 2, tais como as glicoproteínas gB, gD e gH de VHS-1 e VHS-2; os antígenos do vírus da varicela zoster (VVZ), o vírus de Epstein-Barr (VEB) e o citomegalovírus (CMV) incluindo gB e gH de CMV; e os antígenos de outros vírus do herpes humano tais como VHH6 e VHH. (Ver, por exemplo, Chee *et al.* (1990) *Cytomegaloviruses* (J.K. McDougall, ed., Springer-Verlag, páginas 125-169; McGeoch *et al.* (1988) *J. Gen. Virol.* 69:1531-1574; patente U.S. N° 5171568; Baer *et al.* (1984) *Nature* 310:207-211; e Davison *et al.* (1986) *J. Gen. Virol.* 67:1759-1816).

Os antígenos do vírus de imunodeficiência humana (VHI), tais como as moléculas gp120 para um grande número de isolados de VIH-1 e incluindo os membros de vários subtipos genéticos de VIH, são conhecidos e estão descritos (ver, por exemplo, Myers *et al.*, Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico (1992); e Modrow *et al.* (1987) *J. Virol.* 61:570-578) e os fragmentos genômicos que contêm o antígeno, derivados ou obtidos a partir de qualquer destes isolados vão ter

utilização na presente invenção. Além disso, outras proteínas imunogénicas derivadas ou obtidas a partir de qualquer dos vários isolados de VIH vão encontrar utilização aqui, incluindo os fragmentos contendo uma ou mais das várias proteínas de envelope tais como gp160 e gp41, os antígenos de gag tais como p24gag e p55gag, bem como as proteínas derivadas das regiões pol, env, tat, vif, rev, nef, vpr, vpu e LTR de VIH.

Os antígenos derivados ou obtidos a partir de outros vírus também têm aqui utilização, tais como sem limitação, antígenos dos membros das famílias Picomaviridae (por exemplo, poliovírus, rinovírus, etc.); Caliciviridae; Togaviridae (por exemplo, vírus da rubéola, vírus do dengue, etc.); Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae (por exemplo, rotavírus, etc.); Birnaviridae; Rhabdoviridae (por exemplo, o vírus da raiva, etc.); Orthomyxoviridae (por exemplo, os tipos A, B e C do vírus da gripe, etc.); Filoviridae; Paramyxoviridae (por exemplo, vírus da papeira, vírus do sarampo, vírus sincicial respiratório, vírus Parainfluenza, etc.); Bunyaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (por exemplo, HTLV-1; HTLV-II; VIH-1 (também conhecido como HTLV-III, LAV, ARV, hTLR, etc.)), incluindo mas sem estar limitado aos antígenos dos isolados de VIH_{IIb}, VIH_{SF2}, VIH_{LAV}, VIH_{LAI}, VIH_{MN} ; VIH-1_{CM235}, VIH-1_{US4}; VIH-2, entre outros; o vírus da imunodeficiência do símio (VIS); Papilomavirus, os vírus de encefalite transmitidos por carraças; e outros semelhantes. Ver, por exemplo, Virology, 3rd edition (W. K. Joklik ed. 1988); Fundamental Virology, 2nd edition (B. N. Fields e D. M. Knipe, eds. 1991), para uma descrição destes e de outros vírus.

Em alguns contextos, pode ser preferível que os antígenos virais seleccionados sejam obtidos ou derivados de um agente patogénico viral que tipicamente é introduzido no corpo através de uma superfície mucosa e se sabe que

provoca ou está associado a uma doença humana, tais como, mas não limitados a VIH (SIDA), vírus da gripe (gripe), vírus do herpes simplex (infecção genital, herpes labial, STDs), rotavírus (diarreia), vírus parainfluenza (infecções respiratórias), poliovírus (poliomielite), vírus sincicial respiratório (infecções respiratórias), vírus da papeira e do sarampo (papeira, sarampo), vírus da rubéola (rubéola), e rinovírus (resfriado comum).

Os fragmentos genómicos que contêm antigénios bacterianos e parasitas podem ser obtidos ou derivados dos agentes causais conhecidos responsáveis por doenças que incluem, mas não estão limitadas a difteria, tosse convulsa, tétano, tuberculose, pneumonia bacteriana ou fúngica, otite média, gonorreia, cólera, febre tifóide, meningite, mononucleose, peste, shigelose ou salmonelose, doença do legionário, doença de Lyme, lepra, malária, ancilostomíase, ancilostomíase, oncocercose, bilharziose, doença do sono, leishmaniose, giardíase, amebíase, filariose, borreliose e triquinose. Pode ainda obter-se ou derivar-se outros antigénios de vírus não convencionais tais como os agentes causais de kuru, doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), tremor epizoótico, encefalopatia transmissível do vison, doenças debilitantes crónicas, ou de partículas infecciosas proteináceas tais como priões que estão associados à doença das vacas loucas.

Os agentes patogénicos específicos podem incluir *M. tuberculosis*, *Chlamydia*, *N. gonorrhoeae*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio Cholera*, *Ereponema pallidua*, *Pseudomofaas*, *Bordetella pertussis*, *Brucella*, *Franciscella tulorensis*, *Helicobacter pylori*, *Leptospria interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia pestis*, *Streptococcus* (tipos A e B), *Pneumococcus*, *Meningococcus*, *Hemophilus influenza* (tipo b), *Toxoplasma gondic*, *Complylobacteriosis*, *Moraxella catarrhalis*, *Donovanosis*, e *Actinomycosis*; agentes patogénicos fúngicos incluindo candidíase e da

aspergilose; agentes patogénicos parasíticos incluindo ténias, planárias, ascarídeos, amebíase, giardíase, criptosporídio, bilharziose, *Pneumocystis carinii*, *tricomoniase* e triquinose. Assim, a presente invenção também pode ser utilizada para proporcionar uma resposta imune adequada contra numerosas doenças veterinárias, tais como febres aftosas, coronavírus, *Pasteurella multocida*, *Helicobacter*, *Strongylus vulgaris*, *Actinobacillus pleuropneumonia*, vírus da diarreia viral dos bovinos (BVDV), *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *brochiseptica*.

Em algumas formas de realização, o antigénio de interesse pode ser um alergénio. Um "alergénio" é um antigénio que pode iniciar um estado de hipersensibilidade, ou que provoca uma reacção de hipersensibilidade imediata num indivíduo já sensibilizado com o alergénio. Os alergénios são vulgarmente proteínas ou substâncias químicas ligadas a proteínas que têm a propriedade de ser alergénicas; contudo, os alergénios também podem incluir materiais orgânicos ou inorgânicos derivados de uma variedade de fontes artificiais ou naturais tais como materiais vegetais, metais, ingredientes em cosméticos ou detergentes, latexes, ou outros semelhantes. As classes de alergénios adequados para utilização nos métodos da invenção podem incluir, mas não estão limitadas a pólen, escamação de animais, ervas, bolores, poeiras, antibióticos, venenos de insectos que picam, e uma variedade de alergénios ambientais (incluindo substâncias químicas e metais), fármacos e alimentos. Os alergénios das árvores comuns incluem pólen de choupo do Canadá, choupo, freixo, bétula, bôrdó, carvalho, ulmeiro, noqueira americana e cárias; os alergénios de plantas comuns incluem os de centeio, ambrósia, tanchagem menor, azedas e amarantos; os alergénios de contacto de plantas incluem os de sumagre, hera venenosa e urtigas; os alergénios das

ervas comuns incluem capim rabo-de-gato, sorgo bravo, grama-das-boticas, festuca e erva-de-febra; os alérgenos comuns também pode ser obtidos a partir de bolores ou fungos tais como *Alternaria*, *Fusarium*, *Hormodendrum*, *Aspergillus*, *Micropolyspora*, *Mucor* e actinomicetes termófilos; a penicilina e a tetraciclina são alérgenos antibióticos comuns; os alérgenos epidérmicos podem ser obtidos a partir de poeiras domésticas ou orgânicas (tipicamente de origem fúngica), de insectos tais como ácaros (*Dermatophagoides pterosinyssis*), ou de fontes animais tais como penas, e escamações de gatos e cães; os alérgenos comuns dos alimentos incluem leite e queijo (lácteo), ovo, trigo, frutos secos (por exemplo, amendoins), mariscos (por exemplo, crustáceos), ervilhas, feijões e alérgenos de glúten; os alérgenos ambientais comuns incluem os alérgenos de metais (níquel e ouro), produtos químicos (formaldeído, trinitrofenol e aguarrás), látex, borracha, fibras (algodão ou lã), serapilheira, tintas para o cabelo, cosméticos, detergentes e perfumes; os alérgenos de fármacos comuns incluem alérgenos anestésicos locais e salicilatos; os alérgenos antibióticos incluem os alérgenos penicilina e sulfonamida; e os alérgenos de insectos comuns incluem o veneno de abelha, vespa e formiga, e alérgenos do átrio de escaravelhos. Os alérgenos especialmente bem caracterizados incluem, mas não estão limitados aos epitopos principais e crípticos do alérgeno de Der pI (Hoyne et al. (1994) *Immunology* 83:190-195), fosfolipase A2 de veneno de abelha (PLA) (Akdis et al. (1996) *J. Clin. Invest.* 98: 1676-1683), alérgeno de pólen de bétula Bet v 1 (Bauer et al. (1997) *Clin. Exp. Immunol.* 107: 536-541), e o alérgeno de erva recombinante multi-epitópico rKBG8.3 (Cao et al. (1997) *Immunology* 90: 46-51). Estes e outros alérgenos adequados estão disponíveis comercialmente e/ou podem ser prontamente preparados como extractos seguindo

técnicas conhecidas.

Em certas outras formas de realização, o antígeno de interesse pode ser um antígeno específico de tumores. Para efeitos da presente invenção, os antígenos específicos de tumores incluem, mas não estão limitados a qualquer dos vários MAGEs (antígeno E associado a melanoma), incluindo MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3 (péptido HLA-A1), MAGE 4, etc.; qualquer das várias tirosinases (péptido HLA-A2); ras mutante; p53mutante; e antígeno do melanoma p97. Outros antígenos específicos de tumores incluem o péptido Ras e o péptido p53 associado a cancros avançados, os antígenos HPV 16/18 e E6/E7 associados a cancros do colo do útero, antígeno MUC1-KLH associado ao carcinoma da mama, CEA (antígeno carcinoembrionário) associado ao cancro colorrectal, antígenos gp 100 ou MART1 associados a melanoma, e o antígeno PSA associado ao cancro da. A sequência do gene p53 é conhecida (ver por exemplo, Harris et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 4650-4656) e está depositada no GenBank com o N° de ordem M14694. Assim, as composições adjuvantes da presente invenção podem ser utilizadas para realizar métodos imunoterapêuticos para o tratamento de cancros do colo do útero, da mama, colorrectal, da próstata, do pulmão, e melanomas.

Os antígenos para utilização com a presente invenção podem ser obtidos ou produzidos utilizando uma variedade de métodos conhecidos pelos especialistas na matéria. Em particular, os antígenos podem ser isolados directamente de fontes naturais, utilizando técnicas de purificação correntes. Alternativamente, os antígenos podem ser produzidos recombinantemente utilizando técnicas conhecidas. Ver, por exemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols. I, II, III, Second Edition (1989); *DNA Cloning*, Vols. I, II (D. N. Glover ed. 1985). Os antígenos para utilização aqui também podem ser sintetizados, com base em sequências de

aminoácidos descritas, através da síntese química de polímeros tal como a síntese de péptidos em fase sólida. Esses métodos são conhecidos pelos especialistas na matéria. Ver, por exemplo, J. N. Stewart e J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) e G. Barany e R. B. Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, editors E. Gross and J. Meienhofer, Vol. 2, Academic Press, New York, (1980), páginas 3-254, para as técnicas de síntese de péptidos em fase sólida; e M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin (1984) e E. Gross e J. Meierhofer, Eds., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, supra*, Vol. 1, para a síntese clássica em solução.

Se desejado, as sequências de polinucleótidos que codificam os antígenos acima descritos podem ser obtidas utilizando métodos recombinantes, como o rastreamento de bibliotecas de ADNc e genômicas de células que exprimem o gene, ou derivando o gene de um vector que se sabe que o inclui. Além disso, o gene desejado pode ser isolado directamente das células e tecidos que o contêm, utilizando técnicas correntes, tais como a extracção com fenol e uma PCR de ADNc ou de ADN genómico. Ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, *supra*, para uma descrição das técnicas utilizadas para obter e isolar ADN. As sequências de polinucleótidos também podem ser produzidas sinteticamente, em vez de clonadas.

Nas composições em que o componente antígeno vai ser proporcionado por meio de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um antígeno de interesse, a sequência de codificação para o antígeno seleccionado pode ser combinada com uma ou ambas as sequências de codificação dos péptidos das subunidades de exotoxina de ADP-ribosilação para proporcionar uma única construção que tem a totalidade das três sequências de codificação, combinadas

com uma só sequência de codificação de uma subunidade da toxina para proporcionar, por exemplo, uma composição de dois plasmídeos, ou proporcionada numa construção separada de uma única construção, ou construções múltiplas que têm as sequências de codificação das subunidades da toxina. Em cada um dos casos acima referidos, o antigénio pode estar ligado operativamente e sob o controlo transcricional dos mesmos ou de diferentes elementos de controlo, por exemplo promotores e intensificadores. Nestas construções em que é utilizado um elemento de controlo único para dirigir a transcrição de duas ou mais sequências de codificação, pode ser utilizada uma sequência de local interno de entrada do ribossoma (IRES) para facilitar a transcrição das sequências múltiplas.

Administração de polinucleótidos

Os polinucleótidos (moléculas de ácidos nucleicos que contêm as sequências de codificação dos péptidos das subunidades da exotoxina de ADP-ribosilação) descritos aqui podem ser administrados por qualquer método adequado. Numa forma de realização preferida, descrita adiante, os polinucleótidos são administrados por revestimento de uma ou mais construções adequadas (por exemplo, uma ou mais construções de plasmídeos de ADN) contendo as sequências de codificação dos péptidos das subunidades de exotoxina de ADP-ribosilação de interesse (e, em certas formas de realização, uma sequência de codificação de um antigénio de interesse na mesma construção ou numa construção diferente) em partículas transportadoras que formam um núcleo e depois administra-se as partículas revestidas ao indivíduo ou às células. Contudo, os polinucleótidos da presente invenção também podem ser administrados utilizando um vector viral ou utilizando sistemas não virais, por exemplo, administração de ácido nucleico nú.

Vectores virais

Vários sistemas de base viral foram utilizados para administração de genes. Por exemplo, os sistemas retrovirais já são conhecidos e utilizam geralmente linhas de empacotamento que têm um provírus defeituoso integrado (o "auxiliar") que exprime a totalidade dos genes do vírus mas não pode empacotar o seu próprio genoma devido a uma deleção do sinal de empacotamento, conhecido como a sequência psi. Por conseguinte, a linha celular produz invólucros virais vazios. As linhas produtoras podem ser derivadas das linhas de empacotamento que, além do auxiliar, contêm um vector viral que inclui sequências necessárias em cis para replicação e empacotamento do vírus, conhecidas como as repetições terminais longas (LTRs). A ou as moléculas de polinucleótidos de interesse podem ser inseridas no vector e empacotadas nos invólucros virais sintetizados pelo auxiliar retroviral. O vírus recombinante pode então ser isolado e administrado a um indivíduo. (Ver, por exemplo, patente U.S. N° 5219740). Os vectores virais representativos incluem mas não estão limitados a vectores tais como os vectores LHI, N2, INSAL, LSHL e LHL2 descritos por exemplo na patente U.S. N° 5219740, bem como os derivados destes vectores, tais como o vector N2 modificado descrito aqui. Os vectores retrovirais podem ser construídos utilizando técnicas bem conhecidas na arte. Ver, por exemplo, a Patente U.S. N° 5219740; Mann *et al.* (1983) *Cell* 33:153-159.

Foram desenvolvidos sistemas à base de adenovírus para administração de genes e são adequados para administrar as moléculas de ácidos nucleicos aqui descritas. Os adenovírus humanos são vírus de ADN de cadeia dupla, que entram nas células por endocitose mediada por receptores. Estes vírus são particularmente adequados para

transferência genética porque são fáceis de fazer crescer e manipular e apresentam uma ampla gama de hospedeiros *in vivo* e *in vitro*. Por exemplo, os adenovírus podem infectar células humanas de origem hematopoiética, linfóide e mielóide. Além disso, os adenovírus infectam células alvo tanto quiescentes como em replicação. Ao contrário dos retrovírus que se integram no genoma do hospedeiro, os adenovírus persistem extracromossomicamente minimizando assim o risco associado à mutagênese de inserção. O vírus é produzido facilmente em concentrações elevadas e é estável pelo que pode ser purificado e armazenado. Mesmo em forma competente para replicação, os adenovírus só provocam um baixo nível de morbidez e não estão associados a doenças malignas humanas. Em consequência, foram desenvolvidos vectores de adenovírus que utilizam estas vantagens. Para uma descrição de vectores de adenovírus e das suas utilizações ver, por exemplo, Haj-Ahmad e Graham (1986) *J. Virol.* 57:267-274; Bett et al. (1993) *J. Virol.* 67:5911-5921; Mittereder et al. (1994) *Human Gene Therapy* 5:717-729; Seth et al. (1994) *J. Virol.* 68:933-940; Barr et al. (1994) *Gene Therapy* 1:51-58; Berkner, K. L. (1988) *BioTechniques* 6:616-629; Rich et al. (1993) *Human Gene Therapy* 4:461-476.

Os vectores virais adeno-associados (AAV) também podem ser utilizados para administrar as moléculas de polinucleótidos aqui descritas. A este respeito, os vectores AAV podem ser derivados de qualquer serotipo de AAV, incluindo sem limitação AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAVX7, etc. Os vectores AAV podem ter um ou mais genes do tipo silvestre de AAV delecionados no todo ou em parte, de preferência os genes *rep* e/ou *cap*, mas retêm uma ou mais sequências de repetição de terminal invertido (ITR) de flaqueio funcional. Uma sequência de ITR funcional é em geral considerada necessária para a recuperação, replicação e empacotamento do virião de AAV. Assim, um vector AAV

inclui pelo menos as sequências requeridas em *cis* para replicação e empacotamento (por exemplo, uma ITR funcional) do vírus. A ITR não precisa de ser uma sequência de nucleótido do tipo silvestre, e pode ser alterada, por exemplo, por uma inserção, deleção ou substituição de nucleótidos, desde que a sequência proporcione uma recuperação funcional, replicação e empacotamento.

Os vectores de expressão de AAV são construídos utilizando técnicas conhecidas para proporcionar pelo menos como componentes ligados operativamente na direcção da transcrição, elementos de controlo incluindo uma região de início da transcrição, o ADN de interesse e uma região de terminação da transcrição. Os elementos de controlo são seleccionados para serem funcionais numa célula de mamífero. A construção resultante que contém os componentes ligados operativamente está ligada (5' e 3') às sequências ITR do AAV. As construções de AAV adequadas podem ser concebidas utilizando técnicas bem conhecidas na arte. Ver, por exemplo, as patentes U.S. N°s 5173414 e 5139941; publicações internacionais N°s WO 92/01070 (publicada em 23 de Janeiro de 1992) e WO 93/03769 (publicada em 4 de Março de 1993); Lebkowski *et al.* (1988) *Molec. Cell. Biol.* 8:3988-3996; Vincent *et al.* (1990) *Vaccines 90* (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129; Kotin, R.M. (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Shelling e Smith (1994) *Gene Therapy* 1:165-169; e Zhou *et al.* (1994) *J. Exp. Med.* 179:1867-1875.

Preparações Farmacêuticas Convencionais

A formulação de uma preparação que compreenda moléculas de polinucleótidos da presente invenção, com ou sem adição de uma composição de antigénio, pode ser feita

utilizando os procedimentos químicos e as metodologias de formulação farmacêutica correntes, todas disponíveis facilmente disponíveis a um técnico com conhecimentos correntes. Por exemplo, as composições que contêm um ou mais vectores adequados podem ser combinadas com um ou mais excipientes ou veículos farmacêuticamente aceitáveis para proporcionar uma preparação líquida.

As substâncias auxiliares, tais como agentes molhantes ou emulsionantes, substâncias tamponantes do pH e outras semelhantes, podem estar presentes no excipiente ou no veículo. Estes excipientes, veículos e substâncias auxiliares são geralmente agentes farmacêuticos que não induzem uma resposta imune no indivíduo que recebe a composição, e que podem ser administrados sem toxicidade indevida. Os excipientes farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a líquidos tais como água, soro fisiológico, polietileno glicol, ácido hialurónico, glicerol e etanol. Os sais farmacêuticamente aceitáveis também podem estar aí incluídos, por exemplo, sais de ácidos minerais tais como cloridratos, bromidratos, fosfatos, sulfatos, e outros semelhantes; e sais de ácidos orgânicos tais como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, e outros semelhantes. É também preferido, embora não necessário, que as preparações contenham um excipiente farmacêuticamente aceitável que sirva como um estabilizador, particularmente para moléculas de péptido, proteína ou outras semelhantes a antigénios se forem para ser incluídas na composição de vacina. Exemplos de veículos adequados que também actuam como estabilizadores de péptidos incluem, sem limitação, qualidades farmacêuticas de dextrose, sacarose, lactose, trealose, manitol, sorbitol, inositol, dextrano, e outros semelhantes. Outros veículos adequados incluem, novamente sem limitação, amido, celulose, fosfatos de sódio ou cálcio, ácido cítrico, ácido tartárico, glicina, polietileno glicóis de peso molecular

elevado (PEGs), e combinações suas. Uma discussão completa de excipientes, veículos e substâncias auxiliares farmacologicamente aceitáveis está disponível em REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991), aqui incorporada por citação.

Certos facilitadores da absorção e/ou expressão de ácidos nucleicos ("agentes facilitadores da transfecção") também podem ser incluídos nas composições, por exemplo, facilitadores tais como bupivacaína, cardiotoxina e sacarose, e veículos facilitadores da transfecção tais como preparações lipossomais ou lipídicas que são utilizadas rotineiramente para administrar moléculas de ácidos nucleicos. Os lipossomas aniônicos e neutros estão amplamente disponíveis e são bem conhecidos para administrar moléculas de ácidos nucleicos (ver, por exemplo, *Liposomes: A Practical Approach*, (1990) RPC New Ed., IRL Press). As preparações lipídicas catiónicas também são veículos bem conhecidos para utilização na administração de moléculas de ácidos nucleicos. As preparações lipídicas adequadas incluem DOTMA (cloreto de (N-[1-(2,3-dioleíloxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio), disponível com o nome comercial Lipofectin™, e DOTAP (1,2-bis(oleíloxi)-3-(trimetilamônio)propano), ver, por exemplo, Felgner et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7416; Malone et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6077-6081; patentes U.S. N°s 5283185 e 5527928, e publicações internacionais N°s WO 90/11092, WO 91/15501 e WO 95/26356. Estes lípidos catiónicos podem ser utilizados de preferência em associação com um lípido neutro, por exemplo DOPE (dioleíl fosfatidiletanolamina). Ainda outras composições facilitadoras da transfecção, que podem ser adicionadas às preparações lipossomais ou lipídicas acima referidas incluem derivados de espermina (ver, por exemplo, publicação internacional N° WO 93/18759) e compostos de permeabilização da membrana tais como GALA, granlicidina S

e sais biliares catiónicos (ver, por exemplo, publicação internacional N° WO 93/19768).

Alternativamente, as moléculas de ácidos nucleicos da presente invenção podem ser encapsuladas, adsorvidas em, ou associadas a veículos em partículas. Os veículos em partículas adequados incluem os derivados de polímeros de poli(metacrilato de metilo), bem como micropartículas de PLG derivadas de poli(lactidos) e poli(lactidos-co-glicolidos). Ver, por exemplo, Jeffery et al. (1993) *Pharm. Res.* 10:363-368. Podem também ser utilizados outros sistemas e polímeros em partículas, por exemplo, polímeros tais como polilisina, poliarginina, poliornitina, espermina, espermidina, bem como os conjugados destas moléculas.

As composições formuladas vão assim tipicamente incluir uma ou mais moléculas de polinucleótidos (por exemplo, o vector de plasmídeo) que contém as sequências de codificação dos péptidos das subunidades de exotoxina de ADP-ribosilação seleccionados numa quantidade suficiente para adjuvantar uma resposta imunológica contra um antigénio co-administrado. Uma quantidade eficaz apropriada pode ser determinada facilmente por um especialista na matéria. Essa quantidade vai estar numa gama relativamente ampla que pode ser determinada através de ensaios de rotina. Por exemplo, o efeito adjuvante adequado pode ser obtido com tão pouco como 0,1 µg de ADN, enquanto que noutras administrações, pode utilizar-se até 2 mg de ADN. Espera-se em geral que uma dose eficaz dos polinucleótidos que contém as sequências de codificação dos péptidos das subunidades da exotoxina ribosilante do ADP de interesse, estejam dentro da gama de cerca de 1 µg a 1000 µg, contudo também se pode verificar que vão ser eficazes doses acima e abaixo desta gama. As composições podem conter assim de cerca de 0,1% a cerca de 99,9% das moléculas de polinucleótidos.

Administração de Preparações Farmacêuticas
Convencionais

A administração das preparações farmacêuticas descritas anteriormente pode ser efectuada numa dose, de modo contínuo ou intermitente do princípio ao fim do regime de tratamento. Isto é, uma vez formuladas adequadamente, as composições da presente invenção podem ser administradas a um indivíduo *in vivo* utilizando uma variedade de vias e técnicas conhecidas. Por exemplo, as preparações líquidas podem ser proporcionadas como uma solução, suspensão ou emulsão injectável e administradas por injeção parentérica, subcutânea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, utilizando uma seringa e agulha convencional, ou utilizando um sistema de injeção de jacto de líquido. As preparações líquidas também podem ser administradas topicamente na pele ou tecido mucoso, ou proporcionadas como um pulverizado finamente dividido para administração respiratória ou pulmonar. Outros modos de administração incluem administração oral, supositórios, e técnicas de administração transdérmica activas ou passivas.

Alternativamente, as composições podem ser administradas *ex vivo*, por exemplo já são conhecidas a administração e reimplante das células transformadas num indivíduo (por exemplo, a transfecção mediada por dextrano, a precipitação com fosfato de cálcio, electroporação, e microinjecção directa em núcleos). Contudo, a administração mais tipicamente será através de agulha e seringa convencionais para as composições líquidas e para as suspensões líquidas que contêm as composições em partículas. Os métodos de determinação dos meios e doses mais eficazes de administração são bem conhecidos pelos especialistas na matéria e vão variar com o veículo de administração, a composição da terapêutica, as células

alvo, e o indivíduo a ser tratado. Podem ser feitas administrações únicas ou múltiplas com um nível da dose e padrão que são seleccionados pelo médico assistente. Deve entender-se que mais do que uma região de codificação da subunidade e/ou uma região de codificação do antigénio podem ser transportadas por uma única construção do vector de polinucleótido. Alternativamente, vectores separados (por exemplo, vectores virais, plasmídeos, ou qualquer combinação sua), exprimindo cada um deles um ou mais péptidos e/ou antigénios das subunidades da toxina derivada de qualquer agente patogénico, também podem ser administrados a um indivíduo tal como aqui descrito.

Além disso, também se pretende que os polinucleótidos administrados pelos métodos da presente invenção sejam combinados com outras composições e terapêuticas adequadas. Por exemplo, para aumentar mais uma resposta imune num indivíduo, as composições e métodos aqui descritos podem ser combinados com a administração de substâncias auxiliares (por exemplo, outros adjuvantes), tais como agentes farmacológicos, citoquinas, ou outras semelhantes. As substâncias auxiliares podem ser administradas, por exemplo, como proteínas ou outras macromoléculas ao mesmo tempo, antes, ou depois da administração das moléculas de polinucleótidos aqui descritas. As composições de moléculas de ácidos nucleicos também podem ser administradas directamente ao indivíduo ou, alternativamente, administradas *ex vivo*, a células derivadas do indivíduo, utilizando os métodos conhecidos pelos especialistas na matéria.

Partículas revestidas

Numa forma de realização as construções de polinucleótido que contêm as sequências de codificação dos péptidos das subunidades de exotoxina de ADP-ribosilação

seleccionados, e outros componentes auxiliares (tais como as sequências de codificação de um ou mais antigénios) são administrados utilizando partículas transportadoras. Os métodos de administração mediados por partículas para administrar essas preparações de ácidos nucleicos já são conhecidos na arte. Por conseguinte, uma vez preparadas e purificadas adequadamente, as construções do vector do plasmídeo descritas anteriormente podem ser revestidas nas partículas transportadoras (por exemplo, partículas transportadoras que formam um núcleo) utilizando uma variedade de técnicas conhecidas na arte. As partículas transportadoras são seleccionadas de materiais que têm uma densidade adequada na gama de tamanhos de partícula utilizados tipicamente para administração intracelular a partir de um dispositivo de administração de partículas apropriado. O tamanho óptimo das partículas transportadoras vai depender, é claro, do diâmetro das células alvo.

Para efeitos da presente invenção, pode utilizar-se partículas transportadoras que formam um núcleo compostas por tungsténio, ouro, platina e irídio. São preferidas as partículas de tungsténio e de ouro. As partículas de tungsténio estão disponíveis facilmente em tamanhos médios de 0,5 a 2,0 μm de diâmetro. Embora essas partículas tenham uma densidade óptima para utilização em métodos de administração de partículas, e permitam um revestimento altamente eficiente com o ADN, o tungsténio pode ser potencialmente tóxico para certos tipos de células. Em consequência, as partículas de ouro ou o ouro microcristalino (por exemplo, o pó de ouro A1570, disponível de Engelhard Corp., East Newark, NJ) também encontram utilização com os presentes métodos. As partículas de ouro proporcionam uniformidade de tamanho (disponíveis de Alpha Chemicals em tamanhos de partícula de 1 a 3 μm , ou disponíveis de Degussa, South Plainfield, NJ numa gama de tamanhos de partícula incluindo 0,95 μm) e

toxicidade reduzida.

São conhecidos e já foram descritos vários métodos para o revestimento ou precipitação do ADN ou ARN em partículas de ouro ou de tungsténio. A maioria desses métodos combina geralmente uma quantidade predeterminada de ouro ou de tungsténio com o ADN do plasmídeo, CaCl_2 e espermidina. A solução resultante é agitada em vortex continuamente durante o procedimento de revestimento para assegurar a uniformidade da mistura de reacção. Após a precipitação do ácido nucleico, as partículas revestidas podem ser transferidas para membranas adequadas e deixa secar antes da utilização, são revestidas em superfícies de um módulo ou cassete de amostra, ou carregadas numa cassete de administração para utilização num dispositivo de administração de partículas adequado.

Os antigénios peptídicos também podem ser revestidos nas mesmas partículas transportadoras que formam um núcelo ou noutras semelhantes. Por exemplo, os péptidos podem ser ligados a uma partícula transportadora simplesmente misturando os dois componentes numa proporção predeterminada empiricamente, por precipitação com sulfato de amónio ou outros métodos de precipitação com solvente conhecidos pelos especialistas na matéria, ou por acoplamento químico do péptido à partícula transportadora. O acoplamento dos resíduos de L-cisteína a ouro foi descrito anteriormente (Brown *et al.*, *Chemical Society Reviews* 9:271-311 (1980)). Outros métodos poderiam incluir, por exemplo, a dissolução do péptido em etanol absoluto, água, ou uma mistura de álcool/água, adição da solução a uma quantidade de partículas transportadoras, e secando depois a mistura sob uma corrente de ar ou de azoto gasoso enquanto se agita em vortex. Alternativamente, o antigénio pode ser seco sobre as partículas transportadoras por centrifugação em vácuo. Uma vez secas, as partículas revestidas podem ser ressuspensas num solvente adequado

(por exemplo, acetato de etilo ou acetona), e trituradas (por exemplo, por sonicação) para proporcionar uma suspensão substancialmente uniforme. As partículas transportadoras revestidas com o antigénio podem então ser combinadas com partículas transportadoras que formam um núcleo que têm a ou as construções dos péptidos das subunidades da exotoxina de ADP-ribosilação e administradas num único passo de injeção de partículas, ou administradas separadamente a partir das composições das subunidades da toxina.

Administração de Partículas Revestidas

A seguir à sua formação, as partículas transportadoras que formam um núcleo revestidas com as preparações de ácidos nucleicos da presente invenção, sós ou em associação, por exemplo, com preparações de antigénio, são administradas a um indivíduo utilizando técnicas de administração mediadas por partículas.

Vários dispositivos de administração de partículas adequados para as técnicas de administração mediadas por partículas são conhecidos na arte, e são todos adequados para utilização na prática da invenção. Os desenhos dos dispositivos correntes utilizam uma descarga explosiva, eléctrica ou gasosa, para impulsionar as partículas transportadoras que formam um núcleo, revestidas, até às células alvo. As partículas revestidas podem elas próprias estar fixadas de forma libertável a uma folha transportadora amovível; ou fixadas de forma removível a uma superfície ao longo da qual passa um caudal de gás, levantando as partículas da superfície e acelerando-as na direcção do alvo. Um exemplo de um dispositivo de descarga gasosa está descrito na patente U.S. Nº 5204253. Um dispositivo do tipo explosivo está descrito na patente U.S. Nº 4945050. Um exemplo de um aparelho de aceleração de

partículas do tipo de descarga eléctrica está descrito na patente U.S. N° 5120657. Outro aparelho de descarga eléctrica adequado para utilização aqui está descrito na patente U.S. N° 5149655. As descrições de todas estas patentes são aqui dadas como integralmente incorporadas por citação.

As partículas revestidas são administradas ao indivíduo que vai ser tratado de uma maneira compatível com a formulação de dosagem, e numa quantidade que será eficaz para produzir o efeito adjuvante/resposta imune desejada. A quantidade de composição que vai ser administrada, que no caso das moléculas de ácidos nucleicos está geralmente na gama de 0,001 a 1000 µg, mais tipicamente 0,01 a 10,0 µg da molécula de ácido nucleico por dose, e no caso das moléculas de péptidos ou proteínas é de 1 µg a 5 mg, mais tipicamente 1 a 50 µg de péptido, depende do indivíduo a ser tratado. A quantidade exacta necessária vai variar dependendo da idade e estado general do indivíduo que é imunizado e da sequência de nucleótidos específica ou péptido seleccionado, bem como de outros factores. Uma quantidade eficaz apropriada pode ser determinada facilmente por um especialista na matéria por leitura da presente especificação.

Composições em Partículas

Alternativamente, os polinucleótidos que transportam as sequências de codificação dos péptidos das subunidades da exotoxina de ADP-ribosilação seleccionados, bem como uma ou mais porções do antigénio seleccionado, podem ser formulados como uma composição em partículas. Mas especificamente, a formulação de partículas que compreendem uma ou mais moléculas de polinucleótido pode ser feita utilizando substâncias químicas e metodologias de formulação farmacêutica correntes, de que todas estão

facilmente disponíveis a um técnico com uma experiência razoável. Por exemplo, uma ou mais construções de vectores e/ou componentes de antigénios podem ser combinados com um ou mais excipientes ou veículos farmacêuticamente aceitáveis para proporcionar uma composição de vacina. As substâncias auxiliares, tais como agentes molhantes ou emulsionantes, substâncias tamponantes do pH e outras semelhantes, podem estar presentes no excipiente ou no veículo. Estes excipientes, veículos e substâncias auxiliares são geralmente agentes farmacêuticos que não induzem uma resposta imune no indivíduo que recebe a composição, e que podem ser administrados sem toxicidade indevida. Os excipientes farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a líquidos tais como água, soro fisiológico, polietileno glicol, ácido hialurónico, glicerol e etanol. Os sais farmacêuticamente aceitáveis também podem estar aí incluídos, por exemplo, sais de ácidos minerais tais como cloridratos, bromidratos, fosfatos, sulfatos, e outros semelhantes; e sais de ácidos orgânicos e veículos adequados que também actuam como estabilizadores de péptidos incluem, sem limitação, qualidades farmacêuticas de dextrose, sacarose, lactose, trealose, manitol, sorbitol, inositol, dextrano, e outros semelhantes. Outros veículos adequados incluem, novamente sem limitação, amido, celulose, fosfatos de sódio ou cálcio, ácido cítrico, ácido tartárico, glicina, polietileno glicóis de peso molecular elevado (PEGs), e combinações suas. Uma discussão completa de excipientes, veículos e substâncias auxiliares farmacêuticamente aceitáveis está disponível em REMINGTONS'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

As composições formuladas vão incluir uma quantidade dos polinucleótidos que codificam os péptidos das subunidades da toxina que é suficiente para proporcionar o efeito adjuvante desejado contra um

antigénio co-administrado, como se definiu anteriormente. Uma quantidade eficaz apropriada pode ser determinada facilmente por um especialista na matéria. Essa quantidade vai cair numa gama relativamente ampla, geralmente na gama de cerca de 0,001 µg a cerca de 25 mg ou mais da construção de ácido nucleico de interesse, e as quantidades adequadas específicas podem ser determinadas através de ensaios de rotina. As composições podem conter de cerca de 0,1% a cerca de 99,9% da ou das moléculas de ácidos nucleicos. Se um componente de antigénio estiver incluído na composição, ou se os métodos forem utilizados para proporcionar uma composição do antigénio em partículas, o antigénio estará presente numa quantidade adequada tal como descrito anteriormente. As composições são então preparadas como partículas utilizando técnicas correntes, tais como por evaporação simples (secagem ao ar), secagem em vácuo, secagem por atomização, secagem por congelação (liofilização), secagem por atomização com liofilização, revestimento por pulverização, precipitação, formação de partículas em fluidos supercríticos, e outras semelhantes. Se desejado, as partículas resultantes podem ser densificadas utilizando as técnicas descritas na publicação internacional N° WO 97/48485 da mesma requerente.

Os recipientes de dose unitária individual ou multidoses, em podem estar empacotadas as partículas antes da utilização, podem compreender o recipiente selado hermeticamente que contém uma quantidade adequada das partículas que compreendem uma construção de ácidos nucleicos adequada e/ou um antigénio seleccionado (por exemplo, para proporcionar uma composição de vacina de componentes múltiplos). As composições em partículas podem ser embaladas como uma formulação estéril, e o recipiente selado hermeticamente pode ser assim concebido para preservar a esterilidade da formulação até à sua utilização nos métodos da invenção. Se desejado, os recipientes podem

ser adaptados para uso directo num dispositivo de administração de partículas. Esses recipientes podem tomar a forma de cápsulas, bolsas de folha de alumínio, saquetas, cassetes, e outras semelhantes. Os dispositivos de administração de partículas apropriados (por exemplo, seringas sem agulha) são aqui descritos.

O recipiente no qual são embaladas as partículas pode ainda ser rotulado para identificar a composição e proporcionar informação relevante sobre a dosagem. Além disso, o recipiente pode ser rotulado com um aviso na forma prescrita por uma agência governamental, por exemplo a Food and Drug Administration, em que o aviso indica a aprovação pela agência ao abrigo da Lei Federal do fabrico, utilização ou venda do adjuvante, antigénio (ou composição de vacina) ali contido para administração humana.

As composições em partículas podem então ser administradas utilizando uma técnica de administração transdérmica. De preferência, as composições em partículas vão ser administradas por meio de um método de injeção de pós, por exemplo, administradas a partir de um sistema de seringa sem agulha como os descritos nas publicações internacionais N°s WO 94/24263, WO 96/04947, WO 96/12513, e WO 96/20022 da mesma requerente.

A administração de partículas a partir desses sistemas de seringa sem agulha é tipicamente realizado com partículas que têm um tamanho aproximado que varia geralmente de 0,1 a 250 μm , de preferência que variam desde cerca de 10-70 μm . As partículas superiores a cerca de 250 μm também podem ser administradas a partir dos dispositivos, sendo o limite superior o ponto em que o tamanho das partículas poderia provocar danos indesejados nas células da pele. A distância real que as partículas administradas vão penetrar numa superfície alvo depende do tamanho da partícula (por exemplo, o diâmetro nominal da partícula pressupondo que a geometria da partícula é

aproximadamente esférica), a densidade da partícula, a velocidade inicial à qual a partícula impacta a superfície, e a densidade e viscosidade cinemática do tecido da pele alvo. A este respeito, as densidades ótimas das partículas para utilização em injeção sem agulha geralmente varia entre cerca de 0,1 e 25 g/cm³, de preferência entre cerca de 0,9 e 1,5 g/cm³, e as velocidades de injeção geralmente variam entre cerca de 100 e 3.000 m/s, ou mais. Com pressão de gás apropriada, as partículas que têm um diâmetro médio de 10-70 µm podem ser aceleradas através do bico a velocidades que se aproximam das velocidades supersônicas de um fluxo de gás impulsor.

As composições que contêm uma quantidade terapêuticamente eficaz das moléculas em pó aqui descritas podem ser administradas a qualquer tecido alvo adequado por meio dos dispositivos de administração de partículas descritos anteriormente. Por exemplo, as composições podem ser administradas ao músculo, pele, cérebro, pulmão, fígado, baço, medula óssea, timo, coração, nódulos linfáticos, sangue, cartilagem óssea, pâncreas, bexiga urinária, estômago, intestino, testículos, ovário, útero, recto, sistema nervoso, olho, glândulas e tecidos conjuntivos. Para as moléculas de ácido nucleicos, a administração é de preferência a, e as moléculas são expressas em, células diferenciadas terminalmente; contudo, as moléculas também podem ser administradas a células não diferenciadas, ou parcialmente diferenciadas tais como as células estaminais de sangue e fibroblastos da pele.

Se desejado, estes sistemas de seringa sem agulha podem ser proporcionados em estado pré-carregado que contém uma dosagem adequada das partículas que compreendem as sequências de codificação dos péptidos das subunidades da exotoxina de ADP-ribosilação de interesse. A seringa carregada pode ser embalada num recipiente hermeticamente selado, que pode ser adicionalmente rotulado como descrito

anteriormente.

Assim, o método pode ser utilizado para obter partículas de ácido nucleico que têm um tamanho que varia de cerca de 10 a cerca de 250 μm , de preferência de cerca de 10 a cerca de 150 μm , e mais preferencialmente de cerca de 20 a cerca de 60 μm ; e uma densidade das partículas que varia de cerca de 0,1 a cerca de 25 g/cm^3 , e uma densidade aparente de cerca de 0,5 a cerca de 3,0 g/cm^3 , ou mais.

Analogamente, pode obter-se partículas de antígenos seleccionados que têm um tamanho que varia de cerca de 0,1 a cerca de 250 μm , de preferência de cerca de 0,1 a cerca de 150 μm , e mais preferencialmente de cerca de 20 a cerca de 60 μm ; uma densidade das partículas que varia de cerca de 0,1 a cerca de 25 g/cm^3 , e uma densidade aparente de preferência de cerca de 0,5 a cerca de 3,0 g/cm^3 , e mais preferencialmente de cerca de 0,8 a cerca de 1,5 g/cm^3 .

Melhoramento das Respostas Imunes

Noutra forma de realização da invenção, é proporcionado um método para melhorar uma resposta imune contra um antígeno de interesse. Na essência, o método implica (a) administrar o antígeno de interesse a um indivíduo; (b) proporcionar uma composição adjuvante de acordo com a presente invenção, em que a referida composição contém uma ou mais moléculas de ácidos nucleicos que contêm as sequências de codificação seleccionadas dos péptidos das subunidades da exotoxina de ADP-ribosilação e (c) co-administrar a composição adjuvante ao indivíduo, com o que os péptidos das subunidades da toxina são expressos a partir das respectivas sequências de codificação numa quantidade suficiente para produzir uma resposta imune melhorada contra o antígeno co-administrado. Tal como aqui

descrito acima em pormenor, as sequências de codificação são ligadas operativamente às mesmas ou diferentes sequências reguladoras para proporcionar uma ou mais cassetes de expressão. Estas cassetes de expressão são depois proporcionadas num vector adequado, por exemplo uma construção do vector do plasmídeo ou um vector viral.

Num aspecto, o método implica a administração da composição de polinucleótidos a um indivíduo utilizando as técnicas correntes de administração de genes que são conhecidas na arte. Ver, por exemplo, as patentes U.S. N°s 5399346, 5580859, 5589466. Tipicamente, a composição de vacina de polinucleótidos é combinada com um excipiente ou veículo farmacêuticamente aceitável para proporcionar uma preparação líquida (tal como aqui descrito acima) e depois utilizada como uma solução, suspensão ou emulsão injectável para administração por injeção por via parentérica, subcutânea, intramuscular, intravenosa, utilizando uma agulha e seringa convencional, ou utilizando um sistema de injeção de jacto de líquido. É preferido que a composição seja administrada na pele ou no tecido das mucosas do indivíduo. As preparações líquidas também podem ser administradas topicamente na pele ou no tecido das mucosas, ou proporcionadas como um pulverizado finamente dividido, adequado para administração respiratória ou pulmonar. Outros modos de administração incluem a administração oral, supositórios, e técnicas de administração transdérmica activas ou passivas. As composições de polinucleótidos podem ser administradas alternativamente *ex vivo* a células provenientes do indivíduo, após o que as células são reimplantadas no indivíduo. Por introdução no indivíduo, a sequência de ácidos nucleicos é expressa para proporcionar os péptidos das subunidades da exotoxina de ADP-ribosilação *in situ* numa quantidade suficiente para melhorar uma resposta imune contra o antigénio co-administrado no indivíduo vacinado. Esta resposta imune melhorada pode ser

caracterizada como uma resposta humoral melhorada (anticorpo), uma resposta celular melhorada (CTL), ou ser caracterizada como melhoradora das respostas tanto humoral como celular contra o antígeno co-administrado.

Em certas formas de realização preferidas, a resposta imune melhorada é caracterizada como uma resposta imune semelhante a Th1 (celular) aumentada contra o antígeno co-administrado, em vez de uma resposta semelhante a Th2. A este respeito, a resposta imune semelhante a Th1 aumentada pode ser qualificada por um ou mais dos seguintes: concentrações incrementadas de interferão- γ que produz os linfócitos T auxiliares CD4⁺ e/ou CTLs de CD8⁻; uma actividade aumentada de CTL específica para o antígeno; de concentrações aumentadas dos anticorpos específicos para o antígeno da subclasse associada tipicamente a imunidade celular (por exemplo, IgG2a).

É preferido que as composições adjuvantes de polinucleótidos da presente invenção sejam administradas em forma de partículas. Por exemplo, as composições podem ser administradas utilizando um dispositivo de administração de partículas tal como aqui descrito anteriormente em pormenor. Em certas formas de realização, as composições de polinucleótidos podem ser revestidas em partículas transportadoras do núcleo utilizando uma variedade de técnicas conhecidas na arte e administradas utilizando um método de administração mediado por partículas. As partículas transportadoras são seleccionadas de materiais que têm uma densidade adequada na gama de tamanhos de partículas utilizados tipicamente para administração intracelular a partir de um dispositivo de administração de partículas. O tamanho óptimo das partículas transportadoras vai, é claro, depender do diâmetro das células alvo.

Estes métodos podem alternativamente ser modificados por co-administração de componentes adicionais

ou auxiliares ao indivíduo. Por exemplo, pode ser administrada uma composição de vacina secundária, em que a composição secundária pode compreender uma vacina de ácido nucleico, ou uma composição de vacina secundária pode compreender uma vacina convencional tal como um vírus inteiro, vírus fraccionado, ou vacina subunitária. A composição de vacina secundária pode ser combinada com as composições dos péptidos das subunidades de exotoxina de ADP-ribosilação do polinucleótido, ou uma composição de vacina secundária pode ser administrada separadamente no mesmo sítio ou num sítio diferente, quer simultaneamente, sequencialmente, ou separada por um período de tempo significativo tal como num passo de reforço alguns dias depois de ter sido administrada a composição inicial.

Como anteriormente, a composição de vacina secundária e/ou outro componente auxiliar podem ser administrados por injeção utilizando uma seringa convencional, ou utilizando um sistema de administração mediado por partículas também tal como descrito anteriormente. A administração vai ser tipicamente por via subcutânea, epidérmica, intradérmica, intramucosa (por exemplo, nasal, rectal e/ou vaginal), intraperitoneal, intravenosa, oral ou intramuscular. Outros modos de administração incluem a administração tópica, oral e pulmonar, supositórios e aplicações transdérmicas. O tratamento da dosagem pode ser um programa de dose única ou um programa de doses múltiplas.

Parte Experimental

A seguir estão exemplos de formas de realização específicas para realização da presente invenção. Os exemplos são apresentados apenas para fins ilustrativos, e não têm a intenção de limitar o âmbito da presente invenção por qualquer forma.

Foram feitos esforços para assegurar a exactidão relativamente aos números utilizados (por exemplo, quantidades, temperaturas, etc.), mas deve admitir-se algum erro e desvio experimental

Exemplo 1

Desenvolvimento de Vectores de Expressão que Codificam as Subunidades A e B de CT.

Utilizou-se ADN genómico de *Vibrio cholerae* como um molde para as reacções em cadeia e polimerase (PCR) para gerar fragmentos de ADN que contêm as sequências de codificação de ambas as subunidades A e B da toxina da cólera (CT). Para a geração por PCR do fragmento que codifica a subunidade A (CTA), utilizou-se os seguintes iniciadores oligodesoxirribonucleótidos:

Iniciador 1: 5'-GGA GCT AGC AAT GAT GAT AAG TTA TAT CGG-3' (SEQ ID NO: 7); e

Iniciador 2: 5-CCT GGA TCC TCA TAA TTC ATC CTT AAT TCT-3' (SEQ ID NO: 8).

Para facilitar a inserção no vector de expressão, os Iniciadores 1 e 2 contêm sequências adicionais nas suas extremidades 5' (fora da região de homologia para a sequência de codificação de CTA) que incluem sítios de reconhecimento para *NheI* e *BamHI*, respectivamente. Os iniciadores 1 e 2 foram concebidos para conduzir à geração por PCR de um fragmento da sequência de codificação da subunidade A começando na posição 164 do nucleótido e terminando na posição 886 do nucleótido (Nº de ordem do GenBank #D30053). Esta região abrange a sequência de

codificação completa para o péptido da subunidade A matura mas não inclui a sequência que codifica o péptido de sinal bacteriano encontrado no terminal amino do péptido da pré-subunidade A.

Para a geração por PCR do fragmento que codifica a subunidade B (CTB), foram utilizados os seguintes iniciadores oligodesoxirribonucleótidos:

Iniciador 3: 5'-GGA GCT AGC ACA CCT CAA AAT ATT ACT GAT-3' (SEQ ID NO: 9); e

Iniciador 4: 5'-CCT GGA TCC TTA ATT TGC CAT ACT AAT TGC-3' (SEQ ID NO: 10).

Para facilitar a inserção no vector de expressão, os iniciadores 3 e 4 contêm sequências adicionais nas suas extremidades 5' (fora da região de homologia da sequência de codificação de CTB) que incluem sítios de reconhecimento de *NheI* e *BamHI*, respectivamente. Os iniciadores 3 e 4 foram concebidos para conduzir à geração por PCR de um fragmento da sequência de codificação da subunidade B começando na posição 946 do nucleótido e terminando na posição 1257 do nucleótido (Número de ordem do GenBank #D30053). Esta região abrange a sequência de codificação completa do péptido da subunidade B matura mas não inclui a sequência que codifica o péptido de sinal bacteriana encontrado no terminal amino do péptido da pré-subunidade B.

Para além das duas reacções de PCR descritas acima, foi efectuada uma terceira reacção de PCR para gerar uma sequência de codificação de uma forma modificada da subunidade A de CT em que foi eliminado o motivo KDEL de quatro aminoácidos C-terminal. Esta reacção envolveu a

utilização do Iniciador 1 (SEQ ID NO:7) e o seguinte iniciador:

Iniciador 5: 5-CCT GGA TCC TCA AAT TCT ATT ATG TGT ATC-3' (SEQ ID NO: 11).

Todas as reacções de PCR foram efectuadas utilizando Pfu Turbo ADN polimerase (obtida de Stratagene, La Jolla, CA) juntamente com o tampão de reacção de PCR fornecido pelo fabricante. As condições de PCR foram as seguintes: 95 °C durante 2 minutos, 30 ciclos de (95 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 2 minutos e 15 segundos, 72 °C durante 1 minuto), 72 °C durante 5 minutos, e manutenção a 4 °C.

Depois de completadas as reacções de PCR, os fragmentos sintetizados de novo foram digeridos com enzimas de *NheI* e *BamHI* para gerar extremidades coesivas, e os fragmentos individuais foram inseridos no vector de expressão pWRG7054 segmentado com *NheI* e *BamHI* resultando nos seguintes clones: pPJV2002, pPJV2003 e pPJV2006 que codificam CTA, CTB, e CTA modificado (menos KDEL), respectivamente. O vector de clonagem original pWRG7054 contém o promotor inicial imediato do citomegalovírus humano com a sequência do intrão A associada. Além disso, a sequência de codificação do péptido de sinal do activador do plasminogénio de tecidos humano está incluída em pWRG7054 para permitir a secreção por células de mamífero de qualquer proteína cuja sequência de codificação é inserida no sítio *NheI* na grelha de leitura apropriada. (Ver, por exemplo, Chapman et al. (1991) *Nuc. Acids Res.* 19:3979-3986, e Burke et al. (1986), *J. Biol. Chem.* 261:12574-12578).

Os mapas de restrição e as sequências completas dos

plasmídeos pPJV2002, pPJV2003 e pPJV2006 estão apresentados nas Figuras 1, 2, e 3, respectivamente.

Exemplo 2

Desenvolvimento de Vectores de Expressão que Codificam as Subunidades A e B de Enterotoxina Termolábil de *E. coli*.

O ADN genómico da estirpe E078:H11 de *E. coli* (American Type Culture Collection #35401) foi utilizado como um molde para as reacções em cadeia de polimerase para produzir fragmentos de ADN que contêm as sequências de codificação de ambas as subunidades A e B da enterotoxina termolábil (LT). Para a produção por PCR do fragmento que codifica a subunidade A, utilizou-se os seguintes dois iniciadores oligodesoxirribonucleótidos:

Iniciador 6: 5'-GGAGCT AGC AAT GGC GAC AAA TTA TAC CGT-3' 15 (SEQ ID NO:12); e

Iniciador 7: 5'-CCT GGA TCC TCA TAA TTC ATC CCG AAT TCT-3' (SEQ ID NO:13).

Para facilitar a inserção no vector de expressão, os iniciadores 6 e 7 contêm sequências adicionais nas suas extremidades 5' (fora da região de homologia para a sequência de codificação de LTA) que incluem sítios de reconhecimento de *NheI* e *BamHI*, respectivamente. Os iniciadores 6 e 7 foram concebidos para conduzir à produção por PCR de um fragmento da sequência de codificação da subunidade A com início na posição 145 do nucleótido e terminando na posição 867 do nucleótido da sequência encontrada na base de dados do GenBank (número de ordem #AB011677). Esta região abrange a sequência de codificação

completa do péptido da subunidade A matura mas não inclui a sequência que codifica o péptido do sinal bacteriano encontrado no terminal amino do péptido da pré-subunidade A.

Para a produção por PCR do fragmento que codifica a subunidade B, foram utilizados os seguintes iniciadores oligodesoxirribonucleótidos:

Iniciador 8: 5'-GGA GCT AGO GCT CCC CAG TCT ATT ACA GAA-3' (SEQ ID NO:14); e

Iniciador 9: 5'-OCT GGA TCC CTA GTT TTC CAT ACT GAT TGC-3' (SEQ ID NO:15).

Para facilitar a inserção no vector de expressão, os iniciadores 8 e 9 contêm sequências adicionais nas suas extremidades 5' (fora da região de homologia da sequência de codificação de LTB) que incluem sítios de reconhecimento para *NheI* e *BamHI*, respectivamente. Os iniciadores 8 e 9 foram concebidos para levar à produção por PCR de um fragmento da sequência de codificação da subunidade B com início na posição 927 do nucleótido e terminando na posição 1238 do nucleótido da sequência encontrada na base de dados do GenBank (Número de acesso #AB011677). Esta região abrange a sequência de codificação completa do péptido da subunidade B matura mas não inclui a sequência que codifica o péptido do sinal bacteriano encontrado no terminal amino do péptido da pré-subunidade B.

Além das duas reacções de PCR descritas anteriormente, foi realizada uma terceira reacção de PCR para produzir uma sequência de codificação de uma forma modificada da subunidade A de LT em que foi eliminado o motivo RDEL de quatro aminoácidos C-terminal. Esta reacção

envolve a utilização do iniciador 6 (SEQ ID NO:12) e o seguinte iniciador:

Iniciador 10: 5'-CCT GGA TCC TCA AAT TCT GTT ATA TAT GTC-3' (SEQ ID NO:16).

Todas as reacções de PCR foram efectuadas utilizando uma ADN polimerase Pfu Turbo (obtida de Stratagene, La Jolla, CA) juntamente com o tampão da reacção de PCR fornecido fabricante. As condições de PCR foram como se segue: 95 °C durante 2 min, 30 ciclos de (95 °C durante 1 min, 55 °C durante 2 min 15 s, 72 °C durante 1 min), 72 °C durante 5 min, e manutenção a 4 °C.

Depois de completadas as reacções de PCR, os fragmentos sintetizados de novo foram digeridos com *NheI* e *BamHI* para gerar extremidades coesivas e os fragmentos individuais foram inseridos no vector de expressão pWRG7054 clivado com *NheI* e *BamHI* resultando nos clones pPJV2004, pPJV2005, e pPJV2007 que codificam LTA, LTB, e LTA modificado (menos RDEL), respectivamente.

Os mapas de restrição e as sequências completas dos plasmídeos pPJV2004, pPJV2005, e pPJV2007 estão apresentados nas Figuras 4, 5 e 6, respectivamente.

Exemplo 3

Melhoramento da Resposta do Anticorpo Específica para o Antígeno de uma Vacina de ADN Utilizando Vectores Plasmídicos que Codificam CTA e/ou CTB.

Um vector de vacina de ADN que codifica a proteína M2 do vírus da gripe A foi utilizado para testar os efeitos adjuvantes dos vectores adjuvantes pPJV2002, pPJV2003, e

pPJV2006 no contexto da vacinação com ADN mediada por partículas. A vacinação com ADN mediada por partículas foi efectuada por precipitação do vector da vacina de ADN e de M2, com ou sem as diversas combinações dos vectores adjuvantes pPJV2002, pPJV2003, e pPJV2006, sobre partículas microscópicas de ouro e acelerando as partículas de ouro revestidas para a epiderme de murganhos utilizando o dispositivo de administração de partículas PowderJect® XR-1 (PowderJect Vaccines, Inc. Madison, WI).

Mais particularmente, a sequência do segmento #7 de ARN (que codifica a proteína M2) da estirpe A/Kagoshima/10/95 do vírus da GRIPE (H3N2) foi utilizada como um modelo para conceber iniciadores de PCR para facilitar a clonagem da sequência de codificação de M2 madura a partir de A/Sydney/5/97 (H3N2). A sequência de A/Kagoshima foi utilizada para conceber o iniciador uma vez que a sequência do segmento 7 do ARN de A/Sydney não foi ainda determinada. Esperava-se que o elevado grau de conservação entre as sequências de M2 facilitasse a utilização de iniciadores concebidos a partir de uma estirpe viral diferente.

Uma vez que M2 é traduzida de um ARN excisado, considerou-se necessário que as posições 27 a 714 do nucleótido na região de codificação do ARN do segmento 7 fossem excisadas. Em consequência, foi produzido e concebido um conjunto de iniciadores de PCR para gerar a sequência de codificação de M2 completa mas assegurar que o intrão foi eliminado de forma limpa do clone da sequência de codificação de M2 resultante. Os iniciadores de PCR utilizados para gerar o clone da sequência de codificação de M2 de comprimento total foram os seguintes:

Iniciador 11: 5'-CCC AAG CTT CCA CCA TGA GCC TTC TAA CCG

AGG TCG AAA CAC CTA TCA GAA ACG AAT GGG AGT GC-3' (SEQ ID NO:17); e

Iniciador 12: 5'-CCC GGA TCC TTA CTC CAG CTC TAT GCT G-3' (SEQ ID NO:18).

O iniciador 11 (SEQ ID NO:17) contém sequências adicionais na sua extremidade 5' que incluem um sítio de reconhecimento de *HindIII* e uma sequência consenso de Kozac para facilitar a iniciação da tradução de ARNm. Além disso, o iniciador 12 (SEQ ID NO:) contém sequências adicionais na sua extremidade 5' que incluem uma sequência de reconhecimento de *BamHI*.

O ARN viral foi isolado de uma amostra de A/Sydney/5/97 (H3N2) que se fez crescer em ovos de galinha embrionados. O processo de isolamento do ARN viral utilizou técnicas correntes conhecidas pelos especialistas na matéria. O ARN deste vírus foi utilizado numa reacção em cadeia de polimerase/transcriptase inversa (RT-PCR) utilizando um kit de RT-PCR obtido de Stratagene (La Jolla, CA). O passo de reacção de RT foi completado por adição de 5,9 µL de água isenta de RNase a um tubo de reacção. A este tubo adicionou-se 1,0 µL de tampão 10X MMLV-RT e 1,0 µL da mistura de dNTP do kit. Além disso, adicionou-se 1 µL de ARN de A/Sydney/5/97 e 0,6 µL (0,6 µg) do iniciador 11 (SEQ ID NO:17). A reacção foi aquecida a 65 °C durante 5 minutos para desnaturar o ARN, após o que se adicionou 0,5 µL da transcriptase inversa do kit. A reacção foi incubada a 37 °C durante 15 minutos para complementar o passo de transcrição inversa.

O passo de reacção de PCR foi completado pela adição dos seguintes componentes a um novo tubo de reacção: 40 µL de água; 5 µL de tampão ultra HF 10X do kit, 1,0 µL

da mistura de dNTP do kit; 1,0 µL do iniciador 11 (SEQ ID NO:17) (1.011g); 1,0 µL do iniciador 12 (SEQ ID NO:18) (1,0 µg); 1,0 µL da mistura de reacção da transcriptase inversa referida acima, e 1 µL da Turbo PFU polimerase do kit. A reacção de PCR foi realizada utilizando o seguinte esquema de incubação: 1 minuto a 95 °C, seguido por 30 ciclos de (30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 46 °C, 3 min a 68 °C), seguido por 10 minutos a 68 °C. Os produtos de PCR foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 2% que revela uma única banda de ADN com o tamanho esperado de aproximadamente 300 pb.

A banda de aproximadamente 300 pb foi isolada do gel e digerida com *HindIII* e *BamHI* para gerar as extremidades coesivas necessárias para a inserção no vector de expressão da vacina de ADN pWRG7077 (Schmaljohn et al. (1997) *J. Virol.* 71:9563-9569). O ADN de pWRG7077 foi digerido parcialmente com *HindIII* e completamente com *BamHI* para facilitar a inserção do suplemento de codificação de M2. O requisito de uma digestão de *HindIII* parcial do vector foi devido à presença de um segundo sitio *HindIII* no marcador de resistência a Kanamicina deste plasmídeo. O vector da vacina de ADN de M2 resultante foi designado pM2-FL. O vector pM2-FL contém o promotor inicial imediato do citomegalovírus humano (hCMV) e sua sequência do intrão A associado para activar a transcrição a partir da sequência de codificação de M2. Este vector também inclui uma sequência de poliadenilação do gene da hormona de crescimento bovina.

O plasmídeo de pM2-FL foi então precipitado em partículas de ouro de 2 micrometros como um vector único, ou vector misto mais amostras de vector adjuvante (isto é, o vector plasmídico M2 foi combinado com os vectores adjuvantes pPJV2002, pPJV2003, e/ou pPJV2006).

Especificamente, o ADN do plasmídeo (o vector de M2 único ou vector de M2 mais um ou mais vectores adjuvantes) foi misturado com partículas de ouro de 2 micrometros (Degussa, Lote 65-0) num tubo de centrífuga pequeno contendo 400 µL de espermidina 15 mM. A proporção de ADN para ouro variou de 2,5 µg de ADN por mg de ouro a 4,0 µg de ADN por mg de ouro, e um lote individual continha 26 mg de ouro. O ADN foi precipitado sobre as partículas de ouro por adição de 1/10 do volume de CaCl₂ a 10% durante a agitação contínua do tubo sobre num misturador rotativo. Os complexos de ADN-ouro foram lavados três vezes com etanol puro, e depois foram injectadas num tubo TEZFEL® (McMaster-Carr) alojado numa máquina de revestimento de tubos rotativos (PowderJect Vaccines, Inc., Madison WI) que reveste o interior do tubo com o complexo de ouro/ADN. Esta máquina de tubos rotativos está descrita na patente US N° 5733600. Ver também o pedido de patente PCT N° PCT/US95/00780 e as patentes US N°s 5780100; 5865796 e 5584807. Depois de completado o procedimento de revestimento, os tubos foram cortados em "cartuchos" com 0,5 polegadas adequados para carregar num dispositivo de administração de partículas.

As seguintes formulações de ADN-ouro foram produzidas para um ensaio do adjuvante de vacina de ADN em murganhos.

Formulação #1: vector de ADN de pM2-FL só, 2,5 µg de ADN por mg de ouro, 0,5 mg de ouro por cartucho;

Formulação #2: vector de ADN de pM2-FL precipitado num lote de ouro (2 µg de ADN de pM2-FL por mg de ouro), vectores de ADN de pPJV2002, e pPJV2003, coprecipitados sobre um segundo lote de ouro (1,75 µg de cada vector adjuvante de ADN por mg de ouro), os lotes de ouro foram misturados igualmente, 0,5 mg de ouro por cartucho;

Formulação #3: vector de ADN de pM2-FL, vectores de ADN de pPJV2002, e pPJV2003, todos coprecipitados sobre um só lote de ouro (2 µg de ADN de pM2-FL por mg de ouro, e 1 µg de cada um de pPJV2002 e pPJV2003 por mg de ouro), 0,5 mg de ouro por cartucho;

Formulação #4: vector de ADN de pM2-FL, vectores de ADN de pPJV2006, e pPJV2003, todos coprecipitados sobre um só lote de ouro (2 µg de ADN de pM2-FL por mg de ouro, e 1 µg de cada um do ADN de pPJV2006 e pPJV2003 por mg de ouro), 0,5 mg de ouro por cartucho;

Formulação #5: vector de ADN de pM2-FL e pPJV2002 coprecipitados sobre um só lote de ouro (2 µg de ADN de pM2-FL por mg de ouro, e 1 µg de ADN de pPJV2002 por mg de ouro), 0,5 mg de ouro por cartucho.

Formulação #6: vector de ADN de pM2-FL, e pPJV2003 coprecipitados sobre um só lote de ouro (2 µg de ADN de pM2-FL por mg de ouro, e 1 µg de ADN de pPJV2003 por mg de ouro), 0,5 mg de ouro por cartucho.

Estas formulações de vacina de ADN foram então administradas a seis grupos de murganhos como se segue. Cada grupo experimental continha 7 animais e cada animal recebeu duas imunizações com a formulação respectiva com um período de descanso de 4 semanas entre as imunizações. Cada imunização consistiu em duas administrações em série na epiderme abdominal (um cartucho por administração) utilizando o dispositivo de administração de partículas PowderJect® XR-1 (PowderJect Vaccines, Inc. Madison, WI) a uma pressão de hélio de 400 psi. Amostras de soro foram colhidas 4 semanas após a imunização primária (imediatamente antes do reforço) e duas semanas depois da

segunda imunização ou imunização de reforço.

As amostra de soro individuais foram ensaiadas quanto às respostas do anticorpo específico de M2 utilizando um ensaio ELISA em que placas com 96 poços foram pré-revestidas com um péptido sintético M2 que consiste na sequência seguinte: SLLTEVETPIRNEWECR (SEC ID NO:19). As placas de ELISA foram revestidas com o péptido M2 de um dia para o outro a 4 °C utilizando o péptido em soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS) numa concentração de 1 µg/mL. No dia seguinte, as placas foram bloqueadas com leite em pó magro a 5% em PBS durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram depois lavadas três vezes com tampão de lavagem (soro fisiológico tamponado com Tris 10 mM, Brij-35 a 0,1%). As amostras de soro diluídas foram então adicionadas aos poços e as placas foram incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e adicionou-se 100 µL de um anticorpo secundário e as placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente. O anticorpo secundário consistiu num anticorpo marcado com biotina de cabra anti-IgG de murganho (H+L) (Southern Biotechnology) que foi diluído 1:8000 em BSA a 1%/PBS/Tween-20 a 0,1%. As placas foram então lavadas três vezes, e adicionou-se um conjugado de estreptavidina-peroxidase de rábano (Southern Biotechnology) diluído 1:8000 em PBS/Tween-25 a 0,1% e a placa foi incubada durante 1 hora à temperatura ambiente. Após três lavagens adicionais, adicionou-se 100 µL do substrato TMB (Bio Rad, Hercules, CA) e deixou-se que o desenvolvimento de cor decorresse durante 30 minutos à temperatura ambiente. O desenvolvimento de cor foi parado pela adição de H₂SO₄ 1 N e as placas foram lidas a 450 nm. As concentrações das diluições no ponto final foram determinadas por identificação da diluição mais elevada do soro que ainda produziu um valor de absorvência que era

duas vezes o valor da absorvência de fundo obtido utilizando uma amostra de controlo não imune.

As concentrações do anticorpo do ponto final para os animais individuais em cada grupo e as médias geométricas das concentrações para cada grupo experimental estão apresentadas no Quadro 1 a seguir.

Quadro 1

Formulação #	Concentrações individuais	Média geométrica da concentração
1	24.300 24.300 72.900 218.700 218.700 218.700 218.700	99.781
2	72.900 72.900 218.700 218.700 218.700 656.100	186.934
3	24.300 72.900 72.900 218.700 656.100 656.100 656.100	186.934
4	24.300 218.700 656.100	350.211

	656.100 656.100 656.100 656.100 656.100	
5	----* 72.900 218.700 218.700 218.700 656.100 656.100	262.645
6	24.300 72.900 218.700 218.700 1.968.300 1.968.300 5.904.900	409.722
* (morreu)		

Como se pode observar, todos os grupos experimentais imunizados com uma formulação contendo um ou mais dos vectores adjuvantes que codificam CT (Formulações #2-6) apresentaram uma média geométrica da concentração aumentada após a imunização de reforço em relação aos animais de controlo imunizados só com o vector M2 (Formulação #1).

Exemplo 4

Melhoramento das Respostas Celulares Específicas de Antígenos a uma Vacina de ADN que Codifica os Antígenos de Superfície da Hepatite B (HBsAg) Utilizando os Vectores Plasmídicos Adjuvantes que Codificam os Péptidos das Subunidades CT-A e CT-B.

Foi construído um plasmídeo do vector dos antígenos de superfície da hepatite B (HBsAg) como se segue. Para produzir a região de codificação de HBsAg, a construção pAM6 (obtida de American Type Culture Collection "ATCC") foi cortada com *NcoI* e tratada com uma nuclease de feijão mungo para remover o codão de partida do antígeno X. O ADN resultante foi então cortado com *BamHI* e tratado com T4 ADN polimerase para introduzir extremidades rombas no ADN e criar uma cassette de expressão de HBsAg. A cassette de expressão de HBsAg está presente no fragmento de 1,2 kB. A construção plasmídica pPJV7077 (Schmaljohn *et al.* (1997) *J. Virol.* 71:9563-9569) que contém o promotor inicial imediato de CMV humano de comprimento total (estirpe Towne) (com intensificador) foi cortada com *HindIII* e *BglIII*, e depois tratada com T4 ADN polimerase e fosfatase alcalina de vitelo para criar ADN com extremidades rombas, e a cassette de expressão de HBsAg foi ligada ao plasmídeo para a construção pWRG7128.

O plasmídeo pWRG7128 foi precipitado em partículas de ouro seguindo o procedimento descrito no Exemplo 3 acima, utilizando novamente 2 µg de ADN por mg de ouro. Os vectores plasmídicos adjuvantes que exprimem os genes das subunidades CTA e CTB (pPJV2002 e pPJV2003, respectivamente) foram misturados um com o outro e precipitados em partículas de ouro estando cada plasmídeo presente a 1 µg de ADN por mg de ouro de tal modo que a quantidade total também era de 2 µg de ADN por mg de ouro. As partículas de ouro revestidas com pWRG7128 e as revestidas com pPJV2002 e pPJV2003 foram misturadas 1:1 e depois carregadas num tubo TEFZEL® tal como acima. Para imunização, comprimentos de 0,5 polegadas de tubo que representam 1 µg de ADN (0,5 µg de plasmídeo pWRG7128 e 0,25 µg de cada um dos plasmídeos pPJV2002 e pPJV2003)

foram administrados na epiderme de murganhos Balb/c utilizando o dispositivo de administração de partículas PowderJect® XR-1 utilizando as mesmas condições de administração descritas acima no Exemplo 3. Para os controlos, os murganhos foram imunizados com partículas de ouro revestidas só com pWRG7128 (1 µg de ADN/0,5 mg de ouro por administração). Os murganhos (4 por grupo experimental) foram imunizados e receberam um reforço às 4 semanas, depois foram sacrificados às 2 semanas após o reforço. As respostas imunes foram avaliadas para verificar os níveis de anticorpos séricos por ELISA. Além disso, as respostas imunes celulares foram determinadas utilizando um ensaio ELISPOT para quantificar a secreção de IFN-γ específica de CD8.

Amostras de soro de murganhos individuais foram ensaiadas quanto aos anticorpos específicos de HBsAg utilizando um ensaio ELISA. Para o ELISA, placas de microtitulação Falcon Pro Bind foram revestidas de um dia para o outro a 4 °C com HBsAg purificado (BioDesign) a 0,1 mg por cavidade em PBS (soro fisiológico tamponado com fosfato, BioWhittaker). As placas foram bloqueadas durante 1 hora à temperatura ambiente (TA) com leite seco a 5%/PBS e depois lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (soro fisiológico tamponado com Tris 10 mM, Brij-35 a 0,1%), e as amostras de soro diluídas em tampão de diluição (leite seco a 2%/PBS/Tween 20 a 0,05%) foram adicionadas à placa e incubadas durante 2 horas à TA. As placas foram lavadas 3 vezes e adicionou-se à placa um anticorpo de cabra anti-murganho biotinilado (Southern Biotechnology) diluído 1:8000 em tampão de diluição e incubou-se durante 1 hora à TA. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes, após o que se adicionou um conjugado de estreptavidina-peroxidase de rábano (Southern Biotechnology) diluído 1:8000 em PBS e a placa foi incubada durante mais 1 hora à

TA. Após três lavagens adicionais, as placas foram lavadas 3 vezes, depois adicionou-se uma solução do substrato TMB (BioRad) e a reacção foi parada com H₂SO₄ 1 N após 30 minutos. A densidade óptica foi lida a 450 nm. As concentrações no ponto final foram calculadas por comparação das amostras com um padrão de concentração conhecida.

Para os ensaios imunes celulares, suspensões de células individuais de esplenócitos dos baços dos animais imunizados foram cultivadas *in vitro* na presença de um péptido correspondente a um epitopo de CD8 conhecido em murganhos Balb/c. O péptido foi dissolvido em DMSO (10 mg/mL) e diluído para 10 µg/mL em cultura. A sequência do péptido era IPQSLDSWWTSL (SEQ ID NO:20).

Para os ensaios ELISPOT para IFN- γ , as placas de filtração por membrana Multiscreen da Millipore foram revestidas com 50 µL de 15 µg/mL de anti-soro anti-IFN- γ (Pharmingen) em tampão de carbonato 0,1 M estéril (pH 9,6) de um dia para o outro a 4 °C. As placas foram lavadas 6 vezes com PBS estéril e depois bloqueadas com o meio de cultura de tecidos que contém soro fetal de bovino (FBS) a 10% durante 1-2 h à TA. O meio foi removido e as células de baço distribuídas pelos poços com um total de 1×10^6 células por poço. Para os poços a que foram adicionadas menos de 1×10^6 células dos animais imunizados, as células de animais nunca antes submetidos à experiência foram utilizadas para levar o total a 1×10^6 . As células foram incubadas de um dia para o outro numa incubadora de cultura de tecidos na presença do péptido tal como descrito acima. As placas foram então lavadas 2 vezes com PBS e 1 vez com água destilada. Isto foi seguido por 3 lavagens com PBS. Adicionou-se um anticorpo monoclonal anti IFN- γ biotinilado

(Pharmingen) à placa (50 µL de uma solução de 1 µg/mL em PBS) e incubado durante 2 horas à TA. As placas foram lavadas 6 vezes com PBS após o que se adicionou 50 µL de um conjugado de estreptavidina-fosfatase alcalina (1:1000 em PBS, Pharmingen) e incubou-se durante 2 horas à TA. As placas foram lavadas 6 vezes com PBS e adicionou-se um substrato corado da fosfatase alcalina (BioRad) e deixou-se que a reacção decorresse até aparecerem manchas escuras. A reacção foi parada por lavagem com água 3 vezes. As placas foram secas ao ar e as manchas contadas ao microscópio.

Para os ensaios de ELISA para IFN- γ , as células foram cultivadas de um dia para o outro em placas de cultura de tecidos com 96 poços de fundo redondo na presença do péptido. As amostras do sobrenadante foram colhidas e utilizadas para a determinação dos níveis de IFN- γ . Placas de fixação elevada (Costar) foram revestidas com 100 µL de 0,5 µg/mL de anticorpo anti-IFN- γ de murganho (Pharmingen) em tampão de bicarbonato pH 9,6. As placas foram bloqueadas durante 1 h à TA com meio de cultura de tecidos contendo FBS a 10% e depois lavadas 3 vezes com um tampão de lavagem de TBS. Amostras do sobrenadante obtidas das células cultivadas foram diluídas em meio de cultura de tecidos e aplicadas na placa e incubadas durante 2 h à TA. As placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e um anticorpo secundário (0,5 µg/mL de anti-IFN- γ de murganho de rato biotinilado em PBS, Pharmingen) foi adicionado às placas e incubadas durante 1 h à TA. As placas foram lavadas 3 vezes, e adicionou-se um conjugado de estreptavidina-peroxidase de rábano (1:2000 em PBS, Southern Biotechnology) durante 1 h à TA. As placas foram lavadas 3 vezes, depois adicionou-se uma solução do substrato TMB (BioRad) e a reacção foi parada com H₂SO₄ 1 N. A densidade óptica foi lida a 450 nm.

Os resultados de ELISA são apresentados a seguir no Quadro 2.

Quadro 2

Formulação	Concentrações individuais	Concentrações médias
pWRG7128	40.000 84.000 41.000 54.000	55.000
pWRG7128, pPJV2002 e pPJV2003	28.000 14.000 27.000 23.000	23.000

Como se pode observar, verificou-se que os níveis de anticorpo nos murganhos de controlo imunizados só com pWRG7128 são mais elevados do que nos imunizados com pWRG7128 em associação com os vectores adjuvantes de CT (pPJV2002 e pPJV2003). A concentração média do ponto final para os animais de controlo foi de 55.000, enquanto que a concentração média nos animais imunizados com a formulação adjuvante foi de 23.000. Contudo, o grupo que recebeu a formulação adjuvantada realmente recebeu 1/2 da quantidade de pWRG7128 que os controlos, o que pode explicar a redução das concentrações de anticorpo.

As respostas imunes celulares medidas nos dois grupos de murganhos indicaram um melhoramento significativo das respostas celulares pelos vectores adjuvantes de CT. Mais especificamente, os resultados do ensaio de ELISA para IFN- γ específico para CD8 estão apresentados a seguir no Quadro 3.

Quadro 3

ELISA para IFN-γ			
Formulação	Número de células/poço		
	$1,0 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$	$0,1 \times 10^6$
pWRG7128	0,77	0,213	0,001
	0,828	0,121	0,027
	1,35	0,312	0,006
	1,25	0,323	0,007
	1,05	0,242	0,01
pWRG7128, pPJV2002 e pPJV2003	1,96	1,19	0,079
	2,30	1,70	0,263
	2,20	1,83	0,377
	2,44	2,33	0,898
(Média)	2,23	1,76	0,404

Neste ensaio de ELISA para IFN- γ , o número de células por poço representa o número de células recuperadas dos animais imunizados aplicadas em placas por poço. O número de células por poço é constante (por exemplo, 1×10^6) e é suplementado com células de animais não anteriormente submetidos a experiências. Os valores são as leituras da OD medidas a 450 nm. Os valores da OD mais elevados no ELISA encontrados para as células de murganhos tratadas com a formulação adjuvante de CT são indicativos de uma quantidade maior de IFN- γ segregada por estas células em resposta ao antigénio. As células de animais não anteriormente submetidos a experiências não deram um valor de OD mensurável no ELISA para IFN- γ .

Os resultados do ensaio ELISPOT para IFN- γ específico para CD8 são apresentados a seguir no Quadro 4.

Quadro 4

ELISPOT para IFN- γ	
Formulação	Número de células positivas/ 1×10^6 células
pWRG728	510
	410
	530
	590
(Média)	510
pWRG7128, pPJV2002, e pPJV2003	1.480
	2.300
	2.500
	3.500
(Média)	2.445

Neste ensaio de ELISPOT para IFN- γ , os números são a média de poços em duplicado e correspondem ao número de células positivas por 1×10^6 células. As células dos murganhos que não foram anteriormente submetidos a experiências não produziram quaisquer manchas neste ensaio ELISPOT. Além disso, o maior o número de ELISPOTs encontradas nos animais tratados com a formulação adjuvante de CT indica uma resposta superior quando se compara com os animais que receberam só o antígeno (pWRG7128).

Os dados apresentados acima demonstram que as novas composições adjuvantes da presente invenção têm uma aptidão potente para melhorar as respostas imunes celulares a um a um antígeno co-administrado, neste caso um HBsAg expresso a partir de uma vacina de ADN.

Exemplo 5

Melhoramento das Respostas Imunes Humoral e Celular
ao Antígeno gp120 de VIH-1 Utilizando a Administração

Simultânea de um Vector do Antígeno de gp120 e dos
Vectores Adjuvantes de CTA/CTB.

Um vector plasmídico que codifica gp120 de VIH-1 foi construído como se segue. O vector foi construído partindo de um suporte do plasmídeo Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA), o promotor inicial imediato do citomegalovírus humano (hCMV) (Fuller et al. (1994) *Aids Res. Hum Retroviruses* 10:1433) e o sítio de poliadenilação final do vírus SV40. O promotor hCMV está contido num fragmento *AccII* de 619 pares de bases (pb) que se estende 522 pb a montante e 96 pares de bases a jusante do sítio de início da transcrição inicial imediata. A sequência de poliadenilação final do vírus SV40 está contida num fragmento de *BamHI-BglIII* de 800 pb derivado de pSV2dhfr (anteriormente disponível de Bethesda Research Laboratories, catálogo #5369 SS). Inicialmente, foi construído um plasmídeo que codifica gp160 de VIH-1, designado "pC-Env". Este plasmídeo contém um fragmento *KpnI-XhoI* de 2565 pb de LAV-1BRU (Nº de ordem do ATCC 53069, Nº de ordem do GenBank K02013), que começa na sequência que codifica a posição #4 dos aminoácidos do terminal amino de gp160 maduro. O fragmento da sequência de codificação *env* foi colocado imediatamente a jusante, e fundido em grelha com um fragmento sintético de 160 pb que codifica o péptido de sinal da glicoproteína D (gD) do vírus do herpes simplex e nenhuns aminoácidos do terminal amino de gD madura tal como descrito (Fuller et al. (1994) *Aids Res. Hum Retroviruses* 10:1433).

O plasmídeo que codifica gp120 de VIH-1, aqui designado "pCIA-Env/T", foi depois construído como se segue. O plasmídeo pCIA-Env/T codifica uma forma truncada de gp160 de VIH-1, e é idêntico à construção pC-Env excepto que as sequências de codificação de *env* estão truncadas no

sítio *HindIII* na posição 8188 do nucleótido. Isto resulta num produto de tradução de gp 160 truncado com o ponto de truncagem residente nos resíduos do aminoácido 128 a jusante do sítio de processamento de gp 120/gp41.

Um segundo vector do plasmídeo que codifica VIH-1 rev, aqui designado "pC-rev", foi construído como se segue. Este vector contém três regiões descontínuas do provírus LAV-1BRU (posições 678-1085, 5821-6379 e 8188-8944 do nucleótido) colocadas directamente entre o promotor de hCMV e a sequência de poliadenilação final do vírus SV40 tal como descrito anteriormente. As três regiões descontínuas contêm o doador de excisão 5' principal, o primeiro exão do gene rev e o segundo exão do gene rev, respectivamente.

Uma terceira construção de vector plasmídico designada "pWRG7054" foi utilizada como um controlo do vector vazio no estudo. A construção pWRG7054 contém uma região de codificação SIV *nef*, o promotor de hCMV imediatamente inicial com a região do Intrão A, uma sequência líder de TPA e a sequência de poliadenilação da hormona do crescimento bovina. A construção do plasmídeo pWRG7054 está aqui descrita adiante no Exemplo 6.

As seguintes formulações de ADN-ouro foram produzidas para um ensaio de adjuvante de vacina de ADN em murganhos.

Formulação #1: Controlo do vector vazio (pWRG7054 sem a inserção gp120), 2,5 µg de ADN por mg de ouro, 0,5 mg de ouro por cartucho;

Formulação #2: Controlo do vector vazio (pWRG7054), o vector de ADN de gp120 (pCIA-EnvT), e o vector de ADN de rev (pC-rev) (para permitir a expressão da molécula de

gp120 de VIH-1), todos coprecipitados num único lote de ouro (1,25 µg de cada um de ADN de pWRG7054 e ADN de pCIA-EnvT por mg de ouro, e 0,125 µg de pC-rev por mg de ouro), 0,5 mg de ouro por cartucho;

Formulação #3: Controlo do vector vazio (pWRG7054), os vectores de ADN de CTA (pPJV2002) e de CTB (pPJV2003) todos coprecipitados num único lote de ouro (1,25 µg de ADN de pWRG7054 por mg de ouro e 1 µg de cada um de pPJV2002 e pPJV2003 por mg de ouro), 0,5 mg de ouro por cartucho;

Formulação #4: O vector de ADN de gp120 (pCIA-EnvT), o vector de ADN de VIH-1 rev (pC-rev), os vectores de CTA (pPJV2002) e de CTB (pPJV2003) todos coprecipitados num único lote de ouro (1,25 µg de ADN de pCIA-EnvT por mg de ouro, 0,125 µg de ADN de pC-rev por mg de ouro, e 1 µg de cada um do ADN de pPJV2002 e de pPJV2003 por mg de ouro), 0,5 mg de ouro por cartucho;

Formulação #5: O vector de ADN de gp120 (pCIA-EnvT), o vector de ADN de VIH-1 rev (pC-rev), os vectores de ADN de CTA -KDEL (pPJV2006) e de CTB (pPJV2003) todos coprecipitados num único lote de ouro (1,25 µg de ADN de pCIA-EnvT por mg de ouro, 0,125 µg de ADN de pC-rev por mg de ouro, e 1 µg de cada um do ADN de pPJV2006 e de pPJV2003 por mg de ouro), 0,5 mg de ouro por cartucho.

Os vectores plasmídicos pWRG7054, pCIA-EnvT, pC-rev, pPJV2002, pPJV2003, e pPJV2006 foram precipitados em partículas de ouro seguindo os procedimentos descritos no Exemplo 3 acima, utilizando de novo 2 µg de ADN por mg de ouro. As partículas de ouro revestidas foram carregadas num tubo TEZFELO®, utilizando novamente os procedimentos descritos no Exemplo 3 acima. Para imunização, dois comprimentos de 0,5 polegadas de tubo foram utilizados para

administrar uma carga total de 1,0 mg de ouro na epiderme de murganhos Balb/c fêmeas com 5-6 semanas utilizando um dispositivo de administração de partículas funcionando nas mesmas condições de administração que as descritas acima no Exemplo 3 (400 psi de hélio).

Cada um dos cinco grupos experimentais (um por cada formulação de vacina de ADN) consistiu em 4 animais, e cada animal recebeu imunizações primária e de reforço com as suas respectivas formulações, sincronizadas às 0 e 5 semanas. Cada imunização consistiu em duas administrações em série na epiderme abdominal (um cartucho por administração) utilizando um dispositivo de administração de partículas PowderJect® XR-1 (PowderJect Vaccines, Inc. Madison, WI).

As respostas do anticorpo do soro ao antigénio gp120 de VIH foram testadas utilizando um ensaio de ELISA em espécimes colhidos na semana 5 e na semana 6,5 (após a imunização primária e após o reforço, respectivamente). Para o ELISA, placas EIA de fixação elevada da Costar foram revestidas com 0,3 µg/poço do gp120 de VIH recombinante (Intracel) em 50 µL de PBS por incubação de um dia para o outro a 4 °C. As placas foram lavadas três vezes e bloqueadas com BSA a 2% durante 2 horas à temperatura ambiente. As diluições em série do soro foram adicionadas às placas revestidas, e incubadas a 37 °C durante uma hora. Após a lavagem, as placas foram incubadas com uma diluição 1:1500 de fosfatase alcalina conjugada com anti-IgG de murganho de cabra (H+L) (BioRad), seguida pelo desenvolvimento de cor com fosfato de p-nitrofenilo (PNPP) (BioRad) e leitura da OD a 405 nm.

Os resultados de ELISA estão apresentados na Figura 7. Como se pode observar, houve um aumento de

aproximadamente 20 vezes das respostas imunes específicas para gp120 nos grupos que receberam vectores adjuvantes (Formulação #4 contendo os vectores pPJV2002 e pPJV2003, ou Formulação #5 contendo os vectores pPJV2006 e pPJV2003) em associação com o vector gp120 em comparação com o grupo que recebeu o vector gp120 sem adjuvante (Formulação #2, pCIA-EnvT).

Após a recolha de amostras do soro depois do reforço, os animais foram sacrificados e foram recolhidos os baços de cada murgancho. Os esplenócitos foram isolados por trituração dos baços, fazendo passar as células através de um tamiz celular de 70 μm , e lisando os eritrócitos com um tampão de lise ACK (BioWhittaker). Os esplenócitos foram lavados três vezes com RPMI-FCS a 5% e ressuspensos numa concentração de 1×10^7 células/mL em RPMI-FCS a 10% suplementado com antibióticos, piruvato de sódio, aminoácidos não essenciais.

A quantidade de IFN- γ específica para o antigénio segregada pelos esplenócitos foi determinada utilizando um ELISA *in situ*. As placas de fixação elevada da Costar foram revestidas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpo monoclonal de captura anti-IFN-gama de murgancho (mPAB) (Pharmingen, San Diego, CA) em 50 μL de tampão de bicarbonato 0,1 M (pH 9,6). Depois da incubação de um dia para o outro a 4 °C, os poços foram lavados 5 vezes com PBS-Tween 20 a 0,05% e bloqueados com 200 μL de meio R10 completo à temperatura ambiente durante 2 horas. 1×10^6 esplenócitos foram adicionados a cada poço e foram estimulados só em meio (controlo negativo), ou em meio com 1 $\mu\text{g/mL}$ de um péptido gp120 de VIH que tem a seguinte sequência: RIQRGPGRAFVITGK (SEQ ID NO:21). Após 24 horas de incubação a 37 °C em CO₂ a 5%, as placas foram lavadas 2 vezes com água desionizada (DI) para

lisar as células, depois lavadas 3 vezes com PBS-Tween 20 a 0,05%, e incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com 50 µL por poço de 1 µg/mL de mAb de detecção de IFN- γ anti-murganho biotinilado (Pharmingen). As placas foram então lavadas 5 vezes e incubadas durante 1 hora com 50 µL por poço de uma diluição 1:8000 de solução de estreptavidina-peroxidase de rábano (HRP) (Southern Biotechnology). As placas foram novamente lavadas 5 vezes e o desenvolvimento colorimétrico foi efectuado pela adição do substrato TMB (BioRad, Hercules, CA) durante 30 minutos à temperatura ambiente. A reacção foi parada pela adição de ácido sulfúrico 1 N. A absorvência a 450 nm foi lida com um leitor de placas óptico.

Os resultados deste estudo estão apresentados na Figura 8. Esta Figura mostra o nível relativo da produção de IFN- γ específico para o antigénio nos 5 diferentes grupos de teste da vacina que recebem as formulações descritas acima (Formulações # 1-5). O que é importante, os dois grupos de imunização que receberam o vector gp120 (pCIA-EnvT) em associação com os vectores adjuvantes de CT (isto é, a Formulação #4 que contém os vectores pPJV2002 e pPJV2003, e a Formulação #5 que contém os vectores pP072006 e pPJV2003) apresentaram níveis de produção de IFN- γ significativamente mais elevados de que o grupo de gp120 sem adjuvante (a Formulação #2 que contém o controlo do vector vazio e pCIA-EnvT), ($P < 0,000001$ e $P = 0,0068$, respectivamente). Estes dados demonstram a aptidão das presentes associações adjuvantes do vector de CT para aumentar acentuadamente a imunidade celular específica para o antigénio para um antigénio de VIH num modelo animal.

Para além de um aumento do nível de produção de IFN- γ , o número de esplenócitos específicos para o péptido gp120 de VIH que segregam IFN- γ também foi acentuadamente

aumentado, como determinado por um método ELISPOT. No ensaio ELISPOT, as placas de nitrocelulose (Millipore) foram revestidas com um anticorpo de captura de IFN- γ , lavadas, e bloqueadas tal como descrito anteriormente para ELISA *in situ* de IFN- γ das células auxiliares T. Os esplenócitos foram fixados a poços pré-revestidos com um número de células de entrada de 1×10^6 células/poço, e estimuladas em meio só (controlo negativo) ou num meio que contém 1 $\mu\text{g/mL}$ de um péptido que contém o epitopo CTL de gp120 de VIH imunodominante e que tem a seguinte sequência: RGPGRAFTI (SEQ ID NO:22). As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C em CO₂ a 5%, lavadas 2 vezes com água DI, 3 vezes com PBS, e incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com 50 μL por poço de 1 $\mu\text{g/mL}$ de mAb de detecção de IFN- γ anti-murganho biotinilado (Pharmingen). As placas foram então lavadas 5 vezes e incubadas durante 1 hora com 50 μL por poço de uma diluição 1:1000 de solução de estreptavidina-fosfatase alcalina (ALP) (Mabtech). As placas foram lavadas novamente 5 vezes e o desenvolvimento colorimétrico foi efectuado pela adição do substrato da membrana ALP (BioRad, Hercules, CA) até se formarem manchas (2-30 minutos, temperatura ambiente). A reacção foi parada por lavagem com água DI, e as placas foram secas com ar de um dia para o outro. As manchas foram contadas ao microscópio 40X. Só as manchas grandes com bordos felpudos foram pontuadas como células que formam manchas ("spot forming cells", SFC).

Os resultados deste ensaio ELISPOT estão apresentados na Figura 9 que mostra os níveis relativos de esplenócitos produtores de IFN- γ nos 5 diferentes grupos de teste da vacina (que receberam as formulações #1-5, respectivamente). O que é importante, os dois grupos de imunização que receberam o vector gp120 em associação com

os vectores adjuvantes de CT (isto é, a Formulação #4 que contém os vectores pPJV2002 e pPJV2003 e a Formulação #5 que contém os vectores pPJV2006 e pPJV2003) apresentaram números significativamente mais elevados de células produtoras de IFN- γ do que o grupo de gp120 sem adjuvante (Formulação #2 que contém o controlo do vector vazio e pCIA-EnvT), ($P < 0,000001$ e $P = 0,0032$, respectivamente). Estes dados demonstram a capacidade das presentes associações de adjuvante de CT de aumentar acentuadamente a imunidade celular específica para o antigénio contra um antigénio gp120 de VIH co-administrado num modelo animal. Além disso, a produção aumentada de IFN- γ observada nestes estudos indica que a utilização das associações do vector adjuvante de CT da presente invenção proporciona uma resposta imune robusta semelhante a Th1 nos animais imunizados.

Exemplo 6

Melhoramento das Respostas de Anticorpos aos Antígenos de Superfície e do Núcleo de Hepatite B Utilizando a Administração Simultânea de um Vector que Codifica HBcAg e HbsAg com os Vectores Adjuvantes de CTA/CTB.

Um plasmídeo do vector que contém as sequências de codificação tanto do antigénio do núcleo da hepatite B (HBcAg) como do antigénio de superfície da hepatite B (HBsAg) foi construído como se segue. As sequências de codificação de HBcAg e HBsAg foram obtidas ambas do clone pAM6 de HBV (Nº de ordem ATCC 45020). Para gerar a região de codificação de HBsAg, uma construção de pAM6 foi cortada com *NcoI* e tratada com uma nuclease de feijão mungo para remover o codão de partida do antigénio X. O ADN resultante foi cortado então com *BamHI* e tratado com uma T4 ADN

polimerase para cortar o ADN com extremidades rombas e criar uma cassette de expressão de HBsAg. A cassette de expressão de HBsAg está presente no fragmento de 1,2 kB. A construção do plasmídeo pPJV7077 (Schmaljohn et al. (1997) *J. Virol.* 71:9563-9569) que contém o promotor inicial imediato de CMV humano de comprimento total (estirpe Towne) (com intensificador) foi cortado com *HindIII* e *BglII*, e depois tratado com uma T4 ADN polimerase e fosfatase alcalina de vitelo para criar o ADN com extremidades rombas, e a cassette de expressão de HBsAg foi ligada ao plasmídeo para dar a construção de pWRG7128.

Para gerar a região de codificação de HBcAg, a construção de pAM6 foi cortada para criar uma cassette de expressão de HBcAg, após o que a sequência de HbcAg foi truncada por mutagénese direccionada ao sítio para remover a região rica em arginina C-terminal da partícula do antígeno do núcleo (deleção essa que não interfere com a formação de partículas). A sequência de HBcAg truncada foi então clonada numa construção de plasmídeo contendo o promotor do factor de alongamento humano ("hELF", Mizushima et al. (1990) *Nucl. Acids. Res.* 18:5322) para proporcionar uma construção do vector HBcAg.

As cassetes de expressão que contém: (a) o intensificador/promotor de CMV, a região não traduzida 5'-Intrão A, e o péptido de sinal do activador do plasminogénio de tecidos humano (hTPA), ("CMV-IA-TPA"), ou (b) a sequência poliA da hormona do crescimento bovina (bGHpA), foram obtidos cada um da construção do vector JW4303 (oferta do Dr. Harriet Robinson, Universidade de Massachusetts) e inseridos num suporte plasmídico. A construção resultante foi cortada com *NheI*, cheia com polimerase e depois cortada com *BamHI* para gerar um fragmento do vector que contém a origem de replicação

pUC19, o gene de resistência à ampicilina e a sequência de bGHpA. O suporte plasmídico foi cortado uma segunda vez com *SalI*, cheio com polimerase, e cortado com *BamHI* para libertar um fragmento do vector que contém o fragmento do vector de CMV-IA-TPA. Os dois fragmentos do vector foram ligados conjuntamente para dar uma construção designada pWRG7054.

A construção pWRG7054 foi cortada com *NheI*, cheia com polimerase, e cortada com *BamHI* para produzir um fragmento do vector. A construção do vector de HBcAg foi cortada com *NcoI*, cheia com polimerase, e cortada com *BamHI* para produzir um fragmento de inserção. Os dois fragmentos foram então ligados conjuntamente para dar uma construção designada pWRG7063.

O PEL-Bos foi cortado com *EcoRI* e desfosforilado com fosfatase intestinal de vitelo para produzir um fragmento de vector. O plasmídeo pWRG7063 foi cortado com *HindIII*, cheio com polimerase, e cortado com *EcoRI* para produzir um fragmento de inserção que contém o péptido de sinal de hTPA, a sequência do antígeno de HBcAg e a região bGHpA. Estes dois fragmentos foram ligados conjuntamente para proporcionar uma construção designada pWRG7145.

A construção pWRG7128 foi cortada com *EcoRI* e desfosforilada com fosfatase intestinal de vitelo para produzir um fragmento do vector que contém a região de codificação de HBsAg sob o controlo transcricional do promotor hCMV. A construção pWRG7145 foi cortada com *MfeI* e *EcoRI* para produzir um fragmento de inserção constituído pelo promotor/intrão de hELF, a sequência do péptido de sinal de hTPA, a sequência do antígeno de HBcAG e a região bGHpA. Estes fragmentos foram então ligados conjuntamente para proporcionar a construção do plasmídeo pP3V7193 que

contém as sequências de codificação de HBcAg e HBsAg.

As seguintes formulações de ADN-ouro foram então produzidas para um ensaio de adjuvante de vacina de ADN em porcos.

Formulação #1: Controlo, o vector de HBcAg/HBsAg (pWRG7193) só, 2 µg de ADN por mg de ouro, 0,5 mg de ouro por cartucho; e

Formulação #2: O vector HBcAg/HBsAg (pWRG7193), os vectores de ADN de CTA-KDEL (pPJV2006) e CTB (pPJV2003) todos coprecipitados sobre um único lote de ouro (1,0 µg de ADN de pWRG7193 por mg de ouro, e 0,5 µg de cada um do ADN de pPJV2006 e pPJV2003 por mg de ouro), 0,5 mg de ouro por cartucho.

O plasmídeo pWRG7193 só ou com os vectores adjuvantes pPJV2006 e pPJV2003 foram precipitados em partículas de ouro seguindo os procedimentos descritos no Exemplo 3 acima, novamente numa concentração final de 2 µg de ADN por mg de ouro. As partículas de ouro revestidas foram carregadas em tubo TEZFEL® utilizando os procedimentos descritos no Exemplo 3 acima. Dois grupos experimentais (de 5 porcos cada um) receberam duas imunizações com a Formulação #1 e a Formulação #2, respectivamente, em que as duas imunizações foram aplicadas com um intervalo de 6 semanas. Cada imunização consistiu em duas injeções em série de 500 psi na área da virilha utilizando um dispositivo de administração de partículas PowderJect® XR-1 em que cada injeção utilizou um só cartucho. Assim, no grupo de controlo (Formulação #1), cada imunização consistiu na administração de um total de 1 mg de ouro e 2 µg do vector pWRG7193 da vacina de ADN. Analogamente, no grupo de teste do adjuvante (Formulação

#2), cada imunização consistiu numa administração total de 1 mg de ouro, 2 µg do vector pWRG7193 da vacina de ADN, e 1 µg de cada um dos vectores adjuvantes pPJV2006 e pPJV2003. Foram colhidas amostras de sangue de cada animal no momento da imunização de reforço (semana 6) e 2 semanas após a imunização de reforço (semana 8).

A detecção das respostas do anticorpo específicas para o antígeno do núcleo foi efectuada como segue: placas de ELISA foram revestidas com o antígeno do núcleo da hepatite B (Biodesign) a 100 ng/mL em PBS. Depois do revestimento de um dia para o outro a 4 °C, as placas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas 3 vezes com PBS contendo Tween-20 a 0,05%. Amostras do soro dos porcos foram diluídas em série em leite em pó desnatado a 2%/PBS/Tween 20 a 0,01% e adicionadas às placas de ELISA. Após incubação à temperatura ambiente durante 2 horas, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS/Tween-20 a 0,05%. O anticorpo secundário consistiu em anti-IgG de porco de cabra conjugada com peroxidase de rábano (Kirkegaard and Perry) que foi diluída 1:2000 em leite em pó desnatado a 2%/PBS/Tween 20 a 0,01%, e adicionou-se às placas para uma incubação de 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas 5 vezes com PBS/Tween-20 a 0,05% e adicionou-se 100 µL do substrato TMB. O desenvolvimento da cor decorreu durante 15 minutos e foi parado pela adição de 100 µL de H₂SO₄ 1 N. As placas foram lidas a 450 nm. As Figuras 10 e 11 mostram os valores da média geométrica da absorvência às 6 e 8 semanas, respectivamente, para cada um dos dois grupos de porcos para 4 diferentes diluições do soro. Estes dados demonstram uma melhoria acentuada das concentrações do anticorpo para o antígeno do núcleo da hepatite B após a utilização dos vectores adjuvantes de CT pPJV2006 e pPJV2003.

Além das respostas humorais elevadas ao antígeno do núcleo da hepatite B, também foi observada uma elevação mensurável das respostas dos anticorpos específicas para o antígeno de superfície da hepatite B no grupo de teste do adjuvante. Os anticorpos específicos para o antígeno de superfície foram quantificados em amostras de soro dos animais individuais utilizando um kit de doseamento comercial (AUSAB, Abbott Laboratories). Este kit permite a quantificação das respostas do anticorpo em termos da unidade mili-internacional (mUI/mL) utilizando um painel padrão. As médias geométricas das concentrações do anticorpo do antígeno de superfície no grupo de controlo (Formulação #1) e no grupo de teste do adjuvante (Formulação #2) foram de 282 e 662 mUI/mL, respectivamente, demonstrando a aptidão dos presentes plasmídeos adjuvantes (pPJV2006 e pPJV2003) para aumentar respostas imunes a um antígeno codificado por um vector separado.

Exemplo 7

Melhoramento da Resposta Imune Celular Semelhante Th1 a uma Vacina de ADN Utilizando os Vectores Plasmídicos que Codificam as Subunidades de CT ou LT

O vector da vacina de ADN de pM2-FL que codifica a proteína M2 do vírus da influenza A foi utilizado para testar os efeitos adjuvantes dos vectores adjuvantes pPJV2002, pPJV2003, pPJV2004, pPJV2005, pPJV2006 e pPJV2007 no contexto da vacinação com ADN mediada por partículas. A vacinação com ADN mediada por partículas foi efectuada precipitando o vector da vacina do ADN de M2, com ou sem várias combinações dos vectores adjuvantes, em partículas microscópicas de ouro e acelerando as partículas de ouro revestidas para a epiderme de murganhos utilizando um

dispositivo de administração de partículas PowderJect® XR-1 (PowderJect Vaccines, Inc. Madison, WI). A construção do vector plasmídico de ADN de pM2-FL é como aqui descrita acima no Exemplo 3.

Tal como anteriormente, o plasmídeo pM2-FL foi precipitado em partículas de ouro de 2 micrometros como vector único, ou vector misto mais amostras do vector adjuvante. Especificamente, o ADN do plasmídeo (o vector pM2-FL individual ou o vector pM2-FL mais um ou mais vectores adjuvantes) foi misturado com partículas de ouro de 2 micrometros (Degussa) num tubo de centrífuga pequeno contendo espermidina. A precipitação foi efectuada seguindo as metodologias do Exemplo 3, e as partículas de ouro revestidas foram então revestidas sobre a superfície interna de um tubo TEZFEL® também como descrito no Exemplo 3. O tubo foi então cortado em cartuchos de 0,5 polegadas adequados para carregar no dispositivo de administração de partículas.

As formulações de ADN-ouro seguintes foram produzidas para um ensaio de adjuvante da vacina de ADN em murganhos.

Formulação #1: O vector de ADN de pM2-FL combinado com o vector plasmídico vazio pWRG7054 antes da precipitação no mesmo lote de ouro, 2,1 µg do ADN total por mg de ouro (0,1 µg de pM2-FL e 2,0 µg de pWRG7054), 0,5 mg de ouro por cartucho;

Formulação #2: O vector de ADN de pM2-FL combinado com os vectores de ADN de CTA e CTB (pPJV2002 e pPJV2003) antes da precipitação num único lote de ouro, 2,1 µg do ADN total por mg de ouro (1,0 µg de cada vector adjuvante de ADN por mg de ouro, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de ouro por

cartucho;

Formulação #3: O vector de ADN de pM2-FL combinado com os vectores de ADN de CTA -KDEL e CTB (pPJV2006 e pPJV2003) todos coprecipitados num único lote de ouro, 2,1 µg do ADN total por mg de ouro (1,0 µg de cada vector adjuvante de ADN por mg de ouro, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de ouro por cartucho;

Formulação #4: O vector de ADN de pM2-FL combinado com o vector de ADN de CTA -KDEL (pPJV2006) e suplementado com o vector do plasmídeo vazio de pWRG7054 todos combinados e coprecipitados num único lote de ouro, 2,1 µg do ADN total por mg de ouro (1,0 µg de pPJV2006, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de ouro por cartucho;

Formulação #5: O vector de ADN de pM2-FL combinado com o vector de ADN de CTA (pPJV2002) e suplementado com o vector plasmídico vazio de pWRG7054, todos os ADN foram combinados e coprecipitados num único lote de ouro, 2,1 µg do ADN total por mg de ouro (1,0 µg de pPJV2002, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de ouro por cartucho;

Formulação #6: O vector de ADN de pM2-FL combinado com o vector de ADN de CTB (pPJV2003) e suplementado com o vector plasmídico vazio de pWRG7054, todos os ADN foram combinados e precipitados num único lote de ouro, 2,1 µg do ADN total por mg de ouro (1,0 µg de pPJV2003, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de ouro por cartucho;

Formulação #7: O vector de ADN de pM2-FL combinado com os vectores de ADN de LTA e LTB (pPJV2004 e pPJV2005) antes da precipitação num único lote de ouro, 2,1 µg do ADN total por mg de ouro (1,0 µg de cada vector adjuvante de ADN por mg de ouro, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de ouro por

cartucho;

Formulação #8: O vector de ADN de pM2-FL combinado com os vectores de ADN de LTA -RDEL e LTB (pPJV2007 e pPJV2005) todos coprecipitaram num único lote de ouro, 2,1 µg do ADN total por mg de ouro (1,0 µg de cada vector adjuvante de ADN por mg de ouro, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de ouro por cartucho;

Formulação #9: O vector de ADN de pM2-FL combinado com o vector de ADN de LTA -RDEL (pPJV2007) e suplementado com o vector plasmídico vazio de pWRG7054, todos foram combinados e coprecipitaram num único lote de ouro, 2,1 µg do ADN total por mg de ouro (1,0 µg de pPJV2007, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de ouro por cartucho;

Formulação #10: O vector de ADN de pM2-FL combinado com o vector de ADN de LTA (pPJV2004) e suplementado com o vector plasmídico vazio de pWRG7054, todos os ADN foram combinados e coprecipitados num único lote de ouro, 2,1 µg do ADN total por mg de ouro (1,0 µg de pPJV2004, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de ouro por cartucho;

Formulação #11: O vector de ADN de pM2-FL combinado com o vector de ADN de LTB (pPJV2005) e suplementado com o vector plasmídico vazio de pWRG7054, todos os ADN foram combinados e coprecipitados num único lote de ouro, 2,1 µg do ADN total por mg de ouro (1,0 µg de pPJV2005, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de ouro por cartucho.

Estas formulações de vacina de ADN foram então administradas a onze grupos de murganhos como se segue. Cada grupo experimental continha 8 animais e cada animal recebeu duas imunizações com a sua respectiva formulação com 4 semanas de período de descanso entre imunizações.

Cada imunização consistiu em duas administrações em série na epiderme abdominal (um cartucho por administração) utilizando um dispositivo de administração de partículas PowderJect® XR-1 (PowderJect Vaccines, Inc. Madison, WI) a uma pressão de hélio de 400 psi. Foram colhidas amostras de soro duas semanas após a segunda imunização ou imunização de reforço.

As amostras de soro individuais foram doseadas quanto a respostas de anticorpos específicos de M2 para as subclasses de IgG1 e de IgG2 utilizando o ensaio de ELISA do Exemplo 3 acima para a determinação da concentração de IgG total, excepto que se utilizou um conjugado de anticorpo secundário específico para IgG1 ou IgG2. O anticorpo de conjugado de anti-IgG1 de murganho de cabra-biotina foi obtido de Southern Biotechnology Associates, Inc. (catálogo #1070-08, concentração de 0,5 mg/mL) e utilizado numa diluição de 1/8000. O conjugado de anti-IgG2a de murganho de cabra-biotina foi obtido da mesma fonte (catálogo #1080-08, concentração de 0,5 mg/mL) e utilizou-se também numa diluição de 1/8000.

Determinou-se as médias geométricas das concentrações de anticorpo para IgG1 e IgG2a específicas para o antigénio de M2 para cada grupo experimental, e foram calculadas as proporções de IgG1 para IgG2a. Estes dados estão apresentados a seguir no Quadro 5.

Quadro 5

Formulação#	Razão de IgG1 para IgG2a
1	160,99
2	3,44
3	13,59

4	63,20
5	2,63
6	30,97
7	0,02
8	0,50
9	9,00
10	4,53
11	27,00

Como se pode observar com referência ao Quadro 5, a adição de qualquer das subunidades A ou B, ou as várias combinações das subunidades A e B com a formulação da vacina de ADN de M2 conduziram a reduções significativas na razão de IgG1 para IgG2 de outro modo desencadeadas com a vacina de ADN de M2 (pM2-FL) na ausência do adjuvante (Formulação #1). A maior redução da razão resultou da utilização das combinações do vector LTA mais LTB, e de LTA-RDEL mais LTB (Formulações #7 e #8, respectivamente). Em ambas estas formulações, a utilização dos adjuvantes de polinucleótidos da presente invenção conduziu a uma abundância de concentrações de IgG2a específicas para o antigénio de M2 em relação a IgG1, característica que é distintiva de uma resposta imune semelhante a Th1 em murganhos.

Os resultados de grupos experimentais que receberam as Formulações #1, #2 e #7 foram traçado num gráfico como a relação de log IgG1 para IgG2a na Figura 12. Como se pode observar nesta Figura, o efeito adjuvante da composição de vacina de ADN de pM2-FL com os vectores adjuvantes de CTA mais CTB (Formulação #2) provocou uma queda com 2 ordens de grandeza na razão de IgG1 para IgG2 em relação à composição de vacina de pM2-FL sem adjuvante (Formulação #1). Além disso, uma queda adicional de 2 ordens de grandeza nesta razão foi observada quando a vacina de ADN de pM2-FL foi

adjuvantada com os vectores adjuvantes LTA mais LTB (Formulação #7).

Exemplo 8

Adição das Sequências que Codificam Péptidos de Sinal a Vectores Adjuvantes que Codificam CT ou LT.

As construções dos vectores que contêm as subunidades da toxina de CTA, CTB, LTA e LTB (pPJV2002, pPJV2003, pPJV2004 e pPJV2005, respectivamente) foram modificadas para remover as sequências de codificação do péptido de sinal de tpa, e foi construído um vector da vacina de ADN duplo que codifica os antigénios tanto do núcleo como de superfície da hepatite B para utilização nas experiências seguintes.

As condições de PCR correntes que foram utilizadas para a construção/modificação dos vectores foram como se segue: 1x PCR do tampão do núcleo com MgCl₂ 1,5 mM (Promega Corp., Madison, WI); 0,400 µM de cada iniciador; 200 µM de cada dNTP (USB Inc., Cleveland, OH); 2,5 µg de Taq polimerase (Promega Corp., Madison, WI); 1,0 µg de ADN molde; água até 100 µL; e uma camada de revestimento de óleo mineral (Aldrich Chemical Inc., Milwaukee WI). Um termociclador PTC-200 (MT Research Inc., Waltham, MA) foi programado para fazer funcionar a seguinte rotina: 4 minutos a 95 °C; 30 ciclos de (1 minuto a 95 °C/1 minuto 15 segundos a 55 °C/1 minuto a 72 °C); 10 minutos a 72 °C; manutenção a 4 °C. Os produtos de amplificação foram removidos da reacção de PCR utilizando o kit de purificação por PCR QIAquick® (Qiagen Inc., Valencia, CA) antes do corte com enzimas de restrição (New England Biolabs, Beverly, MA). Todos os produtos de PCR foram sequenciados depois da clonagem para assegurar a fidelidade da

amplificação.

Mais especificamente, um vector de vacina de ADN duplo que codifica os antígenos tanto do núcleo como de superfície da hepatite B foi construído como se segue. A construção pWRG7128 (Exemplo 4) que contém a sequência de codificação do antígeno de superfície foi modificada utilizando uma série de técnicas correntes de biologia molecular para proporcionar a construção dupla (antígeno de superfície/núcleo). Inicialmente, a construção pWRG7128 foi modificada para remover a região de poliadenilação da hormona do crescimento bovino e substituí-la pela região de poliadenilação de beta-globina de coelho. Um primeiro fragmento de inserção contendo o promotor de CMV com as sequências do exão 1 e do exão 2, e um segundo fragmento de inserção contendo uma segunda região de poliadenilação de beta-globina de coelho foram ligados na construção pWRG7128 modificada, e um adaptador construído por emparelhamento de oligonucleótidos sistémicos foi inserido entre os sítios *Sph*I e *Pst*I localizados imediatamente a montante do promotor de CMV inserido.

O plasmídeo mpSmpCC (GlaxoSmithKline, UK) foi submetido a PCR com os seguintes iniciadores: 5'-GCC GCT AGC ATG GAC ATT GAC CCT TAT AAA GA-3' (SEQ ID NO: 23) e 5'-CCA GGA TCC TTA ACA TTG AGA TTC C-3' (SEQ ID NO:24) para produzir uma sequência de codificação do antígeno do núcleo de hepatite B adw2. Este produto de PCR foi cortado com *Nhe*I e *Bam*HI para gerar um fragmento de inserção, fragmento esse que foi então modificado para incluir um sítio *Bgl*II a jusante e inserido num vector de clonagem. O vector de clonagem foi cortado com *Pst*I e *Eco*R1 para gerar um fragmento de inserção do antígeno do núcleo; o plasmídeo pWRG7128 modificado foi cortado com *Pst*I e *Mfe*I para gerar um fragmento do vector, e o fragmento de

inserção do antígeno do núcleo foi ligado ao fragmento do vector, resultando na construção do plasmídeo do antígeno duplo de superfície/núcleo.

As construções dos vectores que contêm as subunidades de toxina de CTA, CTB, LTA e LTB (pPJV2002, pPJV2003, pPJV2004, e pPJV2005, respectivamente) foram modificadas para remover as sequências de codificação do péptido de sinal tpa por mera excisão das sequências de codificação de tpa utilizando enzimas de restrição para produzir as seguintes construções: CTA sem TPA, CTB sem TPA, LTA sin TPA, e LTB sem TPA, respectivamente.

O plasmídeo do antígeno duplo do núcleo/superfície foi combinado com o ADN do plasmídeo irrelevante (para o controlo sem adjuvante) ou com as construções dos vectores das subunidades da toxina e precipitado em partículas de ouro de 2 micrometros. Especificamente, o ADN plasmídico (vector plasmídico do antígeno duplo do núcleo/superfície) mais dois vectores adjuvantes (para proporcionar uma combinação de CTA/CTB ou LTA/LTB) foi misturado com partículas de ouro de 2 micrometros (Degussa) num tubo pequeno de centrífuga contendo espermidina. A precipitação foi realizada seguindo as metodologias do Exemplo 3, e as partículas revestidas com ouro foram então revestidas na superfície interna de um tubo TEFZEL® tal como também descrito no Exemplo 3. O tubo foi então cortado em cartuchos de 0,5 polegadas adequados para carregar no dispositivo de administração de partículas.

Foram assim produzidas as seguintes formulações de ADN-ouro para um ensaio do adjuvante da vacina de ADN em murganhos:

Formulação #1 ("sem adjuvante") 1 µg do vector

plasmídico de ADN do antígeno duplo de superfície/núcleo, 1 µg do vector plasmídico de ADN irrelevante;

Formulação #2: ("CT") 1 µg do vector plasmídico de ADN do antígeno duplo de superfície/núcleo, 0,5 µg do vector plasmídico de ADN de pPJV2002 (CTA) e 0,5 µg do vector plasmídico de ADN de pPJV2003 (CTB);

Formulação #3: ("CT sem TPA") 1 µg do vector plasmídico de ADN do antígeno duplo de superfície/núcleo, 0,5 µg do vector plasmídico de ADN de CTA sem TPA, 0,5 µg do vector plasmídico de ADN de CTB sem TPA;

Formulação #4: ("CTA") 1 µg do vector plasmídico de ADN do antígeno duplo de superfície/núcleo, 1 µg do vector do plasmídeo de ADN de pPJV2002 (CTA);

Formulação #5: ("CTA sem TPA") 1 µg do vector plasmídico de ADN do antígeno duplo de superfície/núcleo, 1 µg do vector plasmídico de ADN de CTA sem TPA;

Formulação E#6: ("CTB") 1 µg do vector plasmídico de ADN do antígeno duplo de superfície/núcleo, 1 µg do vector plasmídico de ADN de pPJV2003 (CTB);

Formulação #7: ("CTB sem TPA") 1 µg do vector plasmídico de ADN do antígeno duplo de superfície/núcleo, 1 µg do vector plasmídico de ADN de CTB sem TPA;

Formulação #8: ("LT") 1 µg do vector plasmídico de ADN do antígeno duplo de superfície/núcleo, 0,5 µg do vector plasmídico de ADN de pPJV2004 (LTA), 0,5 µg do vector plasmídico de ADN de pPJV2005 (LTB);

Formulação #9: ("LT sem TPA") 1 µg do vector

plasmídico de ADN do antígeno duplo de superfície/núcleo, 0,5 µg do vector plasmídico de ADN de LTA sem TPA, 0,5 µg do vector plasmídico de ADN de LTB sem TPA;

Formulação #10: ("LTA") 1 µg do vector plasmídico de ADN do antígeno duplo de superfície/núcleo, 1 µg do vector do plasmídeo de ADN de pPJV2004 (LTA);

Formulação #11: ("LTA sem TPA") 1 µg do vector plasmídico de ADN do antígeno duplo de superfície/núcleo, 1 µg do vector plasmídico de ADN de LTA sem TPA;

Formulação #12: ("LTB") 1 µg do vector plasmídico de ADN do antígeno duplo de superfície/núcleo, 1 µg do vector plasmídico de ADN de pPJV2005 (ZTB); e

Formulação #13: ("LTD sem TPA") 1 µg do vector plasmídico de ADN do antígeno duplo de superfície/núcleo, 1 µg do vector plasmídico de ADN de LTD sem TPA.

Num primeiro estudo, várias das formulações de vacina de ADN descritas acima foram administradas a cinco grupos de murganhos utilizando o dispositivo de administração de partículas PowderJect® XR-1 (PowderJect Vaccines, Inc. Madison, WI). Cada grupo experimental continha 5 animais, e cada animal recebeu duas imunizações com a formulação respectiva com um período de descanso de 4 semanas entre as imunizações. As Formulações que foram testadas foram como se segue: Formulação #1 (sem adjuvante); Formulação #2 (CT); Formulação #3 (CT sem TPA); Formulação #8 (LT); e Formulação #9 (LT sem TPA). Todos os animais foram sacrificados duas semanas depois da segunda imunização, e os baços colhidos para utilização em ensaios ELISPOT de IFN- γ e IL-4. Para os ensaios imunes celulares, as suspensões celulares individuais dos esplenócitos dos

baços dos animais imunizados foram cultivados *in vitro* na presença de um péptido que corresponde a um epitopo de células T conhecido (do antigénio de superfície ou do núcleo) nos murganhos. O péptido foi dissolvido em DMSO (10 mg/mL) e diluído para 10 µg/mL em cultura.

Para os ensaios ELISPOT, as placas de filtração de membrana Multiscreen da Millipore foram revestidas com 50 µL do anti-soro apropriado (15 µg/mL de anti-soro anti-IFN- γ ou IL-4, Pharmingen) em tampão de carbonato 0,1 M estéril (pH 9,6) de um dia para o outro a 4 °C. As placas foram lavadas 6 vezes com PBS estéril e depois bloqueadas com meio de cultura de tecidos contendo soro fetal de bovino (FBS) a 10% durante 1-2 horas à TA. O meio foi removido e as células de baço distribuídas pelos poços com um total de 1×10^6 células por poço. Para os poços aos quais se adicionou menos de 1×10^6 células dos animais imunizados, utilizou-se células de animais não anteriormente submetidos a experiências para levar o total a 1×10^6 . As células foram incubadas de um dia para o outro numa incubadora de cultura de tecidos na presença do péptido tal como descrito acima. As placas foram então lavadas 2 vezes com PBS e 1 vez com água destilada. Isto foi seguido por 3 lavagens com PBS. Um anticorpo monoclonal anti-IFN- γ ou anti-IL-4 biotinilado (Pharmingen) foi adicionado à placa (50 µL de uma solução de 1 µg/mL em PBS) e incubada durante 2 horas à TA. As placas foram lavadas 6 vezes com PBS e adicionou-se 50 µL de um conjugado de estreptavidina e fosfatase alcalina (1:1000 em PBS, Pharmingen) e incubou-se durante 2 horas à TA. As placas foram lavadas 6 vezes com PBS e adicionou-se um substrato corante de fosfatase alcalina (BioRad) e deixou-se que a reacção decorresse até ao aparecimento de manchas escuras. A reacção foi parada por lavagem com água 3 vezes. As

placas foram secas ao ar e as manchas contadas ao microscópio.

O efeito adjuvante das sequências de codificação das subunidades da toxina segregada ou não segregada foi avaliado por determinação das respostas de ELISPOT para IFN- γ e IL-4 a ambos os antígenos de superfície e do núcleo da hepatite B ("aAg" e "cAg") codificados pela construção do antígeno duplo de superfície/núcleo, e estes resultados foram comparados como descrito nas Figuras 13A-13D. Como se pode observar, os vectores adjuvantes de CT e LT segregados (contendo a sequência de sinal) (Formulações #2 e #8, respectivamente) produziram aumentos significativos ($P < 0,05$) nas respostas de IFN- γ aos antígenos de superfície e do núcleo, e na resposta de IL-4 ao antígeno de superfície (ver Figuras 13A, 13B e 13C). Em relação às respostas de IL-4 ao antígeno do núcleo, a falta do efeito do adjuvante pelos vectores de LT (Formulações #8 e #9) é consistente com as observações de que a toxina de LT é mais a de um adjuvante de Th1 do que a toxina de CT. O que é mais importante, os vectores de CT e LT que carecem das sequências de sinal (Formulações #3 e #9, respectivamente) apresentaram um efeito adjuvante mais fraco, particularmente como se observa nos dados de ELISPOT de IFN- γ para os antígenos tanto de superfície como do núcleo (ver as Figuras 13A e 13C), em que houve uma queda estatisticamente significativa da actividade adjuvante em virtude da deleção das sequências de sinal.

Finalmente, a diferença claramente observável no efeito adjuvante entre o segregado (Formulações #2 e #8) e o não segregado (Formulações #3 e #9) ajuda a estabelecer que os efeitos adjuvantes observados não são devidos a motivos CpG dentro dos vectores adjuvantes uma vez que os vectores contendo sinal e não contendo sinal não têm

qualquer diferença no teor de ADN bacteriano (CpG) mas ainda assim apresentam diferenças significativas quanto à sua capacidade para aumentar as respostas de IFN- γ específicas para o antígeno de superfície.

Num segundo estudo, as formulações de vacina de ADN descritas acima foram administradas a oito grupos de murganhos utilizando o dispositivo de administração de partículas PowderJect® XR-1 (PowderJect Vaccines, Inc. Madison, WI). Cada grupo experimental continha 5 animais, e cada animal recebeu duas imunizações com a formulação respectiva com um período de descanso de 4 semanas entre as imunizações. As Formulações que foram testadas foram como se segue: Formulação #1 (sem adjuvante); Formulação #2 (CT); Formulação #4 (CTA); Formulação #5 (CTA sem TPA); Formulação #6 (CTB); Formulação #7 (CTB sem TPA); Formulação #8 (LT); Formulação #10 (LTA); Formulação #11 (LTA sem TPA); Formulação #12 (LTB); e Formulação #13 (LTB sem TPA). Todos os animais foram sacrificados duas semanas depois da segunda imunização, e os baços colhidos para utilização nos ensaios ELISPOT de IFN- γ e IL-4 aqui descritos acima.

Como resultado deste segundo estudo (dados não mostrados), observou-se novamente que não havia efeito adjuvante discernível que pudesse ser atribuído ao teor de CpG nos vários plasmídeos adjuvantes. Embora na sua maior parte não se observasse efeito adjuvante estatisticamente relevante com os diversos vectores adjuvantes das subunidades da toxina, os vectores das subunidades de LT (Formulações #10-13) não evidenciaram um efeito adjuvante na resposta de IFN- γ e IL-4 ao antígeno de superfície (sAg) que fosse influenciado pela presença/ausência da sequência de sinal de secreção.

Exemplo 9

Vectores Plasmídicos Adjuvantes que Codificam os Péptidos das Subunidades de CTA/CTB ou LTA/LTB num Estudo de Inoculação Viral

Para avaliar a aptidão dos vectores plasmídicos adjuvantes da presente invenção para proporcionar efeito protector num modelo de inoculação viral com vírus Herpes simplex de tipo 2 (VHS-2) realizou-se o estudo seguinte. Foi construída uma vacina de ADN que codifica um antígeno de VHS-2 e depois foi combinada com várias associações dos presentes vectores plasmídicos adjuvantes para proporcionar composições de vacina. Após a imunização, os animais imunizados foram estimulados com o vírus VHS-2, e determinou-se o efeito protector das diversas composições de vacina.

Em relação à construção do plasmídeo do antígeno de ADN, foram utilizadas as técnicas de PCR correntes para construir o plasmídeo. As condições de PCR correntes que foram utilizadas para a construção do vector foram como se segue: 1 x PCR do tampão do núcleo com MgCl₂ 1,5 mM (Promega Corp., Madison, WI); 0,400 µM de cada iniciador; 200 µM de cada um de dNTP (USB Inc., Cleveland, OH); 2,5 µg de Taq polimerase (Promega Corp., Madison, WI); 1,0 µg de ADN do molde; água até 100 µL; e um óleo mineral (Aldrich Chemical Inc., Milwaukee WI) de revestimento. Um termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA) foi programado para fazer funcionar a seguinte rotina: 4 minutos a 95 °C; 30 ciclos de (1 minuto a 95 °C/1 minuto 15 segundos a 55 °C/1 minuto a 72 °C); 10 minutos a 72 °C; manutenção a 4 °C. Os produtos de amplificação foram removidos da reacção de PCR utilizando o kit de purificação por PCR QIAquick® (Qiagen Inc., Valencia CA) antes de

cortar com as enzimas de restrição (New England Biolabs, Beverly, MA). Todos os produtos de PCR foram sequenciados após a clonagem para assegurar a fidelidade da amplificação.

Mais especificamente, um vector plasmídico da vacina de ADN que codifica o antígeno de ICP27 inicial de VHS-2 foi construído como se segue. O VHS é um vírus de ADN de cadeia dupla que tem um genoma de aproximadamente 150-160 kpb. O genoma viral está empacotado dentro de uma nucleocápside icosaédrica que está envolta numa membrana. A membrana (ou envelope) inclui pelo menos 10 glicoproteínas codificadas pelo vírus, de que as mais abundantes são gB, gC, gD, e gE. O genoma viral também codifica mais de 70 outras proteínas, incluindo um grupo de aproximadamente cinco antígenos de ICP. Estas proteínas iniciais são sintetizadas cedo no ciclo de replicação viral, em contraste com as glicoproteínas do envelope que só são produzidas no final do ciclo de vida do vírus. Para uma revisão da estrutura molecular e organização do VHS, ver, por exemplo, Roizman e Sears (1996) "Herpes simplex viruses and their replication" em *Fields Virology*, 3rd ed., Fields et al., eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA. O antígeno ICP27 de VHS-2 pode ser obtido facilmente a partir do genoma de VHS-2, por exemplo da região genómica que se estende aproximadamente do nucleótido 114589 até ao 134980 do genoma de VHS-2, ou um fragmento *EcoRI* que se estende do nucleótido 110931 até ao 139697 do genoma de VHS-2. A sequência do genoma de VHS-2 está disponível de fontes publicadas, por exemplo a sequência depositada no GenBank com o número de ordem NC_001798.

Para construir o vector ICP27 utilizado no presente estudo, a região de codificação do ICP27 foi submetida a PCR a partir do genoma de VHS-2 utilizando os seguintes

iniciadores: 5'-GCC ACT CTC TTC CGA CAC-3' (SEQ ID NO:25) e 5'-CAA GAR CAT CAC ACG GAR C-3' (SEQ ID NO:26) para obter um fragmento de nucleótido que contém as sequências dos nucleótidos 114523-116179 (GenBank) de VHS-2 que corresponde à região de codificação do ICP27. O fragmento de ICP27 foi então clonado na região de clonagem múltipla do vector pTarget (Promega Corp., Madison, WI).

As construções dos vectores plasmídicos adjuvantes que contêm as subunidades de toxina CTA, CTB, LTA e LTB (pPJV2002, pPJV2003, pPJV2004 e pPJV2005, respectivamente) foram combinadas para proporcionar o adjuvante CTA/CTB (pPJV2002 + pPJV2003) e LTA/LTB (pPJV2004 + pPJV2005). O plasmídeo do antígeno ICP27 foi combinado com os pares de construções dos vectores das subunidades de toxina e precipitados em partículas de ouro de 2 micrometros. Especificamente, o ADN plasmídico (vector plasmídico do antígeno ICP27) mais dois vectores adjuvantes (para proporcionar uma combinação de CTA/CTB ou LTA/LTB) foram misturados com partículas de ouro de 2 micrometros (Degussa) num tubo pequeno de centrífuga contendo espermidina. A precipitação foi realizada seguindo as metodologias do Exemplo 3, e as partículas de ouro revestidas foram então revestidas na superfície interna de um tubo TEFZEL® como descrito também no Exemplo 3. O tubo foi então cortado em cartuchos de 0,5 polegadas adequados para carregar no dispositivo de administração de partículas.

Foram assim produzidas as seguintes formulações de ADN-ouro para o estudo de inoculação com VHS-2:

Formulação #1: (sem adjuvante) 2 µg do vector plasmídico de ADN do antígeno ICP27;

Formulação #2: ("CT elevada") 900 ng do vector plasmídico de ADN do antigénio ICP27, 50 ng de pPJV2002 (CTA), 50 ng de pPJV2003 (CTB),

Formulação #3: ("CT baixa") 500 ng do vector plasmídico de ADN do antigénio ICP27, 250 ng de pPJV2002 (CTA), 250 ng de pPJV2003 (CTB),

Formulação #4: ("LT elevada") 900 ng do vector plasmídico de ADN do antigénio ICP27, 50 ng de pPJV2004 25 (LTA), 50 ng de pPJV2005 (LTB), e

Formulação #5: ("LT baixa") 500 ng do vector plasmídico de ADN do antigénio ICP27, 250 ng de pPJV2004 (LTA), 250 ng de pPJV2005 (LTB).

No estudo, as formulações de vacina de ADN descritas anteriormente foram administradas a cinco grupos diferentes de murganhos utilizando o dispositivo de administração de partículas PowderJect® XR-1 (PowderJect Vaccines, Inc. Madison, WI). Cada grupo experimental continha 12 animais, e cada animal recebeu duas imunizações (disparo simples aplicado no abdómen) com a formulação respectiva com um período de descanso de 4 semanas entre as imunizações. Um sexto grupo de murganhos foi constituído como um controlo negativo (animais não anteriormente submetidos a experiências), e não recebeu nenhuma vacina. 4 murganhos de cada grupo foram excluídos 2 semanas após a segunda imunização e utilizados para os ensaios ELISPOT de IFN- γ (dados não apresentados).

Duas semanas depois da segunda imunização, todos os murganhos restantes (8/grupo) foram desafiados com 1×10^6 UFP do vírus VHS-2, estirpe MS, por meio de instilação intranasal. O gráfica de sobrevivência que mostra os

resultados do estudo de inoculação está apresentado na Figura 14. Como se pode observar, 100% dos animais não previamente submetidos a experiências sucumbiram dentro de 4 dias após a inoculação. Os animais não previamente submetidos a experiências estão ilustrado no gráfico pela curva (●). Além disso, 100% dos animais que recebem o vector plasmídico do antígeno ICP27 só (Formulação #1) morreram dentro de 7 dias após a inoculação. Os animais que receberam a Formulação #1 estão indicados no gráfico pela curva (▼). Em contraste acentuado, os 25% (2/8) dos animais que receberam o plasmídeo ICP27 adjuvantado com CT de dose baixa (Formulação #3) foram protegidos da inoculação viral, e 38% (3/8) dos animais que receberam ICP27 adjuvantado com dose elevada de CT (Formulação #2) foram protegidos da inoculação viral. Os animais que receberam a Formulação #3 estão ilustrados no gráfico pela curva (■). Os animais que receberam a Formulação #2 estão ilustrados no gráfico pela curva (◆). Finalmente, tanto a vacina de ICP27 com o adjuvante de LT de dose baixa (Formulação #5) como a vacina de ICP27 com o adjuvante de LT de dose alta (Formulação #4) promoveram a protecção completa (100%) nos animais imunizados. Os animais que receberam a Formulação #5 estão ilustrados no gráfico pela curva (▲). Os animais que receberam a Formulação #4 estão ilustrados no gráfico pela curva (○).

Em concordância, foram descritas as novas moléculas adjuvantes de polinucleótidos, as composições que compreendem essas moléculas adjuvantes, e as técnicas de imunização convencionais e com ácidos nucleicos.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> HAYNES, Joel R.

ARRINGTON, Joshua

<120> ADJUVANTES À BASE DE ÁCIDOS NUCLEICOS

<130> APF41.40

<140>

<141> 2001-11-26

<160> 22

<170> Patentln Ver.2.1

<210> 1

<211> 5500

<212> AND

<213> plasmídeo pPJV2002

<400> 1

```
gacgaaaggg cctcgggata cgcctatctt tataggttaa tgtcatgata ataattggtt 60
cttagaacgc aggtgggcact ttccggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgnctatctt 120
tctaataaca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180
aatattgaaa aagggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccttt attccctttt 240
ttggggcatt ttgcccctct gtttttgctc acccagaaac gctgggtgaa gtaaaagatg 300
ctgaagataa gttgggtgca caggtgggtt acctogaact ggatctcaac agcggtaaga 360
tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagtctcgc 420
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg cggggcaaga gcaactcggc cgcgcatac 480
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat ettaacggatg 540
gcattgacgt aagagaatta tgcagtctct ccataaccat gagtataaac actgcggcca 600
acttacttct gacaacgacg ggaggacoga aggagctaac cgcctttttg cacaacatgg 660
gggattcatg aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaa cgttcgcgaa ctattacttg 780
gcgaactaact tactctagct tcccggaac aattaataga ctggatggag gggataaag 840
ttgcaggacc acttctgcgc tggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaattctg 900
gagcgggtga gcgtgggtct cgcggatcca ttgcagcact ggggcagat ggtaagcct 960
cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaatagac 1020
agatcgtcga gatagggtgc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080
catataact tttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200
cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttagatcc ttttttctg cgcgtaact 1260
gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgttggg ttgtttgcg gatcaagagc 1320
taccactct ttttcggaag gtaactggct ccagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380
ttctagtgta gcctagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccc ctacataacc 1440
tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgbottaccg 1500
ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggtga accgggggtt 1560
cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacacoga actgagatac ctacagcgtg 1620
agcattgaga aagcgcacag cttcccgaa ggagaaaggc ggaacaggtat cgggttaagc 1680
gcagggtcgg aacaggagag cgcctgaggg agcttcacag gggaaaagcc tggatatctt 1740
atagtcctgt cgggtttcgc caccctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgcctcgtcag 1800
gggggcggag cctatggaaa aacgcacgca acgcggcctt tttaagggtt cgggcctttt 1860
```


getggccttc	tgetcccatg	tcttttccctg	cgttatccccc	tgattctgtg	gataacogta	1920
ttaccgccttc	tgagttagct	gataccgctc	gcgcagcccg	aacgacccgag	cgcagcgagt	1980
cagtgagcga	ggagccggaa	gagcgcccaa	tacgcaaac	gcctctcccc	ggcggttggc	2040
cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	ttcccgactg	gaaagcgggc	agttagcgca	2100
acgcatttaa	tgtgagttag	ctcactcatt	aggaaccoca	ggctttacac	tttatgcttc	2160
cggtcgttat	gttgtgtgga	attgtgagcg	gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	2220
accatgatta	cgccaagcta	gtcgacataa	atcaatattg	gctattggcc	attgcatacg	2280
ttgtatctac	atcataatat	gtacatttat	attggctcat	gtccaatatg	acgcgcattg	2340
tgacattgat	tattgactag	ttattaatat	taactcaatta	cggggtcatt	agttcatagc	2400
ccatataatg	agttcccggt	tacataaact	acggtaaatg	gcgcgcctcg	tgaccgcccc	2460
acgacccccg	ccatttgacg	tcataaatga	cgatatgttc	ctatgtaacg	ccaataggga	2520
ctttccattg	acgtcaatgg	gtggagtatt	tacggtaaac	tgcccacttg	gcagtaacac	2580
aagtgtatca	tatgccaaagt	ccggccccct	attgacgtca	atgacggtaa	atggccccgc	2640
tggcatttat	ccagttacat	gaccttacgg	gactttctca	cttggcagta	catctacgta	2700
ttagtccatg	ctattaccat	ggtgatcgcg	ttttggcagt	acaccaatgg	gggtggatag	2760
cggtttgact	caoggggatt	tccaagtctc	caccccattg	acgtcaatgg	gagtttgttt	2820
tggccacaaa	atcaacggga	ctttccaaaa	tgtcgtataa	accccgcgcc	gttgacgcaa	2880
atggcggtta	ggcggtgtacg	gtgggaggtc	tataaaagca	gagctcgtht	agtgaaccgt	2940
cagatcgect	ggagagcgca	tccagcgctg	tttgaccccc	atagaagaca	ccgggacctga	3000
tccagcctcc	gcggccggga	acggtgcatt	ggaaecggga	ttcccgtgc	caagagtga	3060
gtaagtaccg	ccatagact	ctataggcac	acccctttgg	ctcttatgca	tgtctactgc	3120
tttttggctt	ggggcctata	caccccgcct	ccttatgcta	taggtgatgg	tatagcttag	3180
cctatagggt	tgggttatgt	accattattg	accactcccc	tattgggtgac	gatactttcc	3240
attactaatc	cataacatgg	ctctttgcca	caactatctc	tattggctat	atgccaatac	3300
tctgtccttc	agagactgac	acggactctg	tatttttaca	ggatggggtc	ccattcatta	3360
tttacaatat	ccatataca	acaacgcctg	cccccgtag	cgcagttttt	attaaacata	3420
gggtgggata	tccacggcaa	tctcgggtac	gtgttccgga	catgggctct	tctcgggtag	3480
cgccggagct	tccacatccg	agccctggtc	ccatgcctcc	agcggtccat	ggtcgctcgg	3540
cagtcctctg	ctcctaacag	tggaggccag	acttaggcac	agcacaatgc	ccaccaccac	3600
cagtgtgccc	cacaaggccg	tggcggtagg	gtatgtgtct	gaaatgagc	toggagattg	3660
ggcttgcacc	gtgacgcaga	tggaaagact	aaggcagcgg	cagaagaaga	tgagggcagc	3720
ttagttgttg	tattctgata	agagtcagag	gtaaactccg	ttgcggtgct	gttaacggtg	3780
gagggcagtg	tagtctgagc	agtactcggt	gctgcgcgcg	gcgcaccccg	acataatagc	3840
tgacagacta	acagactgtt	cctttccatg	ggtcttttct	gcagtcaccg	tccaagcttg	3900
caatccatga	tgcaatgaag	agagggtctt	gctgtgtgct	gctgctgtgt	ggagcagctt	3960
tgttttcggc	tagcaatgat	gataagttat	atcgggcaga	ttctcgacct	cctgatgaaa	4020
taaagcagtc	agggtggtctt	atgccaaagag	gacagagtga	gtactttgac	cgaggctactc	4080
aaatgaatat	caacctttat	gaccatgcaa	gaggaaactca	gacgggattt	gttagggccg	4140
atgatggata	tgtttccacc	tcaattagtt	tgagaagtgc	ccacttagtg	ggtcaaaacta	4200
tatgtctctg	tcatctactt	tattatataa	atgttatagc	cartgcaccc	aacatgttta	4260
acgttaatat	tgtattaggg	gcatacagtc	ctcatccaga	tgaacaagaa	gtttctgctt	4320
taggtgggat	tccatactcc	caaatatatg	gatggtatcg	agttcatttt	ggggtgcttg	4380
atgaacaatt	acatcgtaat	aggggctaca	gagatagata	ttacagtaac	ttagatattg	4440
ctccagcagc	agatggttat	ggattggcag	gtttccctcc	ggagcataga	gcttggaggag	4500
aagagccgtg	gattcatcat	gcaccccgcg	gttgtgggaa	tgtcccaaga	tcacgatgta	4560
gtaatacttg	cgatgaaaaa	acccaaagtc	taggtgtaaa	attccttgac	gaataccaat	4620
ctaaagttaa	aagacaaata	ttttcaggct	atcaatctga	tattgatata	cataatagaa	4680
tttaaggatga	attatgagga	tccctgcgaat	ccctaggagg	attaggcaag	ggcttgagcc	4740
cacgtctctg	tgaggggacag	aaatacaatc	aggggagcta	tatgaatact	ccatggagaa	4800
acccagactc	acgtatgata	agcctcgact	gtgccttcta	gttgccagcc	atctgttctt	4860
tgcacctccc	cgtgtccttc	cttgacctg	gaaggtgcca	ctccactgt	cctttcttaa	4920
taaatgaggg	aaattgcata	gcattgtctg	agtaggtgtc	attctattct	ggggggtggg	4980

```

gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcc 5040
gtgggctcta tggcttctga ggcggaaga accagctggg gctcgacagc tcgactctag 5100
aatcgaactgg cggctcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt taccacaactt 5160
aatcgacttg cagcacatcc ccccttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgcaacc 5220
gatcgccctt cccaacagtt ggccagcctg aatggcgaaat ggccgctgat gcggtatttt 5280
ctcettaagc atctgtgggg tatttcacac cgcataatggg gactctcag tacaatctgc 5340
tctgatgccg catagtttaag ccagcccgga caccgcgcaa caccgctga cgcgcctga 5400
cgggcttgtc tgcctccggc atccgctac agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc 5460
atgtgtcaga ggttttcacc gtcctacccg aaacgcgca 5500

```

<210> 2

<211> 5088

<212> DNA

<213> pPJV2003 plasmid

<400> 2

```

gaagaaaggg cctcgtgata cgcctatctt tatagggtta cgtcatgata ataattggtt 60
cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacctctatt tgtttatttt 120
tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180
aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttcgg tgtcgccctt attccctttt 240
ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgcct acccagaaac gctgggtgaa gtaaaagatg 300
ctgaagatca gttgggtgca cgaagtgggt acatcgaaat ggtctcaac agcggtaaga 360
tccttgagag ttttcgccc gaagaacgtt ttcaaatgat gagcactttt aaagtctctc 420
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgaag ccgggcaaga gcaactcggg cgcgcgatac 480
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacgggatg 540
gcatgacagt aagagaattt tgcagtgtcg ccataaccat gagtataac actgcggcca 600
acttactctc gacaacgata ggaggacgga aggagctaac cgcctttttt cacaacatgg 660
gggatcatgt aactcgccct gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaaag 720
acgagcgtga cccacgagt cctgtagcaa tggcaacaa gttgcgcaa ctattaaactg 780
gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840
ttgcaggacc acttctgcgc tggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900
gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggdcagat ggtaaagcct 960
cccgatcgtt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaatatagc 1020
agatcgttga gataggtgct tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagttaact 1080
catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttctaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200
cagaccccg tgaaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaactc 1260
gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgcg gatcaagagc 1320
taccacactc ttttcggaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380
ttctagtgtt gccgtagtta ggccaccaet tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440
tcgtctgtgt astcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500
ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtccggctga acggggggtt 1560
cgtgcacaca gccagccttg gagcgaaaga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620
agcattgaga aagcgccacg cttcccgaa gggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagc 1680
gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttcacag gggaaaacgc ttgtatcttt 1740
atagtcctgt cgggtttcgc cactctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgcctcgcag 1800
gggggcggag cctatggaaa aacgcccagaa acgcggcctt ttaacggttc ctggcctttt 1860
gctggccttt tgcctacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 1920
ttaccgcctt tgagttagct gataccgtc gccgcagccg aacgacagag ccgagcagat 1980
cagtgaagca ggaagcggaa gagcgcccaa taacgcaacc gcctctcccc gcgcgttggc 2040
cgattcatta atgcagctgg cagcacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca 2100
acgcaattaa tgtgagttag ctcaactatt aggcacccca ggttttaac tttatgtctc 2160
cggctcgtat gttgtgtgga atgtgagcgc gataacaatt tcacacagga aacagctatg 2220

```

```

accatgatta  cgcgaagcta  gtccagacata  atcaaatattg  gctattggcc  attgcataacg  2280
ctgtatctat  atcataatat  gtacatttat  attggctcat  gtccaatatg  accgccaatgt  2340
cgacattgat  tattgactag  ttattaatat  taatcaatta  cggggtcatt  agttcatagc  2400
ccatataatgg  agttccgggt  tacataaact  aaggtaaatg  gcccgctcgc  tgaccgcccc  2460
acgacccccg  cccattgacg  tcaataatga  cgtatgttc  catagtaacg  ccaataggga  2520
ctttccattg  acgtcaatgg  gtggagatat  taaggtaaac  tgcccaactg  gcagtaacac  2580
aagtgtatca  tatgccaaat  ccggccccct  attgacgtca  atgacggtaa  atggccccgc  2640
tggcatttat  cccagtacat  gaccttacgg  gaectttcta  ctgggcagta  catcnaagta  2700
ttagtcaacg  ctattaccat  ggtgatgcgg  ttttggcagt  acaccaatgg  gcgtggatag  2760
cggtttgact  cagggggatt  tccaaagtct  caccocattg  acgtcaatgg  gaggttgttt  2820
tggcaccaaa  atcaacggga  ctctccaaaa  tctcgtaata  accccgcccc  gttgacgcaa  2880
atgggcggta  gggtgtacg  gtgggagggt  tatataagca  gagctcggtt  agtgaaccgt  2940
cagatcgct  ggagacgcca  tccacgcgtg  tttgacctcc  atagaagaca  ccgggaccca  3000
tccagcctcc  gcggccggga  acggtgcatt  ggaacggga  tccccgtgc  caagagtgc  3060
gtaagtacg  cctatagact  ctataggcac  accccttgg  ctcttatgca  tgcataactg  3120
tttttggctt  ggggctata  caccocgcct  ccttatgcta  taggtgatgg  tatagcttag  3180
cctatagggt  tgggttattg  accattattg  accactcccc  tattggtpac  gatactttcc  3240
attactaatc  cataacatgg  ctctttggca  caactatctc  tattggctat  atgccaatac  3300
tctgtccttc  agagactgac  acggactcgc  tatttttaca  gtaggggtc  ccatctatta  3360
tttcaaaat  ccatatata  acaacgcgc  cccccgtgc  cgcagttttt  attcaacata  3420
gctggggatc  tccacgcgaa  tctcgggtac  gtgttcggga  datgggtct  tctccggtag  3480
cggcggagct  tccacatccg  agccctggtc  ccatgcctcc  agccgctcat  ggtcgctcgg  3540
cagctccttg  ctctaacag  tggaggccag  acttaggcac  agcacaatgc  ccaaccacac  3600
cagtgtgcg  cacaaggccg  tggcggtagg  gtatgtgtct  gaaaatgagc  tcggagattg  3660
ggctcgcacc  gtgacgcaga  tgggaagact  aaggcagcgg  cagaagaaga  tgcaggcagc  3720
tggatctgtg  tattctgata  agagtcagag  gtaactccc  ttgcgggtct  gttaacgggtg  3780
gagggcagtg  tagtgtgagc  agtactcggt  getgcgcgcg  gcgcaccag  acataatagc  3840
tgacagacta  acagactgtt  cctttccatg  ggtcttttct  gcaqtcaccg  tccaagcttg  3900
caatccatgga  tgaatgaag  agagggtct  gctgtgtgt  gctgctgtgt  ggagcagctc  3960
tcgtttcggc  tagcacacct  caaatatatta  ctgatttctg  tgcagaatac  cacaacacac  4020
aaatatatac  gctaaatgat  aagatatttt  cgtatacaga  atctctagct  ggaaaaagag  4080
agatggctat  cattaacttt  aagaatgggt  caatttttca  agtagaagta  ccaggtagtc  4140
aacatataga  ttcacaaaaa  aaagcgattg  aaaggatgaa  ggataacctg  aggattgcac  4200
atcttactga  agttaaagtc  gaaaagttat  gtgtatggaa  taataaaacg  cctcatgcga  4260
ttgcgcgaat  tagtatggca  aattaaggat  cctcgcaatc  cctaggagga  ttaggcgaag  4320
gcttgagctc  acgtcttgt  gagggacaga  aatacaatca  ggggcagtat  atgaatactc  4380
catggagaaa  ccagatctta  cgtatgatca  gctcgactg  tgccttctag  ttgccagcca  4440
tctgttgttt  gccctctccc  cgtgccttcc  ttgacctgg  aaggtgcacc  tcccactgtc  4500
cttctctaatt  aaaatgagga  aattgcactg  catgtcttga  gtagggtgtc  tcthattctg  4560
gggggtgggg  tggggcagga  cagcaagggg  gaggattggg  aagacaatag  caggcatgct  4620
ggggatgcgg  tgggtcttat  ggcttctgag  gggaaagaa  ccagctgggg  ctcgacagct  4680
cgactctaga  attcaactgg  cgtcgtttta  caacgtctgt  actgggaaaa  cctggcggtt  4740
acccaactta  atcgcttgc  agcacatccc  cctttcgcca  gctggcgtaa  tagcgaagag  4800
gcccgacccg  atcgcccttc  ccaacagttg  cgcagcctga  atggcgaaatg  ggcctgatg  4860
cggtaatttc  tcttaacgca  tctgtgcggt  atttcacacc  gcataatggtg  cactctcagt  4920
acaattctgt  ctgatgcgc  atagttaagc  cagccccgac  acccgccaac  acccgctgac  4980
gcgcctgac  gggcttgtct  gctccccgca  tccgcttaca  gacaagctgt  gaccgtctcc  5040
gggagctgca  tgtgtcagag  gttttcacccg  toatcaccca  aacgcgcga  5080

```

<210> 3

<211> 5488

<212> DNA

<213> plasmid pJ/V2006

<400> 3

gacgaaaggg	cctcgtgata	cgctatcttt	tataggttaa	tgtcatgata	ataatggttt	60
citgagcgtc	aggtggcact	tttgggggaa	abgtgcgcgg	aacctctatt	tgtttatctt	120
tctaaatata	ttcaaatatg	tatccgctca	tgagacaata	accttgataa	atgcttcaat	180
aattattgaa	aagggaaggt	atgagttctc	aacatttccg	tgctgccttt	attccctttt	240
ttggggcatt	ttgccttctc	gttttttgct	acccagaaac	gctgggtgaa	gtaaaagatg	300
ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaaat	ggatctcaac	agcggtaaga	360
tccttgagag	ttttcgcctc	gaagaacgtt	ttccaatgat	gagcactttt	aaagtctctg	420
tatgtggcgc	ggtatttatc	cgtattgaac	ccggggcaaga	gcaactcggg	cgccgcatac	480
actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	cttaacggatg	540
gcctgacagt	aagagaatta	tgcagtgcct	ccataaccat	gagtgataac	actgcggcca	600
acttactctc	gacaaagata	ggaggacgga	aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg	660
gggtatcatg	aactcgcctt	gactcgttgg	aaccggagct	gaatgaagcc	atcccaaacg	720
acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggcaacaa	gttgcgcgaa	ctattaactg	780
gggaactact	tactctagct	tcocggcaac	aattaataga	ctggatggag	gcggataaag	840
ttgcaggacc	actttcgcgc	tcggcccttc	cggttggtcg	gtttattgct	gataaatctg	900
gagccggtga	gcgtgggtct	cgcggtatca	tgcagcact	ggggccagat	ggtaaagcct	960
cccgtatcgt	agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac	1020
agatcgtgta	gataggtgac	tcactgatta	agcattggta	actgtcagac	caagtttact	1080
catatatact	ttgagttgat	ttaaaacttc	atttttaatt	taaaaggatc	taggatgaag	1140
tcctttttga	taatctcatg	accaaaatcc	cttaacgtga	gttttcgttc	cactgagcgt	1200
cagaccccg	agaaaagata	aaaggatctt	cttgagatcc	ttttttctg	cgctaatct	1260
gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgg	ttgtttgcgc	gatcaagagc	1320
taccaactct	ttttccgaag	gttaactggc	tcagcagagc	gcagatacca	aatactgtcc	1380
ttctagtgtg	gccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	cctacatacc	1440
tcgctctgct	aactctgtta	ccagtggtcg	ctgccagtg	cgataagtcg	tgtcttaccg	1500
gggttgactc	aagacgatag	ttaccggata	agggcgagcg	gtcgggctga	acgggggggt	1560
cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	cctacaccca	actgagatac	ctacagcgtg	1620
agcatttgaga	aagcgcacgc	cttcccgaag	ggagaaaggg	ggacagggtat	cgggtaagcg	1680
gcagggtcgg	aacaggagag	cgcaagaggg	agcttcacag	gggaaacggc	tggtatcttt	1740
atagtctcgt	cgggtttcgc	caectctgac	ttgagcgtcg	atttttgatg	tgctcgtcag	1800
ggggggcggg	ccataggaaa	aacgccagca	acggcgctct	tttacgggtc	ctggcctttt	1860
gctggccttt	tgtctacatg	ttctttctct	cgttatcccc	tgattctctg	gataaccgta	1920
ttaccgcctt	tgagtgaagt	gataccgctc	ccgcagcccg	aacgacccag	cgcagcaggt	1980
cagttagcga	ggaaagcggaa	gagcgcctca	taagcaaac	gcctctcccc	gdcggttggc	2040
cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	ttcccgaact	gaaagcgggc	agtgaagcga	2100
acgcaattaa	tgtgagttag	ctcactcatt	aggcaccoca	ggctttacac	tttatgcttc	2160
cggctcgtat	gttgtgtgga	attgtgagcg	gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	2220
accatgatta	cgcgaagcta	gtcgacataa	atcaatattg	gtatttggcc	attgcatacg	2280
ttgtatctat	atcataatat	gtacatttat	attggctcat	gtccaatatg	accgccatgt	2340
tgacattgat	tattgactag	ttattaatag	taaccaatta	cggggctcatt	agttcatagc	2400
ccatataatg	agttccgcgt	tacataactt	acggtaaatg	gcccgcctcg	tgaccgccca	2460
acgaccccg	cccattgacg	tcaataatga	cgtatgttcc	catagtaacg	ccaataggga	2520
ctttccattg	acgtcaatgg	gtggagttat	tacggtaaac	tgcccacttg	gcagtacatc	2580
aagtgtatca	tatgccaaagt	ccggccccc	attgaagtea	atgaaggtaa	atggcccgcc	2640
tggcattatg	cccagtacat	gaccttacgg	gactttccct	cttggcagta	catctacgta	2700
ttagtcatcg	ctattaccct	gggtgatgcg	ttttggcagt	acaccaatgg	gcgtggatag	2760
cggtttgact	cacggggatt	tccaagctct	caccccattg	acgtcaatgg	gagtttggtt	2820
tggcaccaaa	atcaacggga	ctttccaaaa	tgtcgttaata	accccgcccc	gttgacgcaa	2880
atggggcgga	ggcgtgtacg	gtgggaggtc	tatataagca	gagctcgttt	agtgacccgt	2940
cagatcgctc	ggagacgcda	tccacgctgt	tttgacctcc	atagaagaca	ccgggaccga	3000
tccagcctcc	gcgcccgggg	acgggtgcatt	ggaacgcgga	ttccccgtgc	caagagtgc	3060

```

gtaagtacgg cctatagact ctataggcac acccctttgg ctcttatgea tgctatactg 3120
tttttggttt ggggcctata caccctcgct ccttatgcta taggtgatgg tatagcttag 3180
cctataggtg tgggttattg accattattg accactcccc tattgggtga gatactttcc 3240
attactaatc cataaatgg ctctttgcca caactatctc tattggctat atgccaatac 3300
tctgtccttc agagactgac acggactctg tttttttaca ggatggggtc ccattttatta 3360
tttacaattt cactatatac acacgcgcgt ccccggtgcc cgcagttttt attaaacata 3420
gcytggggtc tccacgcgaa tctcgggtac gtgttcggga catgggctct tctccggtag 3480
cggcgaggct tccacatccg agccctggtc ccattgctcc agcggctcat ggtcgcctcg 3540
cagctccttg ctccaaacag tggaggccag acttagggac agcaccaatgc ccaccaccac 3600
cagtgctccg cacaaggccg tggcggtagg gtatgtgtct gaaaatgagc tcggagattg 3660
ggctcgcacc gtgcgcaga tggaaagcct aaggcagcgg cagaagaaga tgcaggcagc 3720
tgagttgttg tattctgata agagtcagag gtaactcccc ttgcgggtgc gttaacgggtg 3780
gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt gctgcgcgcg gcgccaccag acataatagc 3840
tgacagacta acagactgtt cctttccatg ggtcttttct gcagtcaccc tccaaacctg 3900
caatcatgga tgcaatgaag agagggctct cctgtgtgct gctgctgtgt ggagcagctc 3960
tcgtttccgg tagcaatgat gataagttat atcgggcaga ttctagacct cctgatgaaa 4020
taagcagctc aggtggtctt atgccaagag gacagagtga gtactttgac cggagttactc 4080
aatgaatat caacctttat gatcatgcaa gaggaactca gacgggattt gttaggcaag 4140
atgatggata tgtttccacc tcaattagtt tgagaagtgc ccacttagtg ggtcaaaacta 4200
tattgtctgg tcattctact tattatatat atgtttatagc cactgcaccc aacatgttta 4260
acgttaatga tgtactaggg gcatacagtc ctcatccaga tgaacaagaa gttctctgctt 4320
taggtgggat tccatctctc caaatatatg gatggtatcg agttcatttt ggggtgcttg 4380
atgaacaatt acatcgtaat aggggctaca gagatagata ttacagtaac ttatgatttg 4440
ctccagcagc agatggttat ggattggcag gtttccctcc ggagcataga gcttggaggg 4500
aagagccgtg gattcatcat gcacgcgcgg gttgtgggaa tgctccaaga tcctcgatga 4560
gtaatacttg cagtgaaaaa acccaaagtc taggtgtasa attccttgac gaataccaat 4620
ctaaagttaa aagacaaata ttttcaggct atcaatctga tattgataca cataatagaa 4680
tttgaggatc ctgcgaatcc ctaggaggat taggcaaggc ettgagctca cgtctttgtg 4740
agggacagaa atacaatcag gggcagtata tgaatactcc atggagaaac ccagatctac 4800
gtatgatcag cctcgactgt gccttctagt tgcagccat ctgttgtttg cccctcccc 4860
gtgccttctt tgacctgga aggtgccact cccactgtcc ttctctaata aaatgaggaa 4920
attgcacgcg attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtggggt ggggcaggac 4980
agcaaggggg aggatbtggg agacaatagc aggcattgct gggatgcggt gggctctatg 5040
gcttctgagg cggaaagaac cagctggggc tcgacagctc gactctagaa ttcactggcc 5100
gtcgttttac aacgtctgga ctgggaaaaa cctggcgtta cccaacttaa tcgccttgca 5160
gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc 5220
caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgcctgatgc ggtattttct ccttaegcat 5280
ctgtgcggta tttcacaccc catatgggtc actctcagta caatctgctc tgatgccgca 5340
tagttaagcc agccccgaca cccgccasca cccgtgacg cgccttgacg ggcttgtctg 5400
ctccccgat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg 5460
ttttcacctg catcacgcaa acggcgga 5488

```

<210> 4
 <211> 5500
 <212> DNA
 <213> plasmid pPJV2004

<400> 4

```

gacgaagggt cctcgtgata cgcctatatt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60
cttagacgtc aggtggcaat ttccggggaa atgtgcgcgg aacctctatt tgtttatttt 120
tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata acctgataa atgcttcaat 180
aatattgaaa aagggaagagc atgagratte aacatttccg tgtcgccttc attccctttc 240

```

ttgcggcatt	ttgccttctt	gtttttgtct	accagaaaac	gctgggtgaa	gtaaaagatg	300
ctgaagatca	gtttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaaat	ggatctcaac	agcggtaaga	350
ttcttgagag	tttccgcccc	gaagaacgtt	ttccaatgat	gagcaacttt	aaagttctgc	420
tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg	ccgggcaaga	gcaactcggc	cgcgcataac	480
actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	cttacggatg	540
gcattgacgt	aagagaatta	tgcagtgtct	ccataaacat	gagtgaatac	actgcggcca	600
acttacttct	gacaacgata	ggaggaccga	aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg	660
gggatcatgt	aactcgccct	gacgttgyg	aaccyggagt	gaatgaagcc	ataccaaaag	720
acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggcaacaac	gttgcgcaaa	ctattaatcg	780
gcgaactact	tactctagct	tcccggcac	aattaataga	ctggatggag	gcggataaag	840
ttgcaggacc	acttctggcg	tggcccttcc	cggctggctg	gtttattgct	gataaatctg	900
gagccgggtg	ggctgggtct	cgcggtatca	ttgcagcaat	ggggccagat	ggtaagccct	960
cccgctatcgt	agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac	1020
agatcgctga	gatagggtgc	tcactgatta	agcattggta	actgtcagac	caagtttact	1080
catatatact	ttagattgat	ttaaaacttc	atrttttaatt	caaaaggtac	taggtgaaga	1140
tcctttttga	taatctcatg	acaaaaatcc	cttaacgtga	gttttcgttc	caactgagcg	1200
cagaccocgt	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	tttttttctg	cgcgtaatct	1260
gctgcttgca	aaacaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgg	ttgtttgcgg	gatcaagagc	1320
taccaactct	ttttccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	gcagatacca	ataactgtcc	1380
ttctagtgta	gcgtagtata	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	ctacataacc	1440
tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtgggtg	ctgccagtgg	cgataagtcg	tgtcttaccg	1500
ggtttgactc	aagacgatag	ttaccggata	agggcgagcg	gtcgggtctg	acgggggggt	1560
cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaaaga	actacaccca	actgagatac	ctacagcgtg	1620
agcatttgaga	aagcgccacg	cttcccgaa	ggagaaagcc	ggacaggtat	ccggtaaagc	1680
gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaacgcgc	tgggtatctt	1740
atagtcctgt	cgggttttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atrttttgtga	tgctcgtcag	1800
ggggggcggag	cctatggaaa	aacgccagca	acggggcctt	tttaeggttc	ctggcccttt	1860
cctggccctt	tgctcaatg	ttctttctct	cgttatcccc	tgattctgtg	gataacogta	1920
ttaccgcctt	tgagttagct	gataccgctc	gcccagcccg	aacgacccag	cgcagcgtg	1980
cagttagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaaac	gcctctcccc	gcgcgttggc	2040
cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	ttcccgaact	gaaagcgggc	agtgaagcca	2100
acgcaattaa	tgtgagttag	ctcactcatt	agggcacocca	ggcttttacac	tttatgcttc	2160
cggctcgtat	gttgtgtgga	atttgtgagc	gataaacaatt	tcacacagga	aacagcttat	2220
accatgatta	gcccgaagta	gtcgacataa	atcaaatatt	gctatttgcc	attgcatacg	2280
ttgtatctac	atcataatat	gtacatttat	attggtctat	gtccaatatg	acggccatgt	2340
tgacattgat	tattgactag	ttattaatag	taatcaatta	cgggggtcatt	agttcatagc	2400
ccatatacgg	agttcccgct	tacataactt	acggtaaatg	gcccgcctcg	tgaccgccca	2460
acgacccccg	cccattgacg	tcaataatga	cgtatgtttc	catagtaacg	ccaataggga	2520
ctttccattg	acgtcaatgg	gtggagtatt	tacggtaaac	tgcccacttg	gcagtacatc	2580
aagtgtatca	tatgccaaat	cggcccccct	attgacgtca	atgacggtaa	atggcccgcc	2640
tggcattatg	cccagtagat	gaccttacgg	gactttctca	cttggcagta	catctacgta	2700
ttagtcatcg	ctattaccat	ggtgatgcgg	ttttggcagt	acaccaatgg	gcgtggatag	2760
cggtttgact	cacggggatt	tccaagtctc	caccccattg	acgtcaatgg	gagtttgttt	2820
tggccccaaa	atcaacggga	ctttccaaaa	tgtcgttaata	accccgcgcc	gttgaagcaa	2880
atgggcggta	ggcgtgtacg	gtgggaggtc	tatataagca	gagctcgttt	agtgaacogt	2940
cagatcgctt	ggagacggca	tccacgctgt	tttgacctcc	atagaagaca	ccgggaccca	3000
tccagcctcc	gcggccggga	acgggtgcatt	ggaacggcga	ttccccgtgc	caagagtgac	3060
gtaagtaccg	cctatagact	ctataggcac	acccccttgg	ctcttatgca	tgcataactg	3120
tttttggctt	ggggcctata	caccccogct	ccttatgcta	tagggtgatg	tatagcttag	3180
cctatagggt	tgggttattg	accattattg	acacctcccc	tattgggtgac	gatacttttc	3240
attactaate	cataacatgg	ctcttttgca	caactatctc	tattggctat	atgccaatad	3300
tctgtctctt	agagactgac	acggactctg	tatttttaca	ggatggggtc	ccatttatta	3360

```

tttcaaaatt cccatataca acaacgcggt cccccgtgcc cgcagttttt attaaacata 3420
gcgtgggata tccacggaga tctcgggtac gtgtcccgga catgggctct tctccggtag 3480
cggcggagct tccacatccg agccctggtc ccatgcctcc agcggctcat ggteggctcg 3540
cagctccttg ctctaacag tggaggccag acttaggcac agcacatgc caccaccac 3600
cagtgtgcc cacaaggccg tggcggtagg gtatgtgtct gaaaatgagc tcggagattg 3660
ggctcgcacc gtgacgcaga tgggaagactt aaggcagcgg cagaagaaga tgcaggcagc 3720
tgagttgttg tattctgata agagtcagag gtaactcccg ttgcgggtgt 3780
gagggcagtg tagtetgagc agtactcgtt gctgcgcgc gcgcaccag acataatagc 3840
tgacagacta acagactggt cctttccatg ggtcttttct gcagtcacag tccaagcttg 3900
caatcatgga tgcaatgaag agagggtctt gctgtgtgtt gctgtgtgtt ggagcagctt 3960
tcgtttcggc tagcaatggt gacaaattat accgtgtgtg ctctagaccc ccagatgaaa 4020
taaaacggtt cggaggtctt atgccagag gccataatga gtaactcgat agaggacttc 4080
aaatgaatat taacttttat gatcacgcga gaggaaacac aaccggcttt gtcagatatg 4140
atgacggata tcttccact tetcttagtt tgagaagtgc tcaattagca ggacagtcta 4200
tattatcagg atattccact tactatatac atgttatagc gacagcacca aatatgttta 4260
atgttaatga tctattagc gtatacagcc ctacccata tgaaacaggag gtttctgctt 4320
taggtggaat accatatctt cagatatatg gatgtatcg tgttaatttt ggtgtgattg 4380
atgaacgatt acatcgtaac ggggaatata gagacgggta ttacagaaat ctgaatatag 4440
ctccggcaga ggtatggttac agattagcag gtttccacc ggtcaccaa gcttgagag 4500
aagaacccctg gattcatcat gcaccacaa gtttgtggaan ttcatacaga acaattacag 4560
gtgatacttg taatgaggag accagaatc tgagcacaa atatctcagg aaatatcaat 4620
caaaagttaa gaggcagata ttttcagact atcagtcaga ggttgacata tataacagaa 4680
ttcgggatga attatagga tctcgcgaat ccttaggagg attaggcaag ggcttgagct 4740
cagctctctg tgagggacag aaatacaatc aggggcagta tatgaatctt ccatggagaa 4800
accagatctt acgtatgac agcctcgaat gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt 4860
tgccctctcc cgtgccttc cttagacctg gaagggtcca ctccactgt cctttcctaa 4920
taaaatgagg aaattgcac gcattgtctg agtaggtgtc atctattctt ggggggtggg 4980
gtggggcagg acagcaagg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgag 5040
gtgggtctta tggcttctga ggcgaaaga accagctggg gctcgacagc tcgactctag 5100
aattcactgg cgtcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt taccsactt 5160
aatcgccttg cagcacatcc ccttttcgct agctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc 5220
gatcgccttt cccaacagtt ggcagcctg aatggcgaat ggcgcctgat ggcgtatttt 5280
ctccttacgc atctgtgcg tatttcacac cgcataatgt gcactctcag tacaatctgc 5340
ctatagcgc catagttac ccagcccgca caccgcgtga cgcgcctga cgcgcctga 5400
cggccttgtc tgcctccggc atcgcgttac agacaagctg tgadcgctc cgggagctgc 5460
atgtgtcaga ggttttcacc gtcatcaccg aaacgcgcga 5500

```

<210> 5

<211> 5089

<212> DNA

<213> plasmid pPUV2005

<400> 5

```

gaagaaagg cctcgtgata cgcctatttt tatagggttaa tgcctatgata ataattggtt 60
cttagagctc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacctctatt tgtttatttt 120
tctaatata ttcaaatatg tatcgcctca tgagacaata accctgataa atgttcaat 180
aatattgaaa aggaagagt atgagtattc aacatttccg tgcgcctctt attcctttt 240
ttgcggcatt ttgccttctt gtttttgctc accagaaaac gctgggtgaa gtaaaagatg 300
ctgaagatca gttgggtgna acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360
tccttgagag ttttcgccc gaagaacgtt tccaatgat gagcatttt aaagtctctg 420
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg ccgcgcatac 480
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540
gcattgacag aagagaatta tgcagtgtct ccataacctt gattgataac actgcggcca 600

```

aactacttct	gacaacgac	ggaggagcga	aggagccta	cgtttttttg	cacaacatgg	660
gggatcatgt	aactcgcctt	gacggttggg	aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaacg	720
acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggcaacaa	gttcgcgcaa	ctattaactg	780
gcgaactact	tactctagct	tccggcgca	aattaataga	ctggatggag	gcggataaag	840
ttgcaggacc	acttctgcgc	tccggccctt	cggctggctg	gtttattgct	gataaatctg	900
gagccgggtg	gcgtgggtct	cggggatcca	ttgcagcact	ggggccagat	ggttaagcct	960
ccgctatcgt	agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaataagac	1020
agatcgctga	gatagggtgc	tcactgatta	aggattggta	actgtcagac	caagtttact	1080
catatatact	ttagattgat	ttaaaacttc	atttttaatt	taaaaggatc	taggtgaaga	1140
tcctttttga	taatctcatg	acaaaaatcc	cttaacgtga	gttttcgttc	cactgagcgt	1200
cagaccccg	agaaaagatc	aaaggatcct	cttgagatcc	tttttttctg	cgcgttaact	1260
gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgt	ttgtttgcgc	gatcaagagt	1320
tacaaactct	ttttccgaag	gtaactggct	ccagcagagc	gcagatacca	aatactgtcc	1380
ttctagtgtg	gccttagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtaggaccg	cctacatacc	1440
tcgctctgct	aatctctgta	ccagtggctg	ctgcacgtgg	cgataagctg	tgtcttaccg	1500
ggttggactc	aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggctga	acgggggggt	1560
cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	ccacacccga	actgagatcc	ctacagcgtg	1620
agcattgaga	aagcgcacag	cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacaggat	ccggtaaagc	1680
gcaggggtcg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttcacgg	gggaacggcc	tggatctctt	1740
atagtcctgt	cgggtttcgc	ccctcttgac	ttgagcgtcg	atttttctga	tgtctgtcag	1800
ggggggcggg	cctatggaaa	aaagccagca	acggggcctt	tttaaggctc	ctggcctctt	1860
gctggccttt	tgtccacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	gataaacgta	1920
ttaccgcctt	tgagtgagct	gatcccgctc	gcgcgagccg	aacgaccgag	cgcagcaggt	1980
cagtggcgga	ggaagcggaa	gagcgcacca	tacgcaaac	gcctctcccc	gcgcgttggc	2040
cgaatcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	ttcccgaactg	gaaagcgggc	agtgaagcca	2100
acgcaattaa	tgtgagttag	ctcactcatt	aggcacccca	ggcttttac	tttatgcttc	2160
cggctcgtat	gtttgttgga	attgtgagcg	gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	2220
accatgatta	cgcacagcta	gtccacataa	atcaatatgg	gtatttggcc	attgcatacg	2280
ttgtatctat	atcataabat	gtacatttat	attggctcat	gtccaatatg	accgccatgt	2340
tgacattgat	tattgactag	ttattaatag	taatacaatta	cgggggtcatt	agttcatagc	2400
ccatataatg	agttccgcgt	tacataactt	acggtaaagt	gcccgcctcg	tgaccgcaca	2460
acgaaccccg	ccatttgacg	tcaataatga	cgtatgttcc	catagtaacg	ccaataggga	2520
ccttccattt	acgtcaatgg	gtggagtatt	tacggtaaac	tgcccacttg	gcagttacatc	2580
aagtgtatca	tatgccaagt	cgggcccctt	attgacgtca	atgacggtaa	atggcccgcc	2640
tggcahtatg	cccagtaaat	gaccttaacg	gactttccta	cttggcagta	catctacgta	2700
ttagtcatcg	ctattaccat	ggtgatgcgg	ttttggcagt	acaccaatgg	gcgtggatag	2760
cggtttgact	cacgggggatt	tccaagtctc	caccocattg	acgtcaatgg	gagtttgttt	2820
tggcaccaaa	atcaacggga	ctttccaaaa	tgctgtaata	accccgcccc	gttgacgcaa	2880
atgggcggga	ggcgtgtacg	gtgggaggtc	tataaagca	gagctcgttt	agtgaacogt	2940
cagatcgctt	ggagacggca	tccaacgtgt	tttgacctcc	atagaagaca	ccgggaccca	3000
tccagcctcc	gcggccggga	acggtgcatt	ggaacgggga	ttcccctgtc	caagagtga	3060
gtaagtacgg	cctatagact	ctataggcac	accccttttg	ctcttatgca	tgcataactg	3120
tttttggctt	ggggcctata	cacccgcgct	ccttatgcta	taggtgatgg	tatagcttag	3180
cctatagggtg	tggtgttatg	accatttatg	accactcccc	tattgggtgac	gatactttcc	3240
attactaatc	cataacatgg	ctcttttgca	caactatctc	tattggctat	atgcaaatac	3300
tctgtccttc	agagactgac	acggactctg	tatttttaaa	ggatggggtc	ccatttatta	3360
tttacaastt	catatataca	acaacggcgt	cccccgtgac	cgcagttttt	attaaacata	3420
gcgtgggata	tccacgcgaa	tctgggttac	gtgttcggga	catgggctct	tctccggtag	3480
cggcggagct	tccacatccg	agccctggtc	ccatgcctcc	agcggctcat	ggtcgtctcg	3540
cagctccttg	ctcctaaacg	tggaggccag	acttaggcac	agcacatgac	ccaccaccac	3600
cagtggtcgg	cacaaggccg	tggcggtagg	gtatgtgtct	gaaastgagc	tccgagattg	3660
ggctcgcacc	gtgacgcaga	tggaaagact	aaggcagcgg	cagaagaaga	tcagggcagc	3720


```

tgagttgttg tattctgata agagtcagag gtaactcccg ttgcggtgct gttaacggtg 3780
gagggcagtg tagtctgagc agtaactcgtt gctgcgcgcg gcgccaccag acataataga 3840
tgacagacta acagactggt cctttccatg ggtcttttct gcagtcaccg tccaagcttg 3900
caatcatgga tgcattgaag agagggctct gctgtgtgct gctgctgtgt ggagcagctc 3960
tcgtttcggc tagcgctccc cagtcctatta cagaactatg ttcggaatat cgcacacac 4020
aatatataac gataaatgac aagatactat catatacgga atcgatggca ggcaaaagag 4080
aaatggttat attacatttt aagagcggcg caacatttca ggtcgaagtc ccgggcagtc 4140
aacatataga ctcacaaaaa aaagccattg aaaggatgaa ggacacatta agaattccat 4200
atctgaccca gacaaaaatt gabaatttat gtttatgga taataaaacc cccaattcaa 4260
ttgcggcaat cagtatggaa aactagggat cctcgcaatc cctaggagga ttagggcaagg 4320
gcttgagctc accgtcttgt gagggacaga aatacaatca ggggcagtat atgaatactc 4380
catggagaaa ccagatctca cgtatgata gectcgactg tgccttctag ttgccagcca 4440
tctgttgttt cccctccccc cgtgccttcc ttgacctgg aagggtgccac tccactgttc 4500
ctttcccaat aaaatgagga aattgcctcg cattgtctga gtaggtgtca ttatattctg 4560
gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggtatggg aagacaatag cgggcagctc 4620
ggggatggcg tgggtctcat ggtctctgag ggggaagaa ccagctgggg ctccgacagc 4680
cgactctaga attcaactgg cgtcgtttta caacgtctgt actgggaaaa ccttggcttt 4740
acccaactta atgccttgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa tagcgagag 4800
gcccgcaacc atgccttcc ccaacagttg cgcagcctga atggcgatg gcgctgatg 4860
cggtattttc tccctaccca tctgtggcgt atttcacacc gcataatggt cactctcagt 4920
acaaatctgt ctgatggcgc atagtttaagc cagcccgac acccgcaac accgctgac 4980
ggcgcctgac ggccttgtct gctcccgcca tccgtttaca gacaagctgt gacgctctc 5040
gggagctgca tgtgtcagag gtttccacc tcatcaccga aacggcgga 5089

```

<210> 6

<211> 5488

<212> DNA

<213> plasmid pPJV2007

<400> 6

```

gacgaagggg cctcgtgata cgcctatctt tataggttaa tgtcatgata ataattggtt 60
cttagacgtc eggtygcact ttccggggaa atgtgcyggg aacccctatt tgtttatctt 120
ctcaaatata ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180
aatattgaaa aaggaagagt atgagttatc aacatttcgg tgtcgccttt attccctttt 240
ttgcggcatt ttgccttctt gtttttgcct acccagaacc gctggtgaaa gtaaaagatg 300
ctgaagatca gttgggtgca cagatggggt acatcgaact ggtatctaac agcggtaaga 360
tccttgagag ttttcgcccc gaagaaaggt ttccaargat gagcactttt aaagtctctc 420
tatgtggcgc ggtatttatc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg ccgcgcatac 480
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttaacggatg 540
gcattgacgt aagagaatta tgccgtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600
acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgttttttg caccascatgg 660
gggatcctgt aactgccttt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaaag 720
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctatttaactg 780
gcgaactact tactctagct tcccggaacc aattaataga ctggatggag gcggataaag 840
ttgcaggacc acttctgccc tccggccctc cggctggctg gttttattgt gataaatctg 900
gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggcagat ggttaagccct 960
cccgatatct agttatctac acgacgggga ttcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020
agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080
catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200
cagaccocgt agaaaagatc aaaggatctt cttagatccc ttttttctg ccgctaactc 1260
gctgcttgca ggccttgtct cagcgtgggt ttgtttgccg gatcaagagc 1320
taaccactct ttttcgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380

```

ttctagtgtt	gcccagtgta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	cctacatacc	1440
tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggttg	ctgccagtgg	cgataagtcg	tgtcttaccg	1500
ggctgggctc	aagacgatat	ttaccgggata	agggcgacgg	gtcgggctga	acgggggggtt	1560
cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaaaga	octacaccca	actgagatac	ctacagcgtg	1620
agcatttgaga	aagcgccacg	cttcccgaag	ggagaaaagg	ggacaggtat	ccggtaagcg	1680
gcagggctcg	aacaggayag	cgcacgaggg	agcttcacgg	gggaaacgcc	tggatctctt	1740
atagtcctgt	cggttttcgc	cactctctga	ttgagcgtcg	atctttgtga	tgctcgtcag	1800
gggggcggag	cctatggaaa	aacgcacaga	acggggcctt	tttacgggtc	ctggcctttt	1860
gntgggcttt	tgtccacatg	ttctttcttg	cgttatcccc	tgattctctg	gataaccgta	1920
ttaccgcctt	tgagttagct	gataccgctc	gcccagcccg	aacgaccgag	cgcagcgagt	1980
cagttagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaac	gcctctcccc	gcgcgttggc	2040
cgattccatta	atgcagctgg	cargacaggt	ttcccgaactg	gaaagcgggc	agtgagcgca	2100
acgcaattaa	tgtgagttag	ctcactcatt	agggccccca	ggctttacac	tttatgcttc	2160
cggctcgrat	gttgtgtgga	attgtgagcg	gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	2220
accttgatta	cgccaagcta	gtcgacataa	atcaatattg	gctactggcc	attgcatacg	2280
ttgtatctat	atcataatat	gtacatttat	attggctcat	gtccaatatg	accgccatgt	2340
tgacattgat	tattgactag	ttattaatag	taatcaatka	cggggtcatt	agttcatagc	2400
ccatataatg	agttccgcgt	tacataactt	acggtaaatg	gcccgcctcg	tgaccgcca	2460
acgacccccg	cccattgaag	tcataaatga	cgtatgttcc	catagtaacg	ccaataggga	2520
ctttccattg	acgtcaatgg	gtggagtatt	tacggtaaac	tgcccacttg	gcagtacatc	2580
aagtgtatca	tatgccaaat	cggccccctt	attgacgtca	atgacggtaa	atggccccgc	2640
ttgcaattat	cccagtaaat	gaccttaagg	gaatttccta	cttggcagta	catctacgta	2700
tttgtcatcg	ctattaccat	ggtagatggg	ttttggcagt	acaccaatgg	gcgtggatag	2760
cgytttgact	caeggggatt	tcacagtctc	caccccattg	acgtcaatgg	gagtttcttt	2820
tgggacccaa	atcaacggga	ctttccaaaa	tgctcgtata	accccgcgcc	gttgacgcaa	2880
atgggcggta	ggcgtgtacg	gtgggaggtc	tatataagca	gagctcgttt	agtgaaccgt	2940
cagatgcctc	ggagacgcca	tcacgcgtgt	tttgacctcc	atagaagaca	ccgggacgca	3000
tcacgcctcc	ggggccggga	acgggtgcatt	ggaacgcgga	ttcccgcgtc	caagagtgc	3060
gtaagtaccg	cctatagact	ctataggcac	accccttggg	ctcttatgca	tgctatactg	3120
ttttctggct	ggggcctata	cacccccgct	ccttatgcta	taggtgatgg	tatagcttag	3180
cctatagggt	tggtttatbg	accattattg	accactcccc	tattggtgac	gatactttcc	3240
artacaatec	cataacatgg	ctctttgcra	caactatctc	tattggtcat	atgccaatac	3300
tctgtccttc	agagactgac	acggactctg	tatttttaca	ggatggggtc	ccattttatta	3360
tttacaattt	cacatataca	acaacgcctg	cccccgctgc	cgagtttttt	attaaacata	3420
gcgtgggacc	tcacgcgcaa	tctcgggtac	gtgttcggga	catgggctct	tctcgggtag	3480
cggcggagct	tcacatcccg	agccctggtc	ccatgcctcc	agcggctcat	ggtcgcctgg	3540
cagctccttg	ctcttaacag	tgaggccag	acttaggcac	agcacaatgc	ccaccaccac	3600
cagtgtgccc	cacaaggccg	tggcggtagg	gtatgtgtct	gaaaatgagc	tcggagattg	3660
ggctcgcacc	gtgaacgaga	tggagacttt	aaggcagcgg	cagaagaaga	tcgaggcagc	3720
tgagtctgtg	tattctgata	agagtcagag	gtaactcccc	ttgcggtgct	gttaacgggtg	3780
gagggcagtg	tagtctgagc	agtaactcgt	gctgcgcgcg	gcgccaccag	acataatagc	3840
tgacagaeta	acagactgtt	cctttccatg	gggtctctct	gcagtcaccc	tccaagcttg	3900
caatcatgga	tgcaatgaag	agagggctct	gctgtgtgct	gctgtgtgtg	ggagcagctc	3960
tcgtttccgg	tagcaatggc	gacaaattat	accggtgctg	ctcttagacc	ccagatgaaa	4020
taaaacgctc	cggaggtctt	atgcaccagat	ggcataatga	gtacttcgat	agaggaactc	4080
aaatgaatat	taatctttat	gabcacggga	gaggaacaca	aaacggcttt	gtcagatattg	4140
atgacggata	tggtttccact	tctcttagtt	tgagaagtgc	tcacttagca	ggacagctca	4200
tattatccagg	atattccact	tactatatat	atgttatagc	gacagcacca	aatatgttta	4260
atgttaatga	tgtattgggc	gtatcacagc	ctcaccata	tgaacaggag	gtttctgcgt	4320
taggtgggaat	accatattct	cagatatatg	gatggtatcg	tgtttaatttt	ggtgtgattg	4380
atgaacgatt	acatcgtaac	agggaaatata	gagaccggtc	ttacagaaat	ctgaatatag	4440
ctcgggcaga	ggatggttac	agattagcag	gtttcccacc	ggatcaccaa	gcttggagag	4500

```

aagaacccctg gattcatcat gcaccacaag gttgtggaaa ttcataaaga acaattacag 4550
gtgatacttg taatgaggag acccagaatc tgagcacaat atatctcagg aaatataaat 4620
caaaagttta gaggcagata ttttcagact atcagtcaga ggttgacata tataacagaa 4680
tttgaggatc ctgcgaatcc ctaggaggat taggcaaggg cttagagcca cgtctctgtg 4740
agggacagaa atacaatcag gggcagtata tgaatactcc atggagaaac ccagatctac 4800
gtatgatcag cctgcactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg cccctcccc 4860
gtgccttctc tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc ttctctaata aaatgaggaa 4920
attgcacgcg attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtggggg ggggcaggac 4980
agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcattgct gggatgcggg gggtctctat 5040
gcttctgagg cggaaagaac cagctggggc tcgacagctc gactctagaa ttcactggcc 5100
gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgtta cccaacttaa tgccttgc 5160
gcacatcccc ctctgcag ctggcgtaat agcgaagagg ccgcaccca tgcacctcc 5220
caacagtlgc ctagcctgaa tggcgaatgg cgcctgatgc ggtattttct ccttaacgat 5280
ctgtgcggta tttcacaccg catatggtgc actctcagta caatctgctc tcatgcgcga 5340
tagttaagcc agccccgaca cccgccacaa cccgctgaag cgcctgacg ggttctctg 5400
ctccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg 5460
ttttcacagt catcaaccga accgcgca

```

<210> 7

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: construção sintética

<400> 7

ggagctagca atgatgataa gttatatcgg 30

<210>8

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: construção sintética

<400> 8

cctggatcct cataattcat ccttaattct 30

<210> 9

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: construção sintética

<400> 9

ggagctagca cacctcaaaa tattactgat 30

<210> 10

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: construção sintética

<400> 10

cctggatcct taatttgcca tactaattgc 30

<210> 11

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: construção sintética

<400>11

cctggatcct caaattctat tatgtgtatc 30

<210> 12

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223>Descrição da Sequência Artificial: construção sintética

<400>12

ggagctagca atggcgacaa attataaccgt 30

<210> 13

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223>Descrição da sequência artificial: construção sintética

<400>13

cctggatcct cataattcat cccgaattct 30

<210> 14

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223>Descrição da sequência artificial: construção sintética

<400>14

ggagctagcg ctccccagtc tattacagaa 30

<210> 15

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223>Descrição da sequência artificial: construção sintética

<400> 15

cctggatccc tagttttcca tactgattgc 30

<210> 16

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223>Descrição da sequência artificial: construção sintética

<400> 16

cctggatcct caaattctgt tatatatgtc 30

<210> 17

<211> 65

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223>Descrição da sequência artificial: construção sintética

<400> 17

cccaagcttc caccatgagc cttctaaccg aggtcgaaac acctatcaga

aacgaatggg 60

agtgc 65

<210> 18

<211> 28

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223>Descrição da sequência artificial: construção sintética

<400> 18

cccggatcct tactccagct ctatgctg28

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>

<223>Descrição da sequência artificial: construção sintética

<400> 19
Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Glu Cys
1 5 10 15
Arg

<210> 20
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>

<223>Descrição da sequência artificial: construção sintética

<400> 20
Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu
1 5 10

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>

<223>Descrição da sequência artificial: construção sintética

<400> 21
Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Ile Thr Gly Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: construção sintética

<400> 22

	Arg	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala	Phe	Val	Thr	Ile
1				5					10	

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora muito cuidado tenha sido tomado na compilação das referências, erros e omissões não podem ser excluídos e o IEP não assume qualquer responsabilidade neste sentido.

Documentos de Patente citados na descrição

- US 5980898 A [0002]
- US 0143151 W [0019]
- US 5630796 A [0039]
- US 5865796 A [0039] [0142]
- US 5100792 A [0040]
- WO 8904669 A [0069]
- WO 9011089 A [0069]
- WO 9014436 A [0069]
- US 5378814 A [0069]
- US 5171568 A [0070]
- US 5219740 A [0082] [0082] [0082]
- US 5173414 A [0085]
- US 5139941 A [0085]
- WO 9201070 A [0085]
- WO 9303769 A [0085]
- US 5283185 A [0088]
- US 5527928 A [0088]
- WO 9011092 A [0088]
- WO 9115501 A [0088]
- WO 9526356 A [0088]
- WO 9318759 A [0088]
- WO 9319768 A [0088]
- US 5204253 A [0099]
- US 4945050 A [0099]

- US 5120657 A [0099]
- US 5149655 A [0099]
- WO 9748485 A [0102]
- WO 9424263 A [0105]
- WO 9604947 A [0105]
- WO 9612513 A [0105]
- WO 9620022 A [0105]
- US 5399346 A [0112]
- US 5580859 A [0112]
- US 5589466 A [0112]
- US 5733600 A [0142]
- US 9500780 W [0142]
- US 5780100 A [0142]
- US 5584807 A [0142]

Literatura não relacionada com patentes citada na descrição

- **Wang et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. • Particle Bombardment Technology for Gene Trans-90, 4156-4160 [0002] *fer. Oxford University Press*, 1994, 10-11 [0040]
- **Tang et al.** *Nature*, 1992, vol. 356, 152-154 [0002] • **Bixler et al.** *Adv. Exp. Med. Bio.*, 1989, vol. 251,
- **Ulmer et al.** *Science*, 1993, vol. 259, 1745-1749 175 [0045] [0002]
- **Constantino et al.** *Vaccine*, 1992 [0045]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* **Krueger et al.** *Clin. Microbiol. Rev.*, 1995, vol. 8, Manual. 1989 [0019] 34-47 [0055]
- *DNA Cloning: A Practical Approach*. vol. I, II [0019] • *Recombinant microbial ADP-ribosylating toxins of*
- *Oligonucleotide Synthesis*. 1984 [0019] *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae*, and enterotoxi-
- *A Practical Guide to Molecular Cloning*. 1984 [0019] *genetic Escherichia coli: structure, function and toxoid*
- *Fundamental Virology*. vol. I, 11[0019] *vaccine*

- development. **Bumette et al.** Bioprocess
- **Smith; Waterman.** *Advances in AppliedMathemat-* Technology.
1994, 185-203 [0055]
 - ics*, 1981, vol. 2, 482-489 [0037] • **Rappuoli et al**, *Int.*
Archiv. Allergy Immunol., 1995,
 - **Dayhoff.** Atlas of Protein Sequences and Structure. vol.
108,327-333 [0055] National Biomedical Research
Foundation, vol. 5,
 - **Rappuoli et al.** *Ad. Exp. Med. Bioi.*, 1996, vol. 397, 353-
358 [0037] 55-60 [0055]
 - **Gribskov.** *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 14 (6), • **Mullis**
et al, *Methods Enzymol.*, 1987, vol. 155, 6745-6763 [0037]
335-350 [0057]
 - Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues • **Edge.**
Nature, 1981, vol. 292, 756 [0060]
 - and Research Initiatives. Marcel Dekker, Inc, 1989 •
Nambair et al. *Science*, 1984, vol. 223, 1299 [0060][0039]
 - **Jay et al.** *J. Bioi. Chem.*, 1984, vol. 259,6311 [0060]
 - Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Appli- •
Dijkema et al. *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 761 [0063]
 - cations. Marcel Dekker Inc, 1987 [0039] • **Gorman et al**,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, vol. • Transdermal
Delivery of Drugs. CRC Press, 1987, 79, 6777 [0063] vol.
1-3 [0039]
 - **Boshart et al.** *Cell*, 1985, vol. 41, 521 [0063]
 - **Plotkin et al.** *Vaccines.* W.B. Saunders, 1994 [0068]
 - **Houghton et al**, *Hepatology*, 1991, vol. 14,381-388 [0069]
 - **Chee et al.** *Cytomegaloviruses.* Springer-Verlag, 1990,
125-169 [0070]
 - **McGeoch et al.** *J. Gen. Virol.*, 1988, vol. 69, 1531-1574
[0070]
 - **Baer et al**, *Nature*, 1984, vol. 310,207-211 [0070]
 - **Davison et al.** *J. Gen. Virol.*, 1986, vol. 67, 1759-1816
[0070]
 - **Myers et al.** Los Alamos Database. Los Alamos National

- Laboratory, 1992 [0071]
- **Modrow et al**, *J. virol.*, 1987, vol. 61, 570-578 [0071]
 - Virology. 1988 [0072]
 - Fundamental Virology. 1991 [0072]
 - **Hoyne et al**, *Immunology*, 1994, vol. 83, 190-195 [0076]
 - **Akdis et al**. *J. Clin. Invest.*, 1996, vol. 98, 1676-1683 [0076]
 - **Bauer et al**. *Clin. Exp. Immunol.*, 1997, vol. 107, 536-541 [0076]
 - **Cao et al**. *Immunology*, 1997, vol. 90, 46-51 [0076]
 - **Harris et al**. *Mol. Cell. Biol.*, 1986, vol. 6, 4650-4656 [0077]
 - GenBank. M14694 [0077]
 - **Sambrook; Fritsch; Maniatis**. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 1989, vol. I, II, I [0078] • DNA Cloning, Vols. 1985, vol. I, II [0078]
 - **J. M. Stewart; J. D. Young**. Solid Phase Peptide Synthesis. Pierce Chemical Co, 1984 [0078]
 - **G. Barany; R. B. Merrifield**. The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Academic Press, 1980, vol. 2, 3-254 [0078] • Principles of Peptide Synthesis. **M. Bodansky**. The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Springer-Verlag, 1984, vol. 1 [0078]
 - **Mann et al**. *Cell*, 1983, vol. 33, 153-159 [0082]
 - **Haj-Ahmad; Graham**. *J. Viral.*, 1986, vol. 57, 267-274 [0083]
 - **Bett et al**. *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 5911-5921 [0083]
 - **Mittereder et al**. *Human Gene Therapy*, 1994, vol. 5, 717-729 [0083]
 - **Seth et al**, *J. virol.*, 1994, vol. 68, 933-940 [0083]
 - **Barr et al** *Gene Therapy*, 1994, vol. 1, 51-58 [0083]
 - **Berkner, K.L.** *BioTechniques*, 1988, vol. 6, 616-629 [0083] 84
 - **rich et al**, *Human Gene Therapy*, 1993, vol. 4, 461-476 [0083]

- **Lebkowski et al.** *Molec. Cell. Bioi.*, 1988, vol. 8, 3988-3996 [0085]
- **Vincent et al.** *Vaccines*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990, 90 [0085]
- **Carter, B.J.** *Current Opinion in Biotechnology*, 1992, vol. 3, 533-539 [0085]
- **Muzyczka, N.** *Current Topics in Microbiol. and Immunol.*, 1992, vol. 158, 97-129 [0085]
- **Kotin, R.M.** *Human Gene Therapy*, 1994, vol. 5, 793-801 [0085]
- **Shelling; Smith.** *Gene Therapy*, 1994, vol. 1, 165-169 [0085]
- **Zhou et al.**, *J. Exp. Med.*, 1994, vol. 179, 1867-1875 [0085]
- REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES. Mack Pub. Co, 1991 [0087] [0101]
- *Liposomes: A Practical Approach*. RPC. IRL Press, 1990 [0088]
- **Feigner et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 7413-7416 [0088]
- **Malone et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 6077-6081 [0088]
- **Jeffery et al.**, *Pharm. Res.*, 1993, vol. 10, 362-368 [0089]
- **Brown et al.**, *Chemical Society Reviews*, 1980, vol. 9, 271-311 [0097]
- GenBank. 030053 [0122]
- **Chapman et al.**, *Nuc. Acids Res.*, 1991, vol. 19, 3979-3986 [0125]
- **Burke et al.**, *J. Bioi. Chem.*, 1986, vol. 261, 12574-12578 [0125]
- GenBank. AB011677 [0128] [0130]
- **Schmaljohn et al.** *J. Virol.*, 1997, vol. 71, 9563-9569 [0141] [0148] [0175]
- **Fuller et al.**, *Aids Res. Hum Retroviruses*, 1994, vol. 10, 1433 [0161] [0161]

- ATCC. 53069 [0161]
- GenBank. K02013 [0161]
- **Mizushima et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1990, vol. 18, 5322 [0176]
- Herpes simplex viruses and their replication. **Roizman; Sears et al**, *Fields Virology*. lippincott-Raven Publishers, 1996 [0207] 83

Lisboa, 20/11/2009

REIVINDICAÇÕES

1. Composição adjuvante compreendendo: (i) uma primeira sequência de ácidos nucleicos; (ii) uma segunda sequência de ácidos nucleicos; e (iii) elementos transportadores que formam um núcleo, em que: (a) a referida primeira sequência de ácidos nucleicos é uma região de codificação da subunidade A truncada obtida ou derivada de uma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação; (b) a referida segunda sequência de ácidos nucleicos é uma região de codificação da subunidade B truncada obtida ou derivada de uma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação; (c) as referidas primeira e segunda sequências de ácidos nucleicos estão revestidas nos elementos transportadores que formam um núcleo e estão ligadas operacionalmente, ou está cada uma ligada operacionalmente, a um promotor activo numa célula de mamífero; e (d) cada uma das referidas regiões de codificação de subunidades truncadas tem uma deleção 5', codifica um péptido da subunidade que não tem um péptido de sinal bacteriano amino terminal e está operacionalmente ligada a uma sequência líder para secreção a partir de uma célula de mamífero.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que a região de codificação da subunidade A truncada foi ainda geneticamente modificada para eliminar um motivo KDEL ou RDEL C-terminal no péptido da subunidade por ela codificado.

3. Composição adjuvante compreendendo: (i) uma primeira sequência de ácidos nucleicos; (ii) uma segunda sequência de ácidos nucleicos; e (iii) elementos transportadoras que formam um núcleo, em que: (a) a referida primeira sequência de ácidos nucleicos é uma

região de codificação da subunidade A modificada obtida ou derivada de uma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação; (b) a referida segunda sequência de ácidos nucleicos é uma região de codificação da subunidade B obtida ou derivada de uma exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação; (c) as referidas primeira e segunda sequências de ácidos nucleicos estão revestidas nos elementos transportadores que formam um núcleo e estão ligadas operacionalmente, ou está cada uma ligada operacionalmente, a um promotor activo numa célula de mamífero; e (d) cada uma das referidas região de codificação da subunidade A modificada e região de codificação da subunidade B codifica cada uma um péptido da subunidade maturo, e com a condição adicional de que a região de codificação da subunidade A modificada foi geneticamente modificada para causar a deleção de um motivo KDEL ou RDEL C-terminal no péptido da subunidade por ela codificado e está ligada operacionalmente a uma sequência líder para secreção a partir de uma célula de mamífero.

4. Composição de acordo com a reivindicação 3, em que a região de codificação da subunidade A modificada e a região de codificação da subunidade B foram cada uma delas truncadas por uma deleção 5' com o que cada uma das referidas regiões de codificação das subunidades truncadas codifica um péptido da subunidade que não tem um péptido de sinal bacteriano amino terminal.

5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a exotoxina bacteriana de ADP-ribosilação é uma enterotoxina termolábil (LT) de *E. coli*.

6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores compreendendo ainda um antigénio de interesse.

7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, compreendendo ainda uma terceira sequência de ácidos nucleicos que codifica um antígeno de interesse.

8. Composição de acordo com a reivindicação 6 ou 7, em que o antígeno é de um agente patogénico bacteriano, um agente patogénico viral, um agente patogénico parasitário, um alérgeno ou um antígeno específico de um tumor.

9. Composição de acordo com a reivindicação 8 em que o antígeno é de um vírus da gripe, vírus do herpes simplex (VHS), vírus da hepatite ou um papilomavírus.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, compreendendo ainda um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que a composição em partículas é adequada para administração transdérmica por meio de um dispositivo de administração de partículas.

12. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a partícula transportadora que forma um núcleo tem um diâmetro médio de 0,1 a 10 μm .

13. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a partícula transportadora que forma um núcleo compreende um metal.

14. Composição de acordo com a reivindicação 13 em que o metal é ouro.

15. Composição adjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 para utilização no aumento de uma resposta imune num indivíduo vertebrado contra um antigénio de interesse por administração do antigénio de interesse e da composição ao indivíduo.

16. Composição adjuvante de acordo com a reivindicação 15, em que o antigénio de interesse e a composição são administrados no mesmo sítio no indivíduo.

17. Composição adjuvante de acordo com a reivindicação 15 ou 16, em que o antigénio de interesse e a composição são administrados simultaneamente.

18. Composição adjuvante de acordo com a reivindicação 15, em que a composição compreende ainda o antigénio de interesse.

19. Composição adjuvante de acordo com a reivindicação 15, em que a composição compreende ainda uma terceira sequência de ácidos nucleicos que codifica o antigénio de interesse.

20. Composição adjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 19, em que o antigénio de interesse é de um agente patogénico bacteriano, um agente patogénico viral, um agente patogénico parasitário, um alergéneo ou um antigénio específico de um tumor.

21. Composição adjuvante de acordo com a reivindicação 20, em que o antigénio é de um vírus da gripe, vírus do herpes simplex (VHS), vírus da hepatite ou um papilomavírus.

22. Composição adjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 21, em que as partículas transportadoras que formam um núcleo são administradas ao indivíduo utilizando-se uma técnica de administração mediada por partículas.

23. Composição adjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 22, em que o indivíduo é um ser humano.

24. Produtos contendo uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 e um antigénio de interesse como uma preparação combinada para utilização simultânea, separada ou sequencial para aumentar uma resposta imune num indivíduo vertebrado contra o referido antigénio.

25. Dispositivo para administração de partículas para administração transdérmica que está carregado com uma composição em partículas de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13.

26. Dispositivo de acordo com a reivindicação 25 que é uma seringa sem agulha.

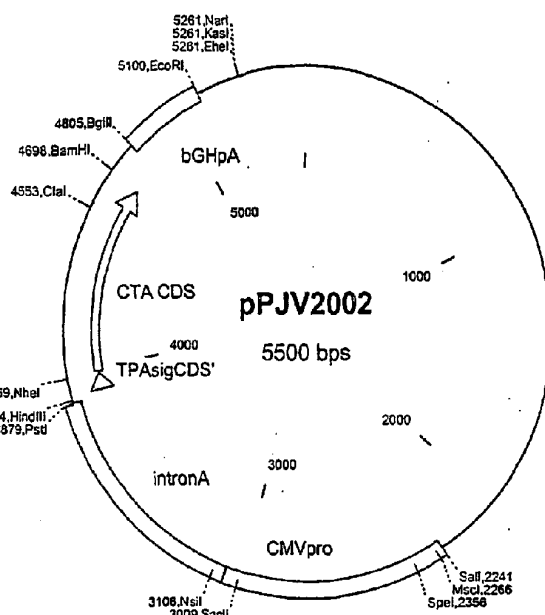
27. Recipiente de dose unitária individual ou multidoso fechado hermeticamente, adaptado para utilização num dispositivo de administração de partículas, compreendendo o referido recipiente uma composição adjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13.

28. Utilização de uma primeira e segunda sequências de ácidos nucleicos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 para o fabrico de um medicamento

para aumentar uma resposta imune num indivíduo vertebrado contra um antigénio de interesse por administração do antigénio de interesse e do medicamento ao indivíduo.

Lisboa, 20/11/2009

FIGURAS



Molécula: pPJV2002, 5500 Ph ADN circular

Nome Arquivo: pPJV2002.cm5,

Descrição: Ligação de frag. de FCR de CTA cortado com Nhe Bam no Vector Bam Nhe 7054

Notas:

Características da Molécula:

Tipo	Início	Fim	Nome	Descrição
REGIÃO	2242	3060	CMVpro	
REGIÃO	3061	3884	intronA	
GENE	3906	3969	TPAsigCDS'	
GENE	3975	4697	CTA CDS	
REGIÃO	4805	5101	bGHpA	

Enzimas (15 sítios)

SalI	2241,	MscI	2266,	SpeI	2356,	SacII	3009
NsiI	3108,	PstI	3879,	HindIII	3894,	NheI	3969
ClaI	4553,	BamHI	4698,	BglII	4805,	EcoRI	5100

Figura 1-1

```

1   GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTAA TGTCATGATA ATAATGGTTT
61  CTTAGACGTC AGGTGGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTTT
121 TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181 AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTGCGCCCTT ATTCCTTTTT
241 TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTTGTCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA
361 TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC
421 TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC
481 ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGTCT CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTGTG CACAACATGG
661 GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG
721 ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAC GTTGCACAAA CTATTAACTG
781 GCGAAGTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG
841 TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG
901 GAGCCCGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAAGCCTT
961 CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAAGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC
1021 AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACCTGATTA AGCATTGGTA ACTGTGAGAC CAAGTTTACT
1081 CATATATACT TTAGATTGAT TTAATACTTC ATTTTAAATT TAAAGGATC TAGGTGAAGA
1141 TCTTTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAAGCTGA GTTTTGTGTC CACTGAGCGT
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTGAGATCC TTTTTTCTG CGCGTAATCT
1261 GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TGTGTTGCCG GATCAAGAGC
1321 TGCAACTCTT TTTTCCGAAG GTAACCTGGT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC
1381 TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC
1441 TCCTCTGCTT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG
1501 GGTGTGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA ACGGGGGGTT
1561 CGTGACACCA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG
1621 AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG
1681 GCAGGGTCGG AACAGGAGAG CGCAGGAGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT
1741 ATAGTCTGCT CGGGTTTCCG CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGA TGTCTGTGAG
1801 GGGGCGGAG CTTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCGGCTTT TTACGGTTC CTGGCCTTTT
1861 GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCCTTCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA
1921 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGACGCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT
1981 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCA TACGCAAAAC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC
2041 CGATTCAATA ATGCAAGCTG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA
2101 ACACAATTA TGTGAGTTAG CTCACTCAT AGGCACCCCA GCCTTTACAC TTTATGCTTC
2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG
2221 ACCATGATTA CGCCAAGCTA GTCGACATA ATCAATATTG GTATTGGCC ATTGCATACG
2281 TGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTTAT ATTGGCTCAT GTCCAATATG ACCGCCATGT
2341 TGACATTGAT TATTGACTAG TTAATTAATG TAATCAATTA CGGGGTCAAT AGTTCATAGC
2401 CCATATATGG AGTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAAATG GCCCGCCTCG TGACCGCCCA
2461 ACGACCCCGC CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA
2521 CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTAT TACGGTAAAC TGCCCACTTG GCAGTACATC
2581 AAGTGATCA TATGCCAAGT CCGGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC
2641 TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTACGG GACTTTCTTA CTGGGCAGTA CATCTACGTA
2701 TTAGTCACTG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG
2761 CGGTTTGAAT CACGGGGATT TCCAGTCTC CACCCCATTG ACGTCAATGG GAGTTTGTTC
2821 TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTGTAATA ACCCCGCCCC GTTGACGCAA
2881 ATGGGCGGTA GGCGGTGACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTGAACCGT
2941 CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGACCGA
3001 TCCAGCCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCATT GGAACGCGGA TTCCCGGTGC CAAGAGTGAC
3061 GTAAGTACCG CCTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCTTTGG CTCTTATGCA TGCTATACTG
3121 TTTTGGCTT GGGGCCATTA CACCCCGCT CTTATGCTA TAGGTGATGG TATAGCTTAG
3181 CCTATAGTG TGGGTTATTG ACCATTATTG ACCACTCCCC TATTGGTGAC GATACTTTCC
3241 ATTACTAATC CATAACATGG CTCTTTGCCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCATAC
3301 TCTGCTCTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACA GGATGGGTC CCATTATTA
3361 TTTACAAAT CACATATACA ACAACGCCGT CCCCCTGCC CGCAGTTTTT ATTAACATA
3421 GCGTGGGATC TCCACGCGAA TCTCGGGTAC GTGTTCGGA CATGGGCTCT TCTCCGGTAG
3481 CGGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCATGCCCTC AGCGGCTCAT GGTGCTCGG
3541 CAGCTCCTTG CTCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCACCAC
3601 CAGTGTGCCG CACAAGGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGTCT GAAAATGAGC TCGGACATTG

```

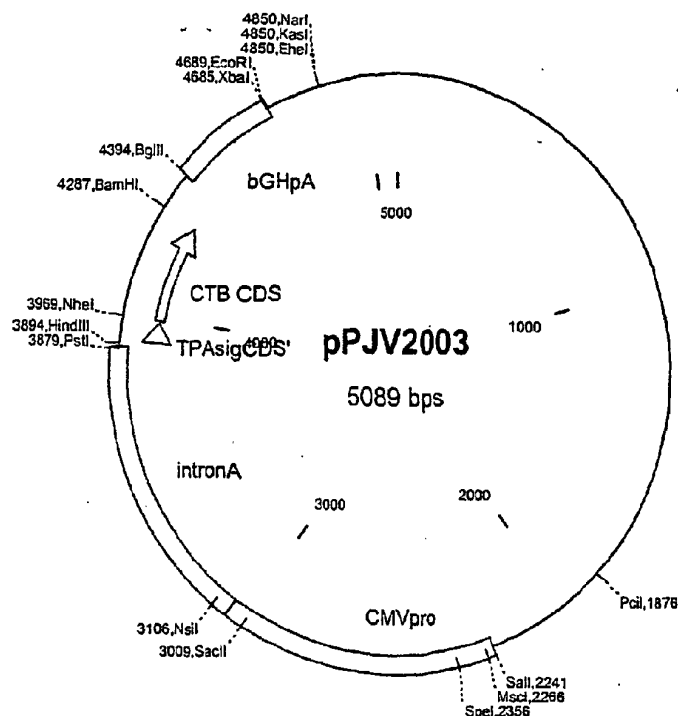
Figura 1-2

```

3661 GGCTCGCACC GTGACGCAGA TGGAGACTT AAGGCAGCGG CAGAAGAAGA TGCAGGCAGC
3721 TGAGTTGTTG TATICTGATA AGAGTCAGAG GTAACGCCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GCGCCACCAG ACATAATAGC
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCAATGAT GATAAGTTAT ATCGGGCAGA TTCTAGACCT CCTGATGAAA
4021 TAAAGCAGTC AGGTGGTCTT ATGCCAAGAG GACAGAGTGA GTACTTTGAC CGAGGTACTC
4081 AAATGAATAT CAACCTTTAT GATCATGCAA GAGGAACTCA GACGGGATTT GTTAGGCACG
4141 ATGATGGATA TGTTCACC TCAATTAGTT TGAGAAGTGC CCACTTAGTG GGTCAAACCTA
4201 TATTGTCTGG TCATTCTACT TATTATATAT ATGTTATAGC CACTGCACCC AACATGTTTA
4261 ACGTTAATGA TGTATTAGGG GCATACAGTC CTCATCCAGA TGAACAAGAA GTTTCGTCTT
4321 TAGGTGGGAT TCCATACTCC CAAATATATG GATGGTATCG AGTTCATTTT GGGGTGCTTG
4381 ATGAACAATT ACATCGTAAT AGGGGCTACA GAGATAGATA TTACAGTAAC TTAGATATTG
4441 CTCCAGCAGC AGATGGTTAT GGATTGGCAG GTTTCCTCC GGAGCATAGA GCTTGGAGGG
4501 AAGAGCCGTG GATTCATCAT GCACCGCCGG GTTGTGGGAA TGCTCCAAGA TCATCGATGA
4561 GTAATACTTG CGATGAAAA ACCCAAAGTC TAGGTGTAAA ATTCTTGAC GAATACCAAT
4621 CTAAGTTAA AAGACAAATA TTTTCAGGCT ATCAATCTGA TATTGATACA CATAATAGAA
4681 TTAAGGATGA ATTATGAGGA TCCTCGCAAT CCCTAGGAGG ATTAGGCAAG GGCTTGAGCT
4741 CACGCTCTTG TGAGGGACAG AAATACAATC AGGGGCAGTA TATGAATACT CCATGGAGAA
4801 ACCCAGATCT ACGTATGATC AGCCTCGACT GTGCCCTCTA GTTGCCAGCC ATCTGTGTGT
4861 TGCCCTCCC CCGTGCCTTC CTTGACCTG GAAGGTGCCA CTCCCACTGT CCTTTCCTAA
4921 TAAATGAGG AAATTGCATC GCATTGTCTG AGTAGGTGTC ATTCTATTCT GGGGGGTGGG
4981 GTGGGGCAGG ACAGCAAGGG GGAGGATTGG GAAGACAATA GCAGGCATGC TGGGGATGCG
5041 GTGGGCTCTA TGGCTTCTGA GGCGGAAAGA ACCAGCTGGG GCTCGACAGC TCGACTCTAG
5101 AATTCAGTGG CCGTCGTTT ACAACGTCGT GACTGGGAAA ACCCTGGCGT TACCCAACTT
5161 AATCGCCTTG CAGCACATCC CCTTTTCGCC AGCTGGCGTA ATAGCGAAGA GGCCCCCACC
5221 GATCGCCCTT CCCAACAGTT GCGCAGCCTG AATGGCGAAT GGCGCCTGAT GCGGTATTTT
5281 CTCCTTACGC ATCTGTGCGG TATTTACAC CGCATATGGT GCACTCTCAG TACAATCTGC
5341 TCTGATGCCG CATAGTTAAG CCAGCCCCGA CACCCGCCAA CACCCGCTGA CGCGCCCTGA
5401 CGGGCTTGTC TGCTCCCGGC ATCCGCTTAC AGACAAGCTG TGACCGTCTC CGGGAGCTGC
5461 ATGTGTGAGA GGTTTTCACC GTCATCACCG AAACGCGCGA

```

Figura 1-3



Molécula: pPJV2003, 5589 bps ADN circular

Nome Arquivo: pPJV2003.cm5,

Descrição: Ligação de frag. de CTB cortado com Nhe Bam no Vector

Nhe Bam 7054

Notas:

Características da Molécula:

Tipo	Início	Fim	Nome	Descrição
REGIÃO	2242	3060	CMVpro	
REGIÃO	3061	3884	intronA	
GENE	3906	3969	TPAsigCDS'	
GENE	3975	4286	CTA CDS	
REGIÃO	4394	4690	bGHpA	

Enzimas (16 sítios)

PciI	1876,	SalI	2241,	MscI	2266,	SpeI	2356
SacII	3009,	NsiI	3106,	PstI	3879,	HindIII	3894
NheI	3969,	BamHI	4287,	BglII	4394,	XbaI	4685

Figura 2-1


```

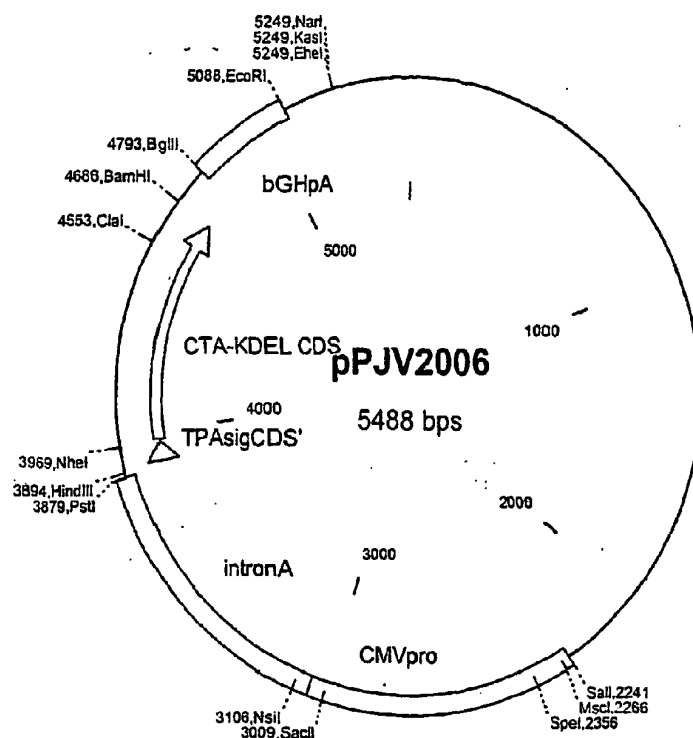
1   GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTTAA TGTCATGATA ATAATGGTTT
61  CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTTGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCTATT TGTATTATTT
121 TCTAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181 AATATTGAAA AAGGAAGACT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCTT ATTCCCTTTT
241 TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTTGTCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA
361 TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC
421 TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC
481 ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAAGTAC CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTTG CACAACATGG
661 GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG
721 ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAC GTTGCGCAAA CTATTAACTG
781 CGGAAGTACT TACTCTAGCT TCCTCGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATATAG
841 TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG
901 GAGCCCGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAAGCCCT
961 CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC
1021 AGATGCTGTA GATAGGTGCC TCACGTGATTA AGCATTTGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT
1081 CATATATACT TTAGATTGAT TTAAGACTTC ATTTTAAATT TAAAGGATC TAGGTGAAGA
1141 TCCTTTTGA TAATCTCATG ACCAAATCC CTTAAGCTGA GTTTTCGTTT CACTGAGCGT
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTCTCTG CGCCTAATCT
1261 GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGCCG GATCAAGAGC
1321 TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAAGTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC
1381 TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACC GCTACATACC
1441 TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCT TGTCTTACCG
1501 GGTGCTGACT AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA ACGGGGGGTT
1561 CGTGACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG
1621 AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG
1681 GCAGGGTCGG AACAGGAGAG CGCACGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT
1741 ATAGTCTGTG CCGGTTTTCG CACCTCTGAC TTGAGCGTGC ATTTTGTGTA TGCTCGTCAG
1801 GGGGGCGGAG CCTATGGAAG AACGCCAGCA ACGCGGCCTT TTTACGGTTT CTGGCCTTTT
1861 GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTTCCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA
1921 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCGCGACCGG AACGACCGAG CGCAGCGAGT
1981 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAAACC GCCTCTCCCC GCGGTTGGC
2041 CGATTCAATTA ATGCACTGCG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA
2101 ACGCAATTA TGTGAGTTAG CTCACCTATT AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC
2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG
2221 ACCATGATTA CGCCAAGCTA GTCGACATAA ATCAATATTG GCTATTGGCC ATTGCAATCG
2281 TGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTTAT ATTGGCTCAT GTCCAATATG ACCGCCATGT
2341 TGCACTTGT TATTGACTAG TTATTAAATG TAATCAATTA CCGGGTCATT AGTTTCATAGC
2401 CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAAATG GCGCGCCTCG TGACCGCCCA
2461 ACGACCCCGG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA
2521 CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG GCAGTACATC
2581 AAGTGTATCA TATGCCAAGT CCGGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC
2641 TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTACCG GACTTTCCTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA
2701 TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG
2761 CGGTTTGACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATTG ACGTCAATGG GAGTTTGTTC
2821 TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTGTAATA ACCCGCCCCG GTTGACGCAA
2881 ATGGGCGGTA GCGGTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTGAACCGT
2941 CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGACCGA
3001 TCCAGCCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCATT GGAACGGGA TTCCCGTGC CAAGAGTGAC
3061 GTAAGTACCG CCTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCTTGG CTCTTATGCA TGCTATACTG
3121 TTTTGGCTT GGGGCCTATA CACCCCGCT CTTATGCTA TAGGTGATGG TATAGCTTAG
3181 CCTATAGGTC TGGGTATTG ACCATTATTG ACCACTCCCC TATTGGTGAC GATACTTTCC
3241 ATTACTAATC CATAACATGG CTCTTTGCCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC
3301 TCTGTCTTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACA GGATGGGGTC CCATTTATTA
3361 TTTACAAATT CACATATACA ACAACGCCGT CCCCCGTGCC CGCAGTTTTT ATTAACATA
3421 GCGTGGGATC TCCACGCGAA TCTCGGGTAC GTGTTCCGGA CATGGGCTCT TCTCCGGTAG
3481 CCGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCATGCCCTC AGCGGCTCAT GGTGCTCCG
3541 CGCTCCTTG CTCCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CACCACCAC
3601 CAGTGTGCCG CACAAGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGTCT GAAATGAGC TCGGAGATTG

```

Figura 2-2

```
3661 GGCTCGCACC GTCGCGCAGA TGAAGACTTT AAGGCAGCGG CAGAGAGAGT TCGAGGCAGC
3721 TGACTTGTGTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAACGCCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GCGCCACCAG ACATAATAGC
3841 TGACAGACTIA ACAGACTGTT CCTTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCACACCT CAAAAATATTA CTGATTTGTG TGCAGAAATC CACAACACAC
4021 AAATATATAC GCTAAATGAT AAGATATTTT CGTATACAGA ATCTCTAGCT GGAAAAAGAG
4081 AGATGGCTAT CATTACTTTT AAGAATGGTG CAATTTTCA AGTAGAAGTA CCAGGTAGTC
4141 AACATATAGA TTCACAAAAA AAAGCGATTG AAAGGATGAA GGATACCCCTG AGGATTGCAT
4201 ATCTTACTGA AGCTAAAGTC GAAAAGTTAT GTGTATGGAA TAATAAAGC CCTCATGCGA
4261 TTGCCGCAAT TAGTATGGCA AATTAAGGAT CCTCGCAATC CCTAGGAGGA TTAGGCAAGG
4321 GCTTGAGCTC ACGCTCTTGT GAGGGACAGA AATACAATCA GGGGCAGTAT ATGAATACTC
4381 CATGGAGAAA CCCAGATCTA CGTATGATCA GCCTCGACTG TGCCCTCTAG TTGCCAGCCA
4441 TCTGTGTTT GCCCTCCCC CGTGCCCTTC TTGACCCCTG AAGGTGCCAC TCCACTGTCT
4501 CTTTCCTAAT AAAATGAGGA AATTGCATCG CATGTCTGA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG
4561 GGGGGTGGGG TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT
4621 GGGGATGCGG TGGGCTCTAT GGCTTCTGAG GCGGAAAGAA CCAGCTGGGG CTCGACAGCT
4681 CGACTCTAGA ATTCACTGGC CGTCGTTTTA CAACGTCGTG ACTGGGAAAA CCCTGGCGTT
4741 ACCCAACTTA ATCGCCTTGC AGCACATCCC CCTTTCGCCA GCTGGCGTAA TAGCGAAGAG
4801 GCCCGCACCG ATCGCCCTTC CCAACAGTTG CGCAGCCTGA ATGGCGAATG GCGCCTGATG
4861 CGGTATTTTC TCCTTACGCA TCTGTGCGGT ATTTACACC GCATATGGTG CACTCTCAGT
4921 ACAATCTGCT CTGATGCCGC ATAGTTAAGC CAGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC
4981 GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT GCTCCCGGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC
5041 GGGAGCTGCA TGTGTACAGG GTTTTCACCG TCATCACCAG AACGCGCGA
```

Figura 2-3



Molécula: pPJV2006, 5488 bps ADN circular

Nome Arquivo: pPJV2006.cm5,

Descrição: Ligação de frag. de CTA-KDEL PCR cortado com Nhe Bam no Vector Nhe Bam 7054

Notas:

Características da Molécula:

Tipo	Início	Fim	Nome	Descrição
REGIÃO	2242	3060	CMVpro	
REGIÃO	3061	3884	intronA	
GENE	3906	3969	TPAsigCDS'	
GENE	3975	4285	CTA CDS	
REGIÃO	4394	5089	bGHpA	

Enzimas (15 sítios)

SalI	2241,	MscI	2266,	SpeI	2356,	SacII	3009
NsiI	3106,	PstI	3879,	HindIII	3894,	NheI	3969
ClaI	4553,	BamHI	4686,	BglII	4793,	EcoRI	5088

Figura 3-1

```

1   GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTTAA TGTCTGATA ATAATGGTTT
61  CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTTCGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTTT
121 TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181 AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTGCCCCIT ATTCCCTTTT
241 TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTTGTGCT ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA
361 TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC
421 TATGTGCGCG GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC
481 ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTGTG CACAACATGG
661 GGGCATCATG AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG
721 ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAC GTTGCGCAAA CTATTAACTG
781 GCGAAGTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG
841 TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG
901 GAGCCGCGCG CGGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAAGCCT
961 CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC
1021 AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTTGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT
1081 CATATATACT TTAGATTGAT TTAAAACTTC ATTTTAAAT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA
1141 TCCTTTTGTG TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTT CACTGAGCGT
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTCGTTT CGCGTAATCT
1261 GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGGCG GATCAAGAGC
1321 TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAACGTGGT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACGTCTC
1381 TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC
1441 TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG
1501 GGTGAGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA ACCGGGGGTT
1561 CAGTGCAACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG
1621 AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG
1681 CGAGGGTCGG AACAGGAGAG CGCAGCAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT
1741 ATAGTCCTGT CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTGC ATTTTGTGTA TGCTCGTCAG
1801 GGGGGCGGAG CCTATGGAAG AACGCCAGCA ACGCGGCCTT TTTACGGTTC CTGGCCTTTT
1861 GCTGGCCCTT TGCTCACATG TTCCTTCCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA
1921 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGCAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT
1981 CAGTGACGCA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAAAAC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC
2041 CGATTCAATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA
2101 ACCCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACTCATT AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC
2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG
2221 ACCATGATTA CGCCAAAGTA ATCGACATAA ATCAATATTG GCTATTGGCC ATTGCATACG
2281 TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTTAT ATTGGCTCAT GTCCAATATG ACCGCCATGT
2341 TGACATTGAT TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA CGGGGTCAAT AGTTCTATAG
2401 CCAATATATG AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAAATG GCCCGCCTCG TGACCGCCCA
2461 ACGACCCCGG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA
2521 CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG GCAGTACATC
2581 AAGTGTATCA TATGCCAAGT CCGGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC
2641 TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTACGG GACTTTCCTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA
2701 TTAGTCTATG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG
2761 CGGTTTGACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATTG ACGTCAATGG GAGTTTGTTC
2821 TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTCGTAATA ACCCCGCCCC GTTGACGCAA
2881 ATGGGCGGTA GCGGTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTGAACCGT
2941 CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGGACCGA
3001 TCCAGCCTCC GCGGCGGGGA ACGGTGCATT GGAACGCGGA TTCCCGGTGC CAAGAGTGAC
3061 GTAAGTACCG CCTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCTTTGG CTCTTATGCA TGCTATACTG
3121 TTTTGGGCTT GGGGCCTATA CACCCCGCTT CCTTATGCTA TAGGTGATGG TATAGCTTAG
3181 CCTATAGGTG TGGGTTATTG ACCATTATTG ACCACTCCCC TATTGGTGAC GATACTTTCC
3241 ATTACTAATC CATAACATGG CTCTTTGCCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC
3301 TCTGTCTTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACCA GGATGGGGTC CCATTTATTA
3361 TTTACAAAAT CACATATACA ACAACGCCGT CCCCCTGCCC CGCAGTTTTC ATTAAACATA
3421 GCGTGGGATC TCCACGCGAA TCTCGGGTAC GTGTTCCGGA CATGGGCTCT TCTCCGGTAG
3481 CCGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCATGCCTCC AGCGGCTCAT GGTGCTCGG
3541 CAGCTCCTTG CTCCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCACCAC
3601 CAGTGTGCGG CACAAGGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGTCT GAAAATGAGC TCGGAGATTG

```

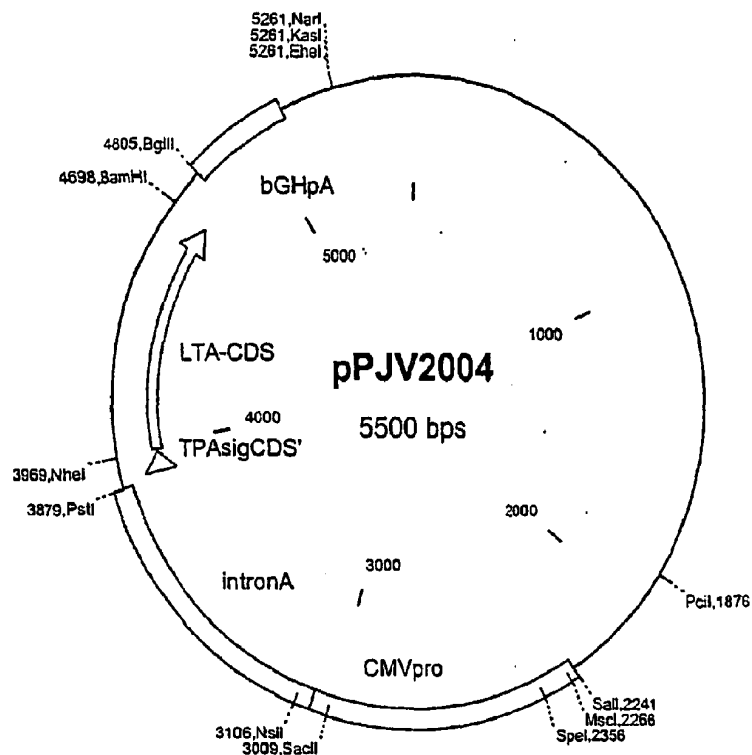
Figura 3-2

```

3661 GGCTCGCACC GTG| AGA TGGAAAGACTT AAGGCAGCGG CAGAA G| GCAGGCAGCG
3721 TGAGTTGTTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAACCTCCC TTGCGGTGC JTTAACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GCGCCACCAG ACATAATAGC
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCAATGAT GATAAGTTAT ATCGGGCAGA TTCTAGACCT CCTGATGAAA
4021 TAAAGCAGTC AGGTGGTCTT ATGCCAAGAG GACAGAGTGA GTACTTTGAC CGAGGTACTC
4081 AAATGAATAT CAACCTTTAT GATCATGCAA GAGGAACTCA GACGGGATTT GTTAGGCACG
4141 ATGATGGATA TGTTCACC TCAATTAGTT TGAGAAGTGC CCACITAGTG GGTCAAACATA
4201 TATTGTCTGG TCATTCTACT TATTATATAT ATGTTATAGC CACTGCACCC AACATGTTTA
4261 ACGTTAATGA TGTATTAGGG GCATACAGTC CTCATCCAGA TGAACAAGAA GTTTCTGCTT
4321 TAGGTGGGAT TCCATACTCC CAAATATATG GATGGTATCG AGTTCATTTT GGGGTGCTTG
4381 ATGAACAATT ACATCGTAAT AGGGGCTACA GAGATAGATA TTACAGTAAC TTAGATATTG
4441 CTCCAGCAGC AGATGGTTAT GGATTGGCAG GTTCCCTCC GGAGCATAGA GCTTGGAGGG
4501 AAGAGCCGTG GATTTCATCAT GCACCGCCGG GTTGTGGGAA TGCTCCAAGA TCATCGATGA
4561 GTAATACTTG CGATGAAAAA ACCCAAAGTC TAGGTGTAAA ATTCCCTGAC GAATACCAAT
4621 CTAAAGTTAA AAGACAAATA TTTTCAGGCT ATCAATCTGA TATTGATACA CATAATAGAA
4681 TTTGAGGATC CTCGCAATCC CTAGGAGGAT TAGGCAAGGG CTGAGCTCA CGCTCTTGTG
4741 AGGGACAGAA ATACAATCAG GGGCAGTATA TGAATACTCC ATGGAGAAAC CCAGATCTAC
4801 GTATGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTG CCCCTCCCCC
4861 GTGCCTTCCT TGACCCTGGA AGGTGCCACT CCCACTGTCC TTTCCTAATA AAATGAGGAA
4921 ATTGCATCGC ATTGTCTGAG TAGGTGTCTAT TCTATTCTGG GGGGTGGGGT GGGGCAGGAC
4981 AGCAAGGGGG AGGATTGGGA AGACAATAGC AGGCATGCTG GGGATGCGGT GGGCTCTATG
5041 GCTTCTGAGG CGGAAAGAAC CAGCTGGGGC TCGACAGCTC GACTCTAGAA TTCCTGGCC
5101 GTCGTTTAC AACGTCGTGA CTGGGAAAAC CCTGGCGTTA CCCAACTTAA TCGCCTTGCA
5161 GCACATCCCC CTTTCGCCAG CTGGCGTAAT AGCGAAGAGG CCCGCACCGA TCGCCCTTCC
5221 CAACAGTTGC GCAGCCTGAA TGGCGAATGG CGCCTGATGC GGTATTTTCT CCTTACGCAT
5281 CTGTGCGGTA TTTCACACCG CATATGGTGC ACTCTCAGTA CAATCTGCTC TGATGCCGCA
5341 TAGTTAAGCC AGCCCCGACA CCCGCCAACA CCCGCTGACG CGCCCTGACG GGCTTGTCTG
5401 CTCCCCGCAT CCGCTTACAG ACAAGCTGTG ACCGTCTCCG GGAGCTGCAT GTGTGAGAGG
5461 TTTTCACCGT CATACCCGAA ACGCGCGA

```

Figura 3-3



Molécula: pPJV2004, 5500 bps ADN circular

Nome Arquivo: pPJV2004.cm5,

Descrição: Ligação da Inserção de LTA Nhe-Bam no Vector Nhe Bam 7054

Notas:

Características da Molécula:

Tipo	Início	Fim	Nome	Descrição
REGIÃO	2242	3060	CMVpro	
REGIÃO	3061	3884	intronA	
GENE	3906	3969	TPAsigCDS'	
GENE	3975	4697	CTA CDS	
REGIÃO	4805	5101	bGHpA	

Enzimas (13 sítios)

PciI	1876,	SalI	2241,	MscI	2266,	SpeI	2356
SacII	3009,	NsiI	3106,	PstI	3879,	NheI	3969
BamHI	4698,	BglII	4805,	EheI	5261,	KasI	5261

Figura 4-1

```

1 GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTAA TGTCATGATA ATAATGGTTT
61 CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTATTATTT
121 TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181 AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCTT ATTCCTTTT
241 TTGCGGCATT TTGCCITCCT GTTTTGTGCT ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAAG
361 TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC
421 TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC
481 ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTGTG CACACATAGG
661 GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAACG
721 ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAC GTTGGCAGAA CTATTAAGTG
781 GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG
841 TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG
901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAAGCCCT
961 CCGGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCCAGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC
1021 AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT
1081 CATATATACT TTAGATTGAT TTAAAACTTC ATTTTAAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA
1141 TCCCTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCTGTC CACTAGCGT
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTTCTG CGCGTAATCT
1261 GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGGCG GATCAAGAGC
1321 TACCAACTCT TTTCCGAAG GTAAGTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC
1381 TTCTAGTATA GCCGTAGTTA AGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACC GCTACATACC
1441 TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG
1501 GGTGGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCCGGCTGA ACGGGGGGTT
1561 CGTGACACCA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG
1621 AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG
1681 GCAGGTCGG AACAGGAGAG CGCAGGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT
1741 ATAGTCTGT CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGTA TGCTCGTCAG
1801 GGGGGCGGAG CCTATGGAAG AACGCCAGCA ACGCGGCTT TTTACGGTTC CTGGCCTTTT
1861 GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTCTCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA
1921 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCCGAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT
1981 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAAACC GCCTCTCCCC GCGCTTGGC
2041 CGATTCAATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA
2101 ACGCAATTAA TGTGACTTAG CTCACTCATT AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC
2161 CCGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG
2221 ACCATGATTA CGCCAAGCTA GTCGACATAA ATCAATATTG GCTATTGGCC ATTGCATACG
2281 TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTTAT ATTGGCTCAT GTCCAATATG ACCGCCATGT
2341 TGACATTGAT TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA CGGGGTCAAT AGTTCTATAGC
2401 CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAATG GCCCGCCTCG TGACCGCCCA
2461 ACGACCCCGG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA
2521 CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG GCAGTACATC
2581 AAGTGTATCA TATGCCAAGT CCGGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC
2641 TTGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTACGG GACTTTCCTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA
2701 TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG
2761 CCGTTTGA CT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATTG ACGTCAATGG GAGTTTGTIT
2821 TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTCGTAATA ACCCCGCCCC GTTGACGCAA
2881 ATGGGCGGTA GCGGTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTGAACCGT
2941 CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGACCGGA
3001 TCCAGCCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCATT GGAACGCGGA TTCCCGGTGC CAAGAGTGAC
3061 GTAAGTACCG CCTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCTTTGG CTCTTATGCA TGCTATACTG
3121 TTTTGGCTT GGGGCCCTATA CACCCCGCT CCTTATGCTA TAGGTGATGG TATAGCTTAG
3181 CCTATAGGTG TGGGTTATTG ACCATTATG ACCACTCCC TATTGGTGAC GATACTTTCC
3241 ATTACTAATC CATAACATGG CTCTTTGCCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC
3301 TCTGTCTTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTTACA GGATGGGGTC CCATTTATTA
3361 TTTACAAATT CACATATACA ACAACGCCGT CCCCCGTGCC CGCAGTTTTT ATTAACATA
3421 GCGTGGGATC TCCACGCGAA TCTCGGGTAC GTGTTCGGGA CATGGGCTCT TCTCCGGTAG
3481 CGGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCATGCCTCC AGCGGCTCAT GGTGCTCGG
3541 CAGTCTCTTG CTCCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCACCAG
3601 CAGTGTGCCG CACAAGGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGTCT GAAAATGAGC TCGGAGATTG

```

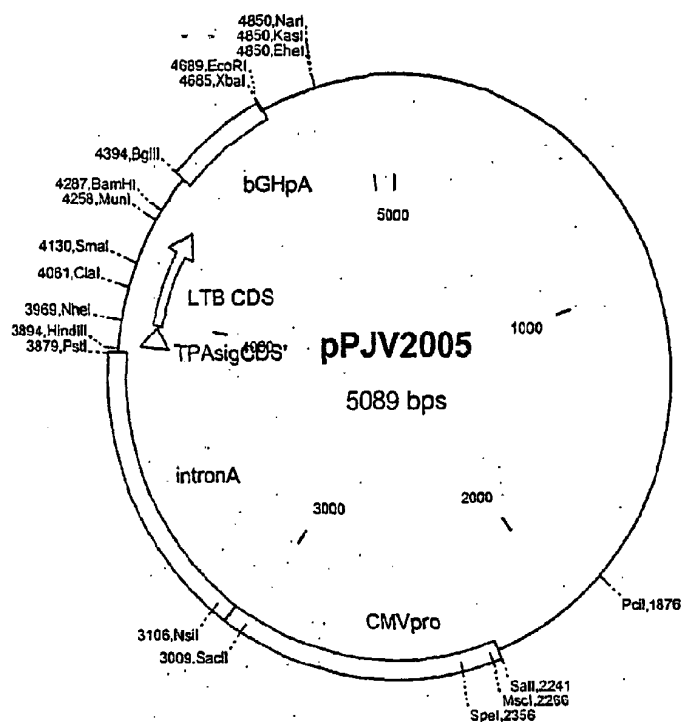
Figura 4-2

```

3661 GGCTCGGACC GTGATGCAGA TGGAAAGACTT AAGGCAGCGG CAGAAGAAGA TGCAGGCAGC
3721 TGAGTTGTTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAACCTCCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GCGCCACCAG ACATAATAGC
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTTCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGTGTGTG GGAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCAATGGC GACAAATTAT ACCGTGCTGA CTCTAGACCC CCAGATGAAA
4021 TAAACGTTT CCGAGGTCTT ATGCCCAGAG GGCATAATGA GTACTTCGAT AGAGGAACTC
4081 AAATGAATAT TAATCTTTAT GATCACGCGA GAGGAACACA AACCGGCTTT GTCAGATATG
4141 ATGACGGATA TGTTCCTACT TCTCTTAGTT TGAGAAGTGC TCACTTAGCA GGACAGTCTA
4201 TATTATCAGG ATATTCCACT TACTATATAT ATGTTATAGC GACAGCACCA AATATGTTTA
4261 ATGTTAATGA TGTATTAGGC GTATACAGCC CTCACCCATA TGAACAGGAG GTTTCGCGT
4321 TAGGTGGAAT ACCATATTCT CAGATATATG GATGGTATCG TGTTAATTTT GGTGTGATTG
4381 ATGAACGATT ACATCGTAAC AGGGAATATA GAGACCGGTA TTACAGAAAT CTGAATATAG
4441 CTCCGGCAGA GGATGGTTAC AGATTAGCAG GTTTCACACC GGATCACCAA GCTTGAGAG
4501 AAGAACCTG GATTTCATCAT GCACCACAAG GTTGTGGAAT TTCATCAGA ACAATTACAG
4561 GTGATACTTG TAATGAGGAG ACCCAGAATC TGAGCACAAT ATATCTCAGG AAATATCAAT
4621 CAAAAGTTAA GAGGCAGATA TTTTCAGACT ATCAGTCAGA GGTGACATA TATAACAGAA
4681 TTCGGATGA ATTATGAGGA TCCTCGCAAT CCCTAGGAGG ATTAGGCAAG GGCTTGAGCT
4741 CACGCTCTTG TGAGGGACAG AAATACAATC AGGGGCAGTA TATGAATACT CCATGGAGAA
4801 ACCCAGATCT ACGTATGATC AGCCTCGACT GTGCCTTCTA GTTGCCAGCC ATCTGTTGTT
4861 TGCCCTCCC CCGTGCCTTC CTTGACCTG GAAGGTGCCA CTCCCCTGT CTTTCCTAA
4921 TAAATGAGG AAATTGCATC GCATTGTCTG AGTAGGTGTC ATTCTATTCT GGGGGGTGGG
4981 GTGGGGCAGG ACAGCAAGGG GGAGGATTGG GAAGACAATA GCAGGCATGC TGGGGATGCG
5041 GTGGGCTCTA TGGCTTCTGA GGCGGAAAGA ACCAGCTGGG GCTCGACAGC TCGACTCTAG
5101 AATTCACCTG CCGTCGTTTT ACAACGTCGT GACTGGGAAA ACCCTGGCGT TACCCAACTT
5161 AATCGCCTTG CAGCACATCC CCTTTTCGCC AGCTGGCGTA ATAGCGAAGA GGCCCGCACC
5221 GATCGCCCTT CCCAACAGTT GCGCAGCCTG AATGGCGAAT GGCGCCTGAT GCGGTATTTT
5281 CTCCTTACGC ATCTGTGCGG TATTTACAC CGCATATGGT GCACTCTCAG TACAATCTGC
5341 TCTGATGCCG CATAGTTAAG CCAGCCCCGA CCCCCGCAA CACCCGCTGA CGCGCCCTGA
5401 CGGGCTTGTG TGCTCCCGGC ATCCGCTTAC AGACAAGCTG TGACCGTCTC CGGGAGCTGC
5461 ATGTGTCAGA GGTTTTCACC GTCATCACCG AACGCGCGA

```

Figura 4-3



Molécula: pPJV2005, 5089 bps ADN circular

Nome Arquivo: pPJV2005.cm5,

Descrição: Ligação de frag. de LTB NheBam no Vector Nhe Bam 7054

Notas:

Características da Molécula:

Tipo	Início	Fim	Nome	Descrição
REGIÃO	2242	3060	CMVpro	
REGIÃO	3061	3884	intronA	
GENE	3906	3969	TPAsigCDS'	
GENE	3975	4286	CTA CDS	
REGIÃO	4394	4690	bGHpA	

Enzimas (19 sítios)

PciI	1876,	SalI	2241,	MscI	2266,	SpeI	2356
SacII	3009,	NsiI	3106,	PstI	3879,	HindIII	3894
NheI	3969,	ClaI	4061,	SmaI	4130,	MunI	4258

Figura 5-1

```

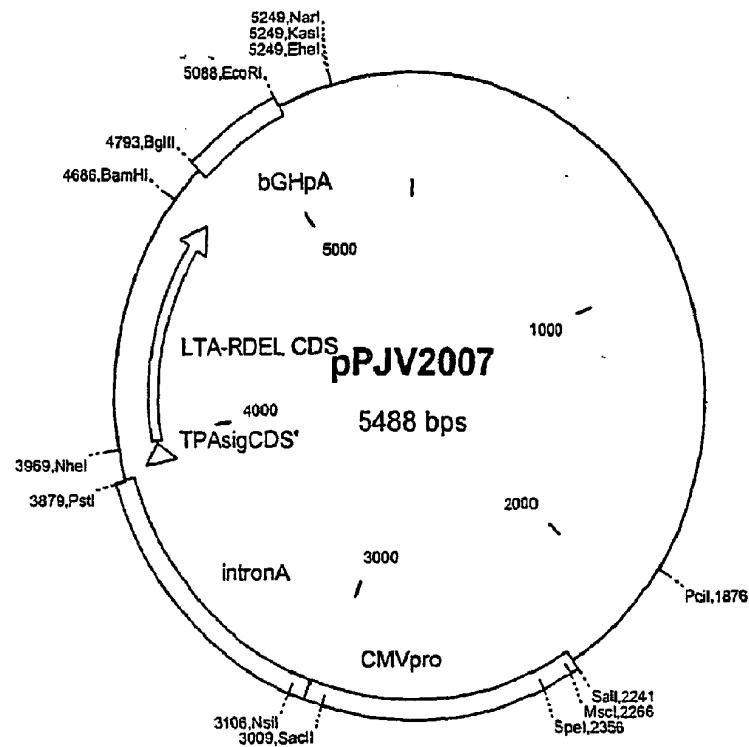
1 GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTAA TGTCATGATA ATAATGGTTT
61 CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTATTATTT
121 TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181 AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCTT ATTCCCTTTT
241 TTGCGGCATT TTGCCPTCCT GTTTTGTCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA
361 TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCAGTTTT AAAGTTCTGC
421 TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC
481 ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACTTACTTCT GACAAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTTG CACAACATGG
661 GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG
721 ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAC GTTGCCGAAA CTATTAACCTG
781 GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG
841 TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG
901 GAGCCGCTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAAGCCT
961 CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC
1021 AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTGGTA ACTGTCTAGC CAAGTTTACT
1081 CATATATACT TTAGATTGAT TTAATACTTC ATTTTAAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA
1141 TCCTTTTGTG TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTT CACTGAGCGT
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTTCTG CGCGTAATCT
1261 GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGCCG GATCAAGAGC
1321 TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAACTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC
1381 TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACC GCTACATACC
1441 TGCTCTCTCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG
1501 GGTGGACATC AAGACGATAG TTACCGGATA AGCGCGAGCG GTCGGGCTGA ACGGGGGGTT
1561 CGTGCAACCA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG
1621 AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAAGC
1681 GCAGGGTCCG AACAGGAGAG CGCAGGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT
1741 ATAGTCCCTT CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGA TGCTCGTCAG
1801 GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCGGCTTT TTTACGGTTC CTGGCCTTTT
1861 GCTGGCCCTT TGCTCACATG TTTCTTCTCG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA
1921 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGCAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT
1981 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAAACC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC
2041 CGATTCAATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA
2101 ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACTCATT AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC
2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG
2221 ACCATGATTA CGCCAAGCTA GTCGACATAA ATCAATATTG GCTATTGGCC ATTGCATACG
2281 TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTTAT ATTGGCTCAT GTCCAAATAG ACCGCCATGT
2341 TGACATTGAT TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA CGGGGTCATT AGTTCTATAG
2401 CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAAATG GCCCGCTCG TGACCGCCCA
2461 ACGACCCCGC CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA
2521 CTTTCCATTG ACGTCAATGG CTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG GCGGTACATC
2581 AAGTGTATCA TATGCCAAGT CCGGCCCTCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC
2641 TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTACGG GACTTTCCTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA
2701 TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG
2761 CGTTTGTACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATTG ACGTCAATGG GAGTTTGTTC
2821 TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTGTAATA ACCCCGCCCC GTTGACGCAA
2881 ATGGGCGGTA GCGGTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTGAACCGT
2941 CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGGACCGA
3001 TCCAGCCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCATT GGAACGCGGA TTCCCGGTGC CAAGAGTGAC
3061 GTAAGTACCG CCTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCTTTGG CTCTTATGCA TGCTATACTG
3121 TTTTGGCTT GGGGCCTATA CACCCCGCT CTTATGCTA TAGGTGATGG TATAGCTTAG
3181 CCTATAGGTG TGGGTATTG ACCATTATTG ACCACTCCCC TATTGGTGAC GATACTTTCC
3241 ATTACTAATC CATAACATGG CTCTTTGCCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC
3301 TCTGTCTTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACA GGATGGGGTC CCATTATTA
3361 TTTACAAATT CACATATACA ACAACGCCGT CCCCCTGCC CGCAGTTTTT ATTAACATA
3421 GCGTGGGATC TCCACGCGAA TCTCGGGTAC GTGTTCCGGA CATGGGCTCT TCTCCGTAG
3481 CGGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCAATGCTCC AGCGGCTCAT GGTGCTCGG
3541 CAGCTCCTTG CTCCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCACCAC
3601 CAGTGTGCCG CACAAGGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGTCT GAAAATGAGC TCGGAGATTG

```

Figura 5-2

```
3661 GGCTCGCACC GTGACGCAGA TGAAGACTT AAGGCAGCGG CAGAAGAGGA TGCAGGCAGC--
3721 TGAGTTGTTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAACGCCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCCGCG GCGCCACCAG ACATAATAGC
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCGCTCCC CAGTCTATTA CAGAACTATG TTCGGAATAT CGCAACACAC
4021 AAATATATAC GATAAATGAC AAGATACTAT CATATACGGA ATCGATGGCA GGCAAAAGAG
4081 AAATGGTTAT CATTACATTT AAGAGCGGCG CAACATTTCA GGTGGAAGTC CCGGGCAGTC
4141 AACATATAGA CTCCCAAAAA AAAGCCATTG AAAGGATGAA GGACACATTA AGAATCACAT
4201 ATCTGACCGA GACCAAAATT GATAAATTAT GTGTATGGAA TAATAAAACC CCCAATTCAA
4261 TTGCGGCAAT CAGTATGGAA AACTAGGGAT CCTCGCAATC CCTAGGAGGA TTAGGCAAGG
4321 GCTTGAGCTC ACGCTCTTGT GAGGGACAGA AATACAATCA GGGGCAGTAT ATGAATACTC
4381 CATGGAGAAA CCCAGATCTA CGTATGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA
4441 TCTGTGTTT GCCCCTCCCC CGTGCCTTCC TTGACCCTGG AAGGTGCCAC TCCCAGTCTC
4501 CTTTCCTAAT AAAATGAGGA AATTGCATCG CATTGTCTGA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG
4561 GGGGGTGGGG TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT
4621 GGGGATGCGG TGGGCTCTAT GGCTTCTGAG GCGGAAAGAA CCAGCTGGGG CTCGACAGCT
4681 CGACTCTAGA ATTCACTGGC CGTCGTTTTA CAACGTCGTG ACTGGGAAAA CCCTGGCGTT
4741 ACCCAACTTA ATCGCCTTGC AGCACATCCC CCTTTCGCCA GCTGGCGTAA TAGCGAAGAG
4801 GCGCGCACCG ATCGCCCTTC CCAACAGTTG CGCAGCCTGA ATGGCGAATG GCGCCTGATG
4861 CGGTATTTTC TCCTTACGCA TCTGTGCGGT ATTTACACCC GCATATGGTG CACTCTCAGT
4921 ACAATCTGCT CTGATGCCGC ATAGTTAAGC CAGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC
4981 GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT GCTCCCGGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC
5041 GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG GTTTTCACCG TCATCACCGA AACGCGCGA
```

Figura 5-3



Molécula: pPJV2007, 5488 bps ADN circular

Nome Arquivo: pPJV2007.cm5,

Descrição: Ligação da Inserção de LTA-RDEL Nhe-Bam no Vector Nhe Bam 7054

Notas:

Características da Molécula:

Tipo	Início	Fim	Nome	Descrição
REGIÃO	2242	3060	CMVpro	
REGIÃO	3061	3884	intronA	
GENE	3906	3969	TPAsigCDS'	
GENE	3975	4285	CTA CDS	
REGIÃO	4793	5089	bGHpA	

Enzimas (14 sítios)

PciI	1876,	SalI	2241,	MscI	2266,	SpeI	2356
SacII	3009,	NsiI	3106,	PstI	3879,	NheI	3969
BamHI	4686,	BglII	4793,	EcoRI	5088,	EheI	5249

Figura 6-1

```

1   GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTTAA TGTCATGATA ATAATGGTTT
61  CTTAGACGTC AGGTGGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTATTATTT
121 TCFAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181 AATATTGAAA AAGGAAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTGCGCCCT ATTCCTTTT
241 TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTTTCCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA
361 TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC
421 TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC
481 ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTCG CACAACATGG
661 GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG
721 ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAC GTTGCAGAAA CTATTAACCTG
781 GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG CGCGATAAAG
841 TTGCGGAGAC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG
901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAAGCCCT
961 CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC
1021 AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACGTGATTA AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT
1081 CATATATACT TTAGATTGAT TTAAACTTC ATTTTAAAT TAAAGGATC TAGGTGAAGA
1141 TCCTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTT CACTGAGCGT
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTCCTG CGCGTAATCT
1261 GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGCCG GATCAAGAGC
1321 TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAACTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC
1381 TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC
1441 TCGTCTGTCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG
1501 GGTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA ACGGGGGGTT
1561 CGTGACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG
1621 AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG
1681 GCAGGGTCGG AACAGGAGAG CGCACGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCG TGGTATCTTT
1741 ATAGTCTGT CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGA TGCTCGTCAG
1801 GGGGGCGGAG CCTATGGAAG AACGCCAGCA ACGCGGCTT TTTACGGTTC CTGGCCTTTT
1861 GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTTCCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA
1921 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGCAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT
1981 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAAAAC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC
2041 CGATTCAATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA
2101 ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACTCAAT AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC
2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGAGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG
2221 ACCATGATTA CGCCAAGCTA GTCGACATAA ATCAATATTG GCTATTGGCC ATTGACATAG
2281 TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTTAT ATTGGCTCAT GTCCAATATG ACCGCCATGT
2341 TGACATTGAT TATTGACTAG TTAITTAATG TAATCAATTA CGGGGTCAAT AGTTTCATAG
2401 CCAATATATG AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAAATG GCCCGCCTCG TGACCGCCCA
2461 ACGACCCCGG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA
2521 CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG GCAGTACATC
2581 AAGTGATCA TATGCCAAGT CCGGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC
2641 TGGCATATG CCCAGTACAT GACCTTACGG GACTTTCCTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA
2701 TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG
2761 CGGTTTGACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATTG ACGTCAATGG GAGTTTGTTT
2821 TGGCACCAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTGTAATA ACCCGCCCCG GTTGACGCAA
2881 ATGGGCGGTA GCGGTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTAACCGT
2941 CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGGACCGA
3001 TCCAGCCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCATT GGAACGCGGA TTCCCGGTGC CAAGAGTGAC
3061 GTAAGTACCG CCTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCTTTGG CTCTTATGCA TGCTATACTG
3121 TTTTGGGCTT GGGGCCCTATA CACCCCGCTT CTTTATGCTA TAGGTGATGG TATAGCTTAG
3181 CCTATAGGTG TGGGTTATTG ACCATTATTG ACCACTCCCC TATTGGTGAC GATACCTTCC
3241 ATTACTAATC CATACATGG CTCTTTGCCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC
3301 TCTGTCTTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACAA GGATGGGGTC CCATTTIATTA
3361 TTTACAAATT CACATATACA ACAACGCCGT CCCCCTGGCC CGCAGTTTTT ATTAACATA
3421 GCGTGGGATC TCCACGCGAA TCTCGGTAC GTGTTCCGGA CATGGGCTCT TCTCCGGTAG
3481 CGGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCAATGCCCTC AGCGGCTCAT GGTGCTCGG
3541 CAGCTCCTTG CTCCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCACCAC
3601 CAGTGTGCCG CACAAGGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGTCT GAAAATGAGC TCGGAGATTG

```

Figura 6-2

```

3661 GGCTCGCACC GTGAGCAGCA TGGAGACTT AAGGCAGCGG CAGAGAGAGG GCAGGCAGC
3721 TGAGTTGTTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAACCTCCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GCGCCACCAG ACATAATAGC
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCAATGGC GACAAATTAT ACCGTGCTGA CTCTAGACCC CCAGATGAAA
4021 TAAAACGTTT CCGAGGTCTT ATGCCCAGAT GGCATAATGA GTACTTCGAT AGAGGAACCTC
4081 AAATGAATAT TAATCTTTAT GATCACGCGA GAGGAACACA AACCGGCTTT GTCAGATATG
4141 ATGACGGATA TGTTTCCACT TCTCTTAGTT TGAGAAGTGC TCACTTAGCA GGACAGTCTA
4201 TATTATCAGG ATATTCCACT TACTATATAT ATGTTATAGC GACAGCACCA AATATGTTTA
4261 ATGTTAATGA TGTATTAGGC GTATACAGCC CTCACCCATA TGAACAGGAG GTTCTGCGGT
4321 TAGGTGGAAT ACCATATTCT CAGATATATG GATGGTATCG TGTAAATTTT GGTGTGATTG
4381 ATGAACGATT ACATCGTAAC AGGGAATATA GAGACCGGTA TTACAGAAAT CTGAATATAG
4441 CTCGGGCAGA GGATGGTTAC AGATTAGCAG GTTTCACACC GGATCACCAA GCTTGGAGAG
4501 AAGAACCCTG GATTTCATCAT GCACCACAAG GTTGTGGAAA TTCATCAAGA ACAATTACAG
4561 GTGATACTTG TAATGAGGAG ACCCAGAATC TGAGCACAAAT ATATCTCAGG AAATATCAAT
4621 CAAAAGTTAA GAGGCAGATA TTTTCAGACT ATCAGTCAGA GGTTGACATA TATAACAGAA
4681 TTTGAGGATC CTCGCAATCC CTAGGAGGAT TAGGCAAGGG CTTGAGCTCA CGCTCTTGTG
4741 AGGGACAGAA ATACAATCAG GGGCAGTATA TGAATACTCC ATGGAGAAAC CCAGATCTAC
4801 GTATGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTG CCCCTCCCCC
4861 GTGCCCTTCT TGACCTTGGA AGGTGCCACT CCCACTGTCC TTTCTAATA AAATGAGGAA
4921 ATTGCATCGC ATTGTCGAG TAGGTGTCAT TCTATTCTGG GGGGTGGGGT GGGGCAGGAC
4981 AGCAAGGGGG AGGATTGGGA AGACAATAGC AGGCATGCTG GGGATGCGGT GGGCTCTATG
5041 GCTTCTGAGG CGGAAGAAGC CAGCTGGGGC TCGACAGCTC GACTCTAGAA TTCACTGGCC
5101 GTCGTTTTAC AACGTCGTGA CTGGGAAAAC CCTGGCGTTA CCCAACTTAA TCGCCTTGCA
5161 GCACATCCCC CTTTCGCCAG CTGGCGTAAT AGCGAAGAGG CCCGCACCGA TCGCCCTTCC
5221 CAACAGTTGC GCAGCCTGAA TGGCGAATGG CGCTGATGC GGTATTTTCT CCTTACGCAT
5281 CTGTGCGGTA TTTCACACCG CATATGGTGC ACTCTCAGTA CAATCTGCTC TGATGCCGCA
5341 TAGTTAAGCC AGCCCCGACA CCCGCCAACA CCCGCTGACG CGCCCTGACG GGCTTGTCTG
5401 CTCCCGGCAT CCGCTTACAG ACAAGCTGTG ACCGTCTCCG GGAGCTGCAT GTGTCAAGG
5461 TTTTACCCTT CATCACCGAA ACGCGCGA

```

Figura 6-3

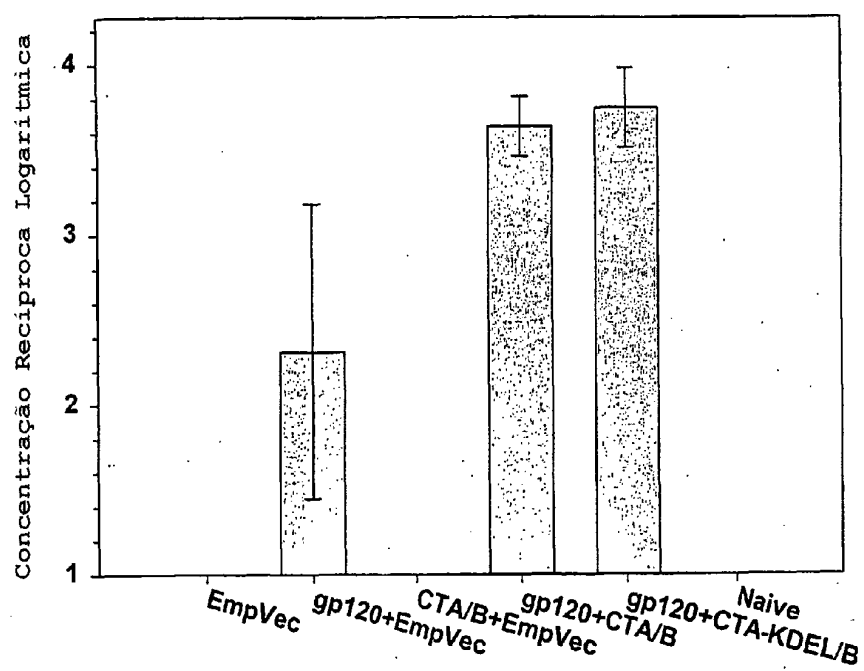


Figura 7

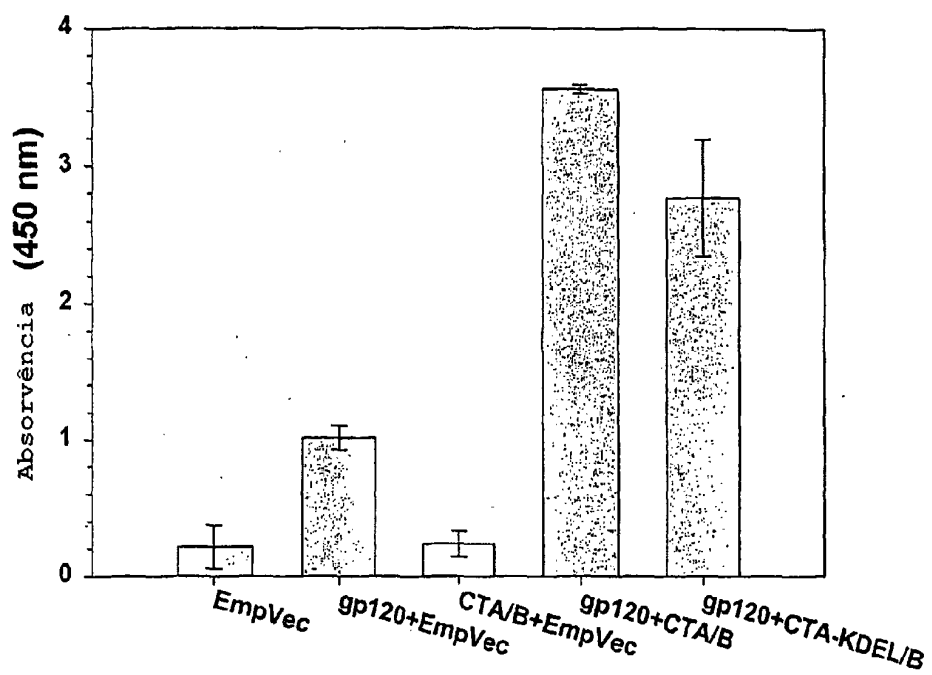


Figura 8

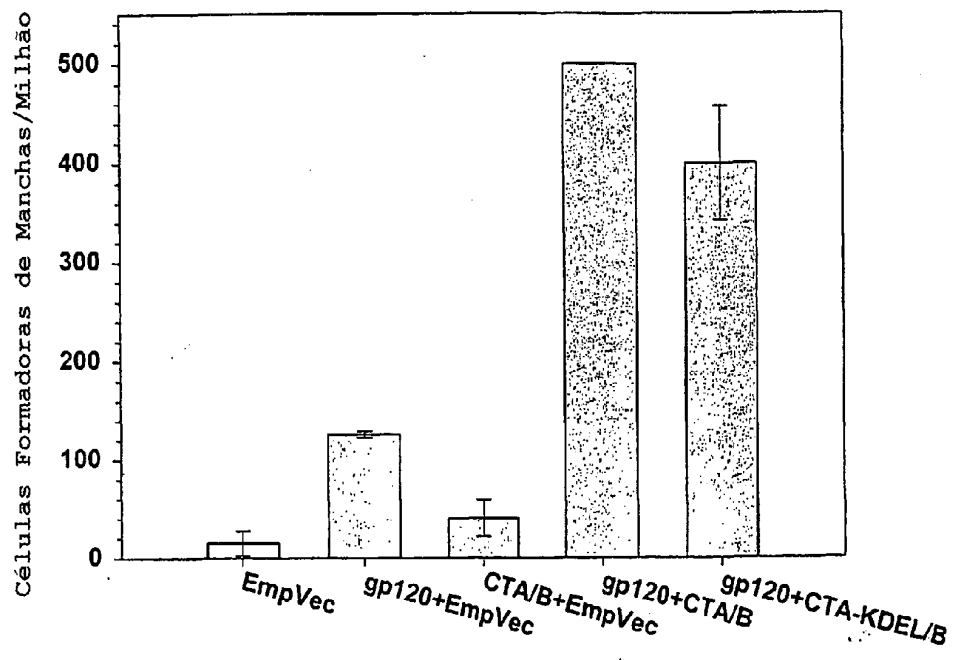


Figura 9

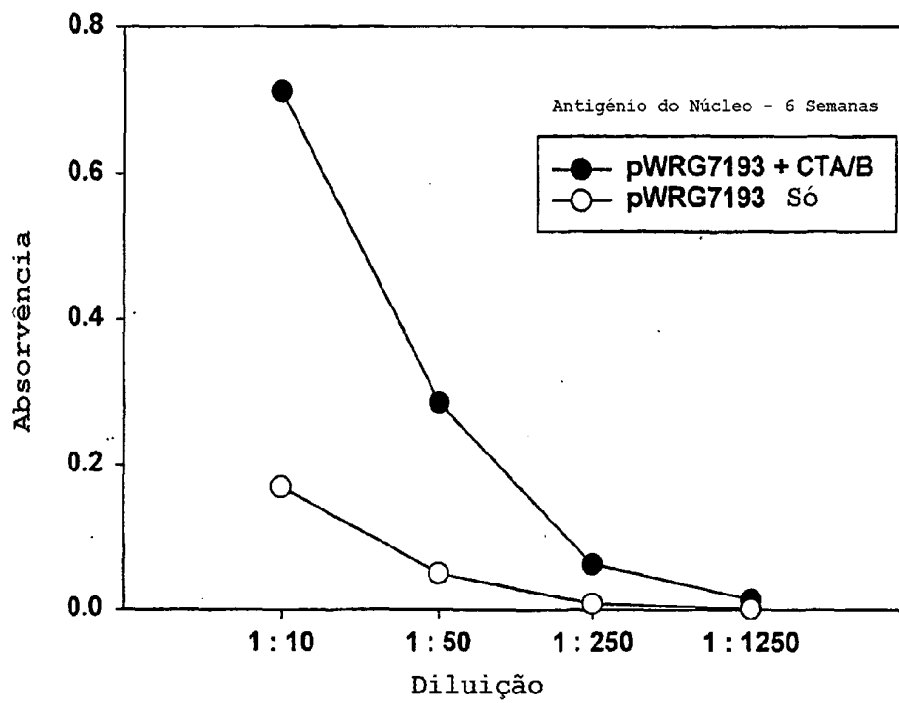


Figura 10

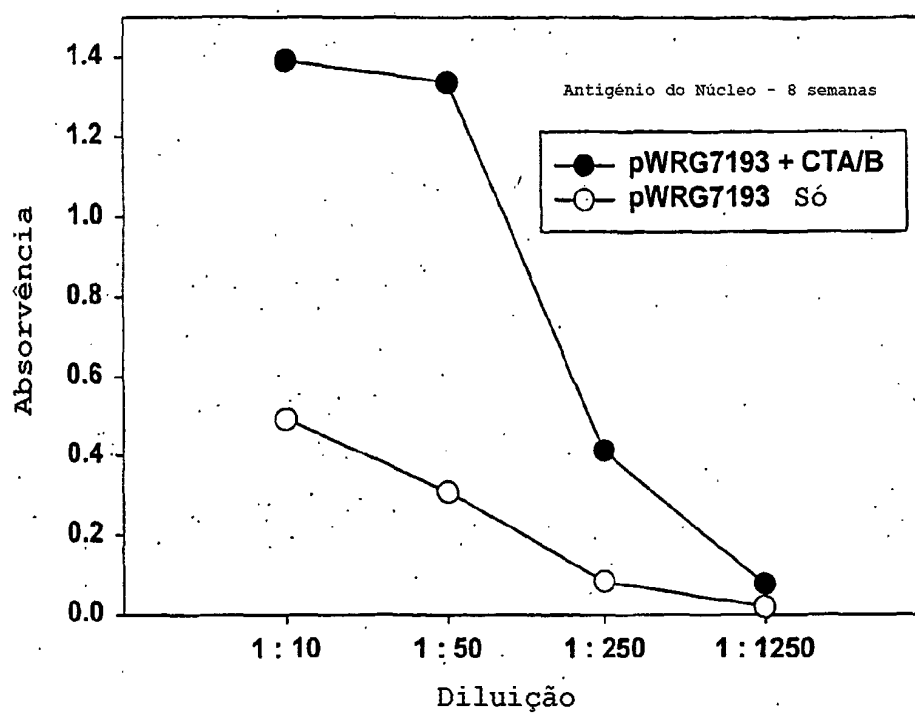


Figura 11

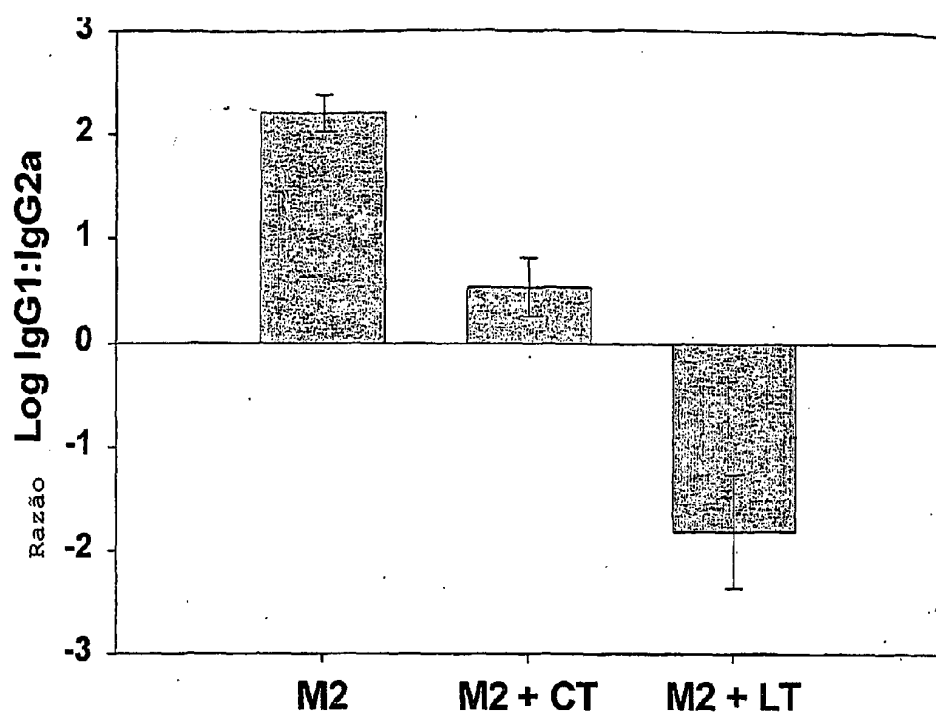
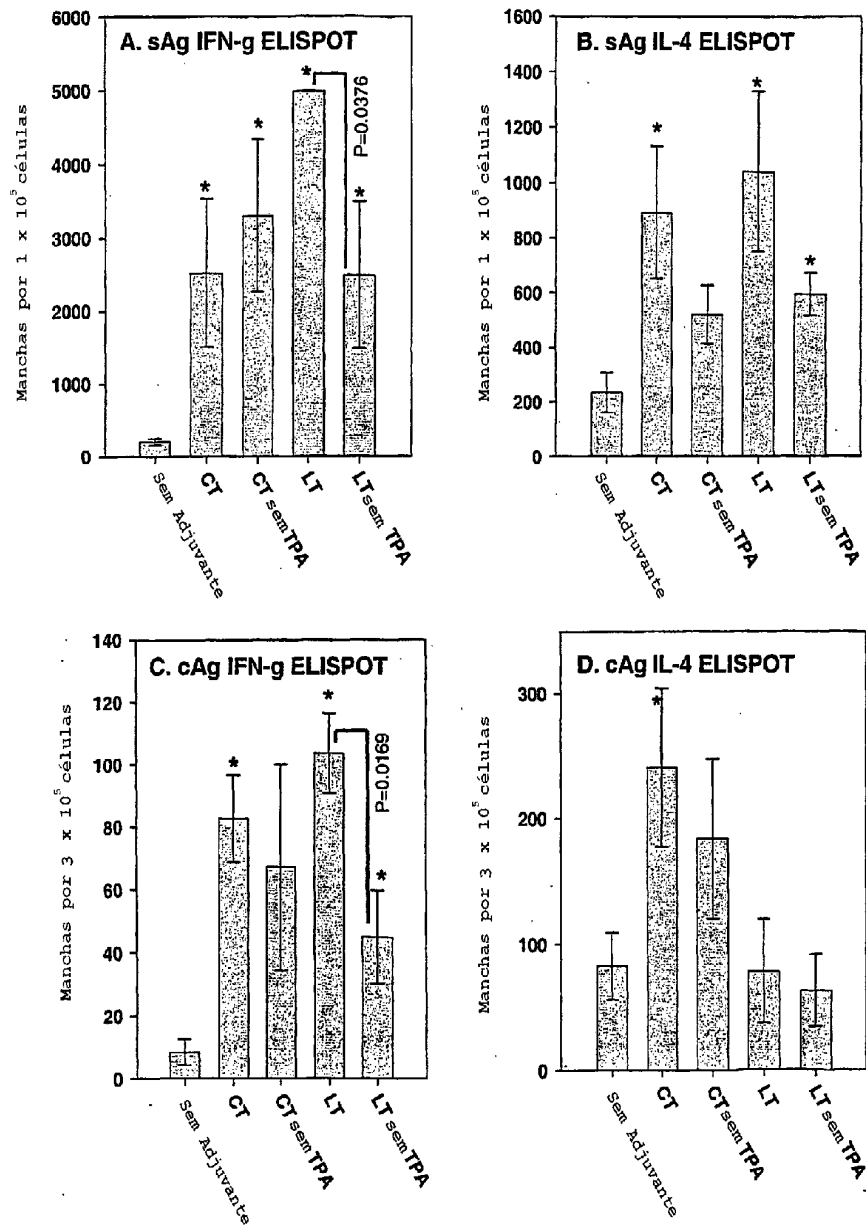


Figura 12



Figuras 13A - 13D

Protecção Contra Estimulação com HSV-2 em Murganhos

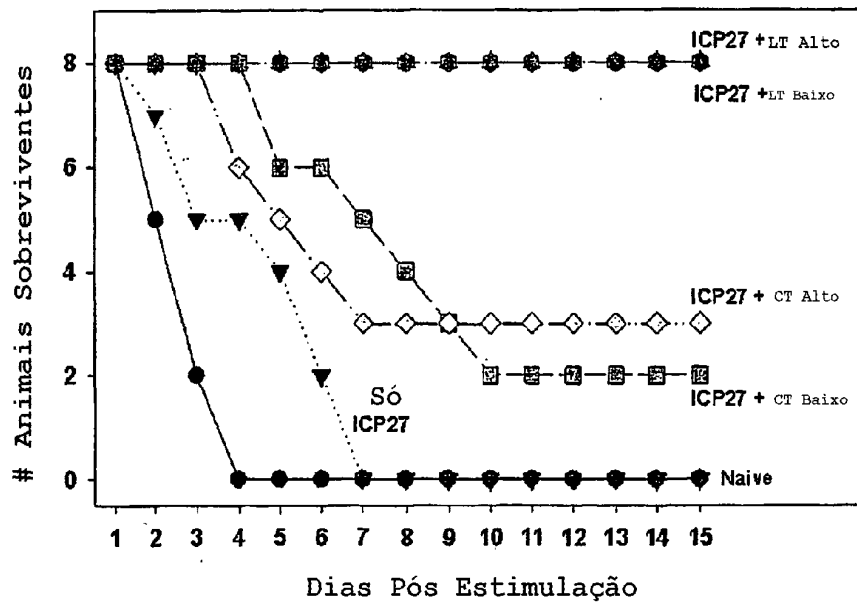


Figura 14