

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade  
Intelectual  
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional  
**WO 2011/026206 A1**

(43) Data de Publicação Internacional  
10 de Março de 2011 (10.03.2011)

PCT

- (51) **Classificação Internacional de Patentes :**  
C12N 15/34 (2006.01) A61K 39/295 (2006.01)  
C12N 15/37 (2006.01) A61K 39/245 (2006.01)  
C12N 15/38 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)  
A61K 31/711 (2006.01) A61K 38/19 (2006.01)
- (21) **Número do Pedido Internacional :**  
PCT/BR2010/000290
- (22) **Data do Depósito Internacional :**  
6 de Setembro de 2010 (06.09.2010)
- (25) **Língua de Depósito Internacional :** Português
- (26) **Língua de Publicação :** Português
- (30) **Dados Relativos à Prioridade :**  
PI 0904880-4  
4 de Setembro de 2009 (04.09.2009) BR
- (71) **Requerente (para todos os Estados designados, exceto US) :** FARMACORE BIOTECNOLOGIA LIMITADA [BR/BR]; Rua dos Técnicos, s/n, Campus da USP, Monte Alegre, 14049-900 Ribeirão Preto - SP (BR).
- (72) **Inventor; e**
- (75) **Inventor/Requerente (para US unicamente) :** LOPES SILVA, Célio [BR/BR]; Rua Gamaleira, 111, Jardim Recreio, 14040-330 Ribeirão Preto - SP (BR).
- (74) **Mandatários :** DI BLASI, Gabriel et al.; Rua do Ouvidor, 121/12 Andar, Centro, 20040-030 Rio de Janeiro - RJ (BR).
- (81) **Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) :** AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes) :** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(Continua na página seguinte)

(54) **Title :** ISOLATED NUCLEIC ACID SEQUENCE, EXPRESSION VECTOR, SYNERGISTIC IMMUNOGENIC COMPOSITION COMPRISING AN EXPRESSION VECTOR THAT CODES FOR THE E7 PROTEIN OF HUMAN PAPILLOMA VIRUS (HPV) FUSED WITH THE GD-PROTEIN OF HUMAN HERPES VIRUS TYPE-1 (HSV-1), AND AN EXPRESSION VECTOR THAT CODES FOR A CYTOKYNE, AND USES THEREOF

(54) **Título :** SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSÃO, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA SINÉRGICA QUE COMPREENDE UM VETOR DE EXPRESSÃO QUE CODIFICA A PROTEÍNA E7 DO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV) FUSIONADA À PROTEÍNA GD DO VÍRUS HERPES HUMANO TIPO 1 (HSV-1) E UM OS

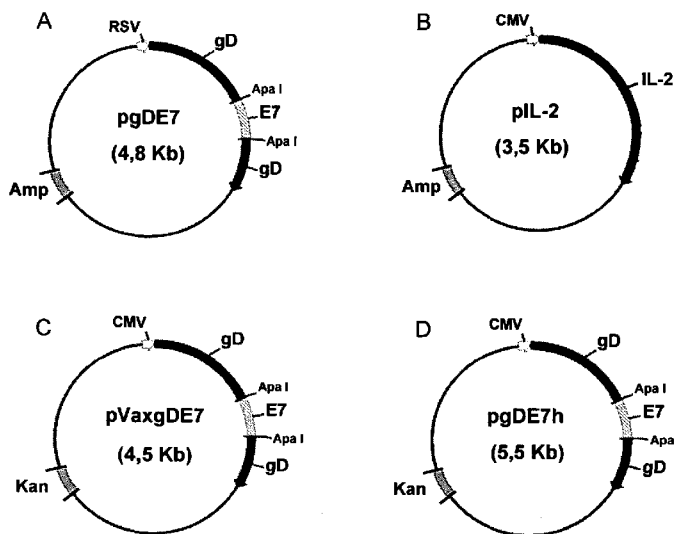


FIGURA 1

(57) **Abstract :** The present invention relates to synergistic immunogenic compositions comprising an expression vector that codes for the E7 protein of human papilloma virus (HPV) fused with the glycoprotein D (gD) of human herpes virus type-1 (HSV-1), to an expression vector that codes for a cytokyne, and to a pharmaceutically acceptable carrier. The present invention also relates to isolated nucleic acid sequences and vectors that code for the E7 protein of HPV fused with the gD protein of HSV and comprise codons optimised for expression in mammal cells, preferably human cells. The present invention further relates to vaccines and methods for preventing or treating papilloma virus-induced tumours, and comprising the administration of one or more synergistic immunogenic compositions according to the present invention to animals or humans requiring such vaccines.

(57) **Resumo :**

(Continua na página seguinte)



WO 2011/026206 A1

**Publicado:**

— *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*

— *com listagem de seqüências, parte da descrição (Regra 5.2(a))*

---

A presente invenção refere-se a composições imunogênicas sinérgicas que compreendem um vetor de expressão que codifica a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de HSV, um vetor de expressão que codifica uma citocina e um veículo farmacologicamente aceitável. A presente invenção refere-se também a seqüências de ácido nucléico isoladas e vetores que codificam a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de HSV e compreendem códons otimizados para a expressão em células de mamífero, preferencialmente células humanas. A presente invenção refere-se ainda a vacinas e métodos de prevenção ou tratamento de tumores induzidos por papilomavírus que compreendem a administração de uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas da presente invenção a animais ou humanos que delas necessitem.

Relatório descritivo da Patente de Invenção para:  
"SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSÃO,  
COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA SINÉRGICA QUE COMPREENDE UM VETOR DE  
EXPRESSÃO QUE CODIFICA A PROTEÍNA E7 DO VÍRUS DO PAPILOMA  
5 HUMANO (HPV) FUSIONADA À PROTEÍNA gD DO VÍRUS HERPES HUMANO  
TIPO 1 (HSV-1) E UM VETOR DE EXPRESSÃO QUE CODIFICA UMA  
CITOCINA E SEUS USOS"

#### CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a composições  
10 imunogênicas sinérgicas que compreendem um vetor de  
expressão que codifica a proteína E7 de HPV fusionada à  
proteína gD de HSV, um vetor de expressão que codifica uma  
citocina e um veículo farmacologicamente aceitável.

A presente invenção refere-se também a seqüências de  
15 ácido nucléico isoladas que codificam a proteína E7 de HPV  
fusionada à proteína gD de HSV e compreendem códons  
otimizados para a expressão em células de mamífero,  
preferencialmente células humanas.

A presente invenção refere-se também a vetores de  
20 expressão que codificam seqüências de ácido nucléico da  
presente invenção.

A presente invenção refere-se também ao uso de uma ou  
mais composições imunogênicas sinérgicas da presente  
invenção na manufatura de uma vacina para prevenção e/ou  
25 tratamento de tumores induzidos por papilomavírus em  
animais ou humanos. A presente invenção refere-se também a  
vacinas que compreendem uma ou mais composições  
imunogênicas sinérgicas da presente invenção.

A presente invenção refere-se ainda a métodos de  
30 prevenção ou tratamento de tumores induzidos por  
papilomavírus que compreendem a administração de uma ou  
mais composições imunogênicas sinérgicas da presente  
invenção a animais ou humanos que delas necessitem.

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O câncer de colo de útero é a terceira principal causa de morte por câncer em mulheres de todo o mundo causando 200.000 mortes por ano (PISANI P. PARKIN D.M., BRAY F. AND FERLAY J. (1999) Estimates of the worldwide mortality from 5 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer* 83:18-29). Dados epidemiológicos mostram uma clara relação entre a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) e o desenvolvimento de câncer do colo do útero, sendo que o genoma de HPV pode ser detectado em mais de 99% dos casos deste tipo de câncer. 10 Mais de 100 tipos de HPV foram descritos, e cerca de 20 têm mostrado propensão a infectar os tecidos do trato anogenital. Alguns tipos de HPV causam verrugas e lesões benignas e raramente são encontrados em carcinomas invasivos, sendo chamados de genótipos de baixo risco, como 15 o HPV-6 e o HPV-11. Os genótipos do HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 e HPV-45 são freqüentemente encontrados em tecidos tumorais do colo do útero, sendo chamados de genótipos de alto risco (WALBOOMERS, J.M., JACOBS M.V., MANOS M.M. et al (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of 20 invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 198:12-19). As proteínas E6 e E7 dos genótipos de alto risco são capazes degradar p53 e inativar pRb, proteínas reguladoras do ciclo celular, interferindo no crescimento e multiplicação celular (HOWLEY P.M. (1991) Role of the human 25 papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res.* 51:5019s-5022s). Entre os genótipos de alto risco, destaca-se o HPV-16 encontrado em 50% a 60% dos casos de câncer do colo do útero, podendo ser considerado o principal agente etiológico da doença (BOSCH F.X., MANOS M.M., MUÑOZ N., 30 SHERMAN M., JANSEN A.M., PETO J., SCHIFFMAN M.H., MORENO V., KURMAN R., SHAH K.V. (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 87(11):796-802).

Como o câncer cervical é causado por um tipo de infecção viral, seria esperado que uma vacina capaz de gerar anticorpos neutralizantes que bloqueiem a entrada do vírus reduzisse a incidência deste tipo de câncer a longo prazo. Duas vacinas profiláticas baseadas em VLPs (Virus like particles) formados pela proteína L1 dos tipos virais HPV-6, -11, -16 e 18 (Gardasil) ou somente dos HPV-16 e -18 (Cervarix) estão disponíveis no mercado. Entretanto, caso a infecção já tenha sido estabelecida, outro tipo de vacina faz-se necessária, pois os anticorpos neutralizantes não são capazes de eliminar o vírus ou inibir o crescimento de tumores. Novas abordagens terapêuticas anti-tumorais são continuamente investigadas e dentre elas, a imunoterapia ou à utilização de vacinas terapêuticas representa uma forma de crescente relevância. O conhecimento dos mecanismos imunológicos tem permitido que essas abordagens sejam continuamente aprimoradas e se traduzam em progressos clínicos contínuos. Diante disso, a relevância da pesquisa de vacinas terapêuticas contra o câncer cervical, deve ser enfatizada, uma vez que centenas de milhões de pessoas estão infectadas pelo vírus e que poderão desenvolver tumores no futuro, já que o HPV é geralmente contraído por mulheres jovens mas o câncer se manifesta apenas depois dos 50 anos de idade (LEPIQUE A.P., RABACHINE T., VILLA L.L. (2009) HPV vaccination: the beginning of the end of cervical cancer? - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104(1):1-10).

As vacinas terapêuticas contra o câncer surgem como uma alternativa a processos cirúrgicos e radioterápicos. Diversos grupos têm descrito o desenvolvimento de vacinas que trazem como alvo as células cancerosas induzidas por HPV-16. Estudos de imunoterapia antígeno-específica mostram que tumores induzidos pelo HPV podem ser controlados e por vezes eliminados por ativação de resposta mediada por

células T específicas contra as proteínas E7 e E6 (LING M., KANAYAMA M., RODEN R., et al. (2000) Preventive and therapeutic vaccines for human papillomavirus-associated cervical cancers. *J Biomed Sci.* 7(5):341-356). Vacinas de DNA contra o HPV-16 que utilizam o gene da oncoproteína E7 na sua forma nativa induzem baixos níveis de ativação de células T CD8<sup>+</sup> e conseqüentemente não protegem animais contra o desafio utilizando células transformadas pelo HPV-16 (HUNG C. F., MONIE A., ALVAREZ R. D., et al. (2007) DNA vaccines for cervical cancer: from bench to bedside. *Exp. Mol. Med.* 39:679-689.; KANODIA S., DA SILVA D.M., KAST W.M. (2008) Recent advances in strategies for immunotherapy of human papillomavirus-induced lesions. *Int J Câncer.* 15;122(2):247-59). Estratégias alternativas de apresentação antigênica, como o direcionamento da expressão a compartimentos celulares específicos, são capazes de aumentar as respostas imunológicas específicas e proteger animais contra o HPV-16 (JI H., WANG T.L., CHEN C.H., et al. (1999) Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors. *Hum Gene Ther.* 10:2727-2740.; RODRIGUEZ F., AN L.L., HARKINS S., et al. (1998) DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination. *J Virol.* 72(6):5174-5181.; CHENG W.F., HUNG C.F., CHAI C.Y., et al. (2001) Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *J. Clin. Invest.* 108:669-678.; CHU N.R., WU H.B., WU T., et al. (2000) Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) hsp65 and HPV16 E7.

*Clin Exp Immunol.* 121:216-225.; HUNG C.F., TSAI Y.C., HE L., et al. (2007) DNA vaccines encoding Ii-PADRE gnerates potent PADRE-specific CD4(+) T-cell immune responses and enhances vaccine potency. *Mol. Ther.* 15:1211-1219).

5           Recentemente foram desenvolvidas vacinas de DNA capazes de expressar as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 na superfície celular das células transfectadas (LASARO, M. O., DINIZ, M. O., ARTURO, R., ERTL, H. C., FERREIRA, L. C. S., (2005) Anti-tumor DNA vaccines based on the expression  
10 of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. *Microbes and Infection.* 7:1541-1550).

          Neste estudo, as oncoproteínas E6 e E7 foram fusionadas geneticamente à glicoproteína D (gD) do vírus do  
15 herpes simplex tipo 1 (HSV-1). A proteína E7 foi inserida em sítios permissíveis próximos a extremidade C-terminal da proteína gD do vírus herpes simplex tipo-1 (HSV-1) e o respectivo gene clonado em vetor apropriado para expressão em células eucariotas. Este vetor foi denominado pgDE7.

20           Posteriormente foi também publicado o pedido de patente WO2008027394 que descreve construções quiméricas da proteína gD e as oncoproteínas E5, E6 e E7 do HPV-16 seja na forma de vacina de DNA ou vetores virais. As construções de E7 fusionado a gD aumentam as respostas imunes contra a  
25 proteína E7, particularmente respostas mediadas por linfócitos T CD8+, e a proteção profilática a tumores que expressem a proteína E7. A estratégia de clonagem de seqüências heterólogas no gene que codifica a proteína gD usada neste estudo foi a mesma daquela descrita  
30 anteriormente por LASARO et al. 2005 (LASARO, M. O., DINIZ, M. O., ARTURO, R., ERTL, H. C., FERREIRA, L. C. S., (2005) Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. *Microbes*

*and Infection*. 7:1541-1550). A proteína gD do HSV-1 é uma proteína que apresenta superfície exposta, ficando ancorada à membrana das células infectadas através de uma seqüência pequena localizada próxima à região C-terminal. Desta forma, as oncoproteínas do HPV-16 estariam sendo expressas no meio extracelular, reduzindo drasticamente os riscos oncogênicos das células transfectadas. Além disso, a proteína gD tem a capacidade de aumentar a imunogenicidade de E7, e de outras proteínas a ela fusionadas, por exercer uma competição com o receptor BTLA (B and T lymphocyte attenuator) pelo sítio de interação do receptor HVEM (Herpes vírus entry mediator), reduzindo os efeitos co-inibitórios de BTLA em linfócitos T e B (LASARO M.O., TATSIS N., HENSLEY S.E., WHITBECK J.C., LIN S.W., RUX J.J., WHERRY E.J., COHEN G.H., EISENBERG R.J., ERTL H.C. (2008) Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses. *Nat Med*. 14(2):205-12).

Assim, o vetor que expressa a proteína E7 fusionada à gD (pgDE7), em regime vacinal de quatro doses, promoveu a ativação de células T CD8<sup>+</sup> específicas contra E7 e protegeu preventivamente todos os animais desafiados profilaticamente com células tumorais. Além disso, a administração da vacina em animais que já continham as células tumorais foi capaz de regredir os tumores em 40% dos animais e retardar a evolução dos tumores nos animais não protegidos (LASARO, M. O., DINIZ, M. O., ARTURO, R., ERTL, H. C., FERREIRA, L. C. S., (2005) Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. *Microbes and Infection*. 7:1541-1550).

Um vetor que expressa as proteínas E5, E6 e E7 do HPV-16 fusionadas à glicoproteína D do HSV-1 (pgDE7E6E5) foi



também descrito no pedido de patente WO/2008/027394. Os dados já publicados envolvendo essa construção demonstram que uma dose da vacina gera proteção profilática completa à formação de tumores (LASARO M.O., TATSIS N., HENSLEY S.E., WHITBECK J.C., LIN S.W., RUX J.J., WHERRY E.J., COHEN G.H., EISENBERG R.J., ERTL H.C. (2008) Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses. *Nat Med.* 14(2):205-12). Entretanto, em estudos adicionais utilizando este vetor, observou-se que o mesmo não é eficaz na proteção camundongos que foram previamente inoculados com as células tumorais, que consiste no principal objetivo de uma vacina terapêutica contra câncer. Neste caso, a vacina apenas confere proteção parcial ao desafio com células tumorais em um regime de tratamento terapêutico mantendo 70% dos camundongos livres de tumores após um regime vacinal de 3 doses (DINIZ, M.O., LASARO, M.O., ERTL, H.C., FERREIRA, L.C.S. (2010) Immune responses and therapeutic anti-tumor effects of an experimental DNA vaccine encoding the human papillomavirus type-16 (HPV-16) oncoproteins genetically fused to the herpes virus glycoprotein D (gD). *Clinical and Vaccine Immunology*, Ahead of print).

Desta forma, considerando-se camundongos que já continham previamente células tumorais, os plasmídeos vacinais pgDE7 e pgDE7E6E5 demonstram efeito terapêutico anti-tumoral mas não são efetivos na erradicação das células tumorais em 100% dos animais testados.

Como estratégia alternativa para aumentar a resposta induzida por uma vacina de DNA, além da fusão a genes de proteínas heterólogas, podem ser utilizadas citocinas relacionadas à ativação ou proliferação de células T, como a IL-2 (interleucina-2), IL-12 (interleucina-12) e GM-CSF (Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos). Plasmídeos que codificam estas citocinas são

potentes adjuvantes capazes de aumentar a resposta imune humoral e citotóxica em modelo animal (BAROUCH, D. H., A. CRAIU, M. J. KURODA, J. E. SCHMITZ, X. X. ZHENG, S., SANTRA, J. D. FROST, G. R. KRIVULKA, M. A. LIFTON, C. L. CRABBS, G. HEIDECKER (2007) Induction of specific immune responses by severe acute respiratory syndrome coronavirus spike DNA vaccine with or without interleukin-2 immunization using different vaccination routes in mice. *Clinical and vaccine immunol.* 14:894-901; CHOW, Y. H., B. L. CHIANG, Y. L. LEE, W. K. CHI, W. C. LIN, Y. T. CHEN, AND M. H. TAO. (1998) Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes. *J. Immunol.* 160:1320-1329).

Nesse contexto, a interleucina-2 (IL-2) é uma citocina potente produzida por células T ativadas, capaz de ativar múltiplos compartimentos do sistema imune e atua na proliferação clonal de células T (WALDMANN T.A. (2006) The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol.* 6:595-601).

IL-2 é um dos adjuvantes sistêmicos mais amplamente utilizados para vacinas baseadas em peptídeos. Seu uso clínico foi aprovado pelo FDA para o tratamento de câncer renal metastático e melanoma maligno, sendo capaz de induzir respostas clínicas em 15% dos pacientes com estes tipos de cânceres (ROSENBERG S.A., YANG J.C., TOPALIAN S.L., SCHWARTZENTRUBER D.J., WEBER J.S., PARKINSON D.R., et al (1994). Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA.* 271(12):907-13). Alguns estudos que empregam plasmídeos que contém o gene da IL-2 têm obtido aumentos significativos nas respostas imunológicas contra o herpes bovino tipo I (KUHNLE, G., R. A. COLLINS,

J. E. SCOTT, AND G. M. KEIL. (1996). Bovine interleukins 2 and 4 expressed in recombinant bovine herpesvirus 1 are biologically active secreted glycoproteins. *J. Gene Virol.* 77:2231-2240), vírus de hepatite C (GEISSLER, M., A. GESIEN, K. TOKUSHIGE, AND J. R. WANDS. (1997). Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. *J. Immunol.* 158:1231-1237), vírus da imunodeficiência adquirida humana (MOORE, A. C., W. P. KONG, B. K. CHAKRABARTI, AND J. N. GARY. (2002). Effects of antigen and genetic adjuvants on immune responses to human immunodeficiency virus DNA vaccines in mice. *J. Virol.* 76:243-250), e contra tumores que expressam o HER2/Neu (LIN CC, CHOU CW, SHIAU AL, TU CF, KO TM, CHEN YL, et al. (2004) Therapeutic HER2/Neu DNA vaccine inhibits mouse tumor naturally overexpressing endogenous neu. *Molec Therapy* .10:290-301).

A co-expressão de IL-2 também tem sido utilizada para aumentar a resposta imune à glicoproteína D (gD) do HSV-1 utilizada como antígeno em vacinas de DNA (LI WR, NIU B, WANG JW, FENG ZJ, WANG DX. (2006) Coexpression of interleukin-2 enhances the immunization effect of a DNA vaccine expressing herpes simplex 1 glycoprotein D. *Acta Virol.* 50:251-6).

A citocina IL-12 também apresenta histórico de aplicação no tratamento de tumores. A citocina IL-12 tem demonstrado acentuada atividade anti-tumoral e anti-metastática em numerosos modelos animais (MAZZOLINI G, PRIETO J, MELERO I. (2003) Gene therapy of cancer with interleukin-12. *Curr. Pharm. Des.* 9(24):1981-91; RIEZEBOS-BRILMAN A, REGTSA J, CHEN M, WILSCHUTA J, DAEMENA T. (2009) Vaccine. 27:701-707). A capacidade de IL-12 de induzir resposta imune antígeno-específica está relacionada principalmente a sua habilidade de polarizar as resposta

imunológicas para um padrão Th1 (HSIEHC S, MACATONIA S E, TRIPP C S, WOLF S F, O'GARRA A, MURPHY K M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. Science. 260:547-549; MANETTI R, GEROSA F, GIUDIZI M G, BIAGIOTTI R, PARRONCHI P, PICCINNI M P, SAMPOGNARO S, MAGGI E, ROMAGNANI S, TRINCHIERI G, (1993) Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones. J. Exp. Med. 179:1273-1283; TSUNG K, MEKO J B, PEPLINSKI G R, TSUNG Y L, NORTON J A. (1997) IL-12 induces T helper 1-directed antitumor response. J. Immunol. 158:3359-3365).

A IL-12 também promove a maturação de células T citotóxicas e NK e atua como um sinal secundário ao antígeno no aumento da população de células T CD8<sup>+</sup> efectoras e de memória (WATFORD W T, MORIGUCHI M, MORINOBU A, O'SHEA J J. (2003) The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. Cytokine Growth Factor Rev. 14:361-368) (CURTSINGER J M, JOHNSON C M, MESCHER M F. (2003) CD8 T cell clonal expansion and development of eVector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. J. Immunol. 171:5165-5171; VALENZUELA J O, HAMMERBECK C D, MESCHER M F. Cutting edge: Bcl-3 up-regulation by signal 3 cytokine (IL-12) prolongs survival of antigen-activated CD8 T cells. J. Immunol. 174:600-604).

A IL-12 também é capaz de facilitar a apresentação de antígenos através do aumento na expressão de moléculas de MHC classe I e II associado à capacidade de IL-12 de promover a expressão de IFN- $\gamma$  (WEISS J M, SUBLESKI J J, WIGGINTON J M, WILTROUT R H. (2007) Expert Opin. Biol. Ther. 7;1705-1721.)

GM-CSF é capaz de iniciar a proliferação, diferenciação e ativação de macrófagos, neutrófilos e várias células apresentadoras de antígenos (APCs), atividade importante no controle terapêutico de diferentes tumores (WAKIMOTO H, ABE J, TSUNODA R, AOYAGI M, HIRAKAWA K, HAMADA H. (1996) Intensified antitumor immunity by a cancer vaccine that produces granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4. *Cancer Res.* 56:1828-1833; JAGER E, RINGHOFFER M, DIENES H P, ARAND M, KARBACH J, JAGER D, ILSEMANN C, HAGEDORN M, OESCH F, KNUTH A. (1996) Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. *Int. J. Cancer.* 67:54-62; JONES T, STERN A, LIN R. (1994) Potential role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as vaccine adjuvant. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13:S47-S53; DISIS M L, BERNHARD H, SHIOTA F M, HAND S L, GRALOW J R, HUSEBY E S, GILLIS S, CHEEVER M A. (1996) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines. *Blood.* 88:202-210).

Quando usado em combinação com vacinas de DNA ou de proteínas, o GM-CSF aumenta a apresentação antigênica atraindo células dendríticas para o sítio de vacinação (TOUBAJI A, HILL S, TERABE M, QIAN J, FLOYD T, SIMPSON M R, BERZOFSKY J A, KHLEIF S N. (2007) *Vaccine.* 25:5882-5891). Ensaio em modelo murino demonstram que GM-CSF induz respostas de células T específicas (AHLERS J D, DUNLOP N, ALLING D W, NARA P L, BERZOFSKY J A. (1997) Cytokine-adjuvant steering of the immune response phenotype to HIV-1 vaccine constructs: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and TNF-alpha synergize with IL-12 to enhance induction of cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 158:3947-3958).

Além disso, GM-CSF é utilizado em ensaios clínicos como adjuvante em vacinas baseadas em peptídeos (WEBER J, SONDAK V K, SCOTLAND R, PHILLIP R, WANG F, RUBIO V, STUGE T B, GROSHEN S G, GEE C, JEFFERY G G, SIAN S, LEE P P. (2003) Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor added to a multipeptide vaccine for resected Stage II melanoma. *Câncer*. 97:186-200; CHIANESE-BULLOCK K A, PRESSLEY J, GARBEE C, HIBBITTS S, MURPHY C, YAMSHCHIKOV G, PETRONI G R, BISSONETTE E A, NEESE P Y, GROSH W W, MERRILL P, FINK R, WOODSON E M, WIERNASZ C J, PATTERSON J W, SLINGLUFF C L. (2005) MAGE-A1-, MAGE-A10-, and gp100-derived peptides are immunogenic when combined with granulocyte macrophage colony-stimulating factor and montanide ISA-51 adjuvant and administered as part of a multipeptide vaccine for melanoma. *J. Immunol.* 174:3080-3086) e para tratamentos de diversos tipos de tumores (SPITLER L E, GROSSBARD M L, ERNSTOFF M S, SILVER G, JACOBS M, HAYES F A, SOONG S J. (2000) Adjuvant therapy of stage III and IV malignant melanoma using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Clin. Oncol.* 18:1614 -1621; CORREALE P, CUSI M G, TSANG K Y, DEL VECCHIO M T, MARSILI S, PLACA M L, INTRIVICI C, AQUINO A, MICHELI L, NENCINI C, FERRARI F, GIORGI G, BONMASSAR E, FRANCINI G. (2005) Chemo-immunotherapy of metastatic colorectal carcinoma with gemcitabine plus FOLFOX 4 followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin- 2 induces strong immunologic and antitumor activity in metastatic colon cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 23:8950-8958; CARTRON G, ZHAO-YANG L, BAUDARD M, KANOUNI T, ROUILLÉ V, QUITTET P, KLEIN B, ROSSI J F. (2008) Granulocyte-macrophage colony stimulating factor potentiates rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: Results of a phase II study. *J. Clin. Oncol.* 26:2725-2731; HONKOOP A H, LUYKX-DE BAKKER S A, HOEKMAN K,

MEYER S, MEYER O W, VAN GROENINGEN C J, VAN DIEST PJ, BOVEN E, VAN DER WALL E, GIACCONE G, WAGSTAFF J, PINEDO H M. (1999) Prolonged neoadjuvant chemotherapy with GM-CSF in locally advanced breast cancer. *The Oncologist*. 4:106 - 111).

Diversos estudos clínicos utilizando vacinas de DNA fracassaram por não reproduzirem os efeitos imunológicos encontrados em camundongos ou mesmo em primatas não humanos. Embora tais ensaios demonstrem a segurança das vacinas de DNA, ficou evidente que modificações devem ser feitas nas formulações para aumentar as respostas imunológicas em humanos. Uma forma de aumentar a imunogenicidade das vacinas de DNA envolve o uso de adjuvantes variados. Alguns destes adjuvantes visam melhorar a eficiência de expressão dos antígenos codificados, seja por métodos que promovam uma maior eficiência de transfecção celular seja por meio da otimização da expressão através de mudanças nos códons do gene alvo (KUTZLER MA AND WEINER D. (2008) DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Ver Genet* . 9(10):776-88). Nesta última abordagem as seqüências de nucleotídeos dos genes alvo são modificadas de modo que, durante a tradução nas células transfectadas, sejam empregados os tipos mais abundantes de RNA transportador para um determinado aminoácido resultando em um aumento na produção do antígeno e, conseqüentemente, indução de maiores respostas imunológicas específicas.

Um procedimento importante para garantir a segurança de vacinas voltadas para o controle de tumores causados pelos vírus do papiloma humano é a modificação de aminoácidos críticos para a ação cancerígena das oncoproteínas E6 e, particularmente, E7. Tal procedimento envolve a modificação de aminoácidos na região compreendida entre os aminoácidos 19 a 26 da proteína E7, cujos resíduos

levam à inativação da proteína pRB em células epiteliais com conseqüente perda do controle da divisão celular e crescimento descontrolado característico das neoplasias associadas ao vírus do papiloma.

#### 5 OBJETIVOS DE INVENÇÃO

A presente invenção tem por objetivo prover composições imunogênicas sinérgicas que compreendem um vetor de expressão que codifica a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de HSV, um vetor de expressão que  
10 codifica uma citocina e um veículo farmacologicamente aceitável.

Em particular a presente invenção tem por objetivo prover composições imunogênicas sinérgicas que compreendem um vetor de expressão que codifica a proteína E7 de HPV  
15 fusionada à proteína gD de HSV, um vetor de expressão que codifica uma citocina e um veículo farmacologicamente aceitável em que o HPV é HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 ou HPV-45, o HSV é HSV-1 ou HSV- 2, a citocina é IL-2, IL-12 ou GM-CSF e o veículo farmacologicamente aceitável é salina,  
20 lipossomos, emulsões lipídicas e/ou micropartículas de PLGA.

Constitui um outro objetivo da presente invenção prover seqüências de ácido nucléico isoladas que codificam a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de HSV e  
25 compreendem códons otimizados para a expressão em células de mamífero, preferencialmente células humanas.

Em particular constitui um objetivo da presente invenção prover seqüências de ácido nucléico isoladas que codificam a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de  
30 HSV e compreendem códons otimizados para a expressão em células de mamífero, preferencialmente células humanas em que a seqüência é adicionalmente mutada de forma impedir a interação da proteína E7 de HPV com a proteína celular Rb e



em que o HPV é HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 ou HPV-45, o HSV é HSV-1 ou HSV- 2.

Constitui outro objetivo da presente invenção prover vetores de expressão que codificam seqüências de ácido  
5 nucléico da presente invenção.

Constitui outro objetivo da presente invenção o uso de uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas da presente invenção na manufatura de uma vacina para prevenção e/ou tratamento de tumores induzidos por papilomavírus em  
10 animais ou humanos.

Constitui outro objetivo da presente invenção prover vacinas que compreendem uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas da presente invenção.

Constitui outro objetivo da presente invenção métodos  
15 de prevenção ou tratamento de tumores causados por papilomavírus que compreende administrar uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas da presente invenção a animais ou humanos que delas necessitem.

#### DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

20 As figuras a seguir fazem parte do presente relatório e estão aqui incluídas a fim de ilustrar determinados aspectos da invenção. O objeto da presente invenção pode ser melhor entendido com referência a uma ou mais dessas figuras, em combinação com a descrição detalhada da  
25 modalidade preferida aqui apresentada.

A Figura 1 mostra esquematicamente os vetores plasmidiais utilizados nos Exemplos da presente invenção. Na Figura 1A está representado o vetor pgDE7 que codifica a proteína E7 do HPV-16 geneticamente fusionada à proteína gD  
30 do HSV-1 e contém um gene de resistência à ampicilina e promotor derivado do vírus do sarcoma de Rous para expressão do antígeno vacinal Na Figura 1B está representado o vetor pIL-2 que codifica a citocina IL-2 murina. Figura 1C está representado o vetor pVaxgDE7 que

codifica a proteína E7 do HPV-16 geneticamente fusionada à proteína gD do HSV-1 e contém o gene de resistência à canamicina e promotor derivado do citomegalovírus para a expressão do antígeno vacinal. Na Figura 1D está representado o vetor pgDE7h que possui gene de resistência à canamicina e codifica a proteína E7 do HPV-16 geneticamente fusionada à proteína gD do HSV-1 e cujos seqüência gênica possui códons otimizados para o sistema de expressão em células humanas.

10 A Figura 2 mostra o ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células tumorais TC-1 e imunizados com uma dose de cada um dos vetores pgD, pIL-2 e pgDE7 isoladamente, ou três doses do vetor pgDE7, ou uma, duas ou três doses da composição imunogênica 1 (pgDE7+pIL-2) (Efeito protetor).

A Figura 3 mostra um ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células tumorais TC-1 e imunizados com uma dose de 100µg do vetor pIL-2 ou uma dose da composição imunogênica 1 (pgDE7+pIL-2) administrada nas concentrações de 100µg, 50µg, 25µg ou 10µg DNA /100 µL/dose (Efeito protetor).

A Figura 4 mostra um ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células tumorais TC-1 e imunizados com uma dose de 100µg do vetor pIL-2 ou uma dose da composição imunogênica 1 (pgDE7+pIL-2) administrada na concentração de 50µg DNA /100µL/dose administrada no mesmo dia (dia 0), 3, 7, 10 ou 14 dias após o desafio (Efeito protetor). A Figura 5 mostra o crescimento de tumores em camundongos C57BL/6 desafiados com células tumorais TC-1 e imunizados com uma dose de cada um dos vetores pIL-2 e pDE7 isoladamente ou com uma dose da composição imunogênica 1 (pgDE7+pIL-2) na concentração de 50µg de DNA/100 µL/dose administradas 3 dias após o desafio (Variação do tamanho do tumor). A Figura 6 mostra um ensaio de proteção terapêutica

de camundongos C57BL/6 desafiados com células tumorais TC-1 e imunizados com uma dose de cada um dos vetores pIL-2 e pVaxgDE7 isoladamente ou com uma dose da composição imunogênica 2 (pVaxgDE7+pIL-2) na concentração de 50µg de DNA/100 µL/dose administradas 3 dias após o desafio (Efeito protetor). A Figura 7 mostra um ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células tumorais TC-1 e imunizados com uma dose dos vetores pIL-2, pgDE7 ou pgDE7h (isoladamente na concentração de 50µg de DNA/100 µL/dose administradas 3 dias após o desafio. (Efeito protetor).

A Figura 8 mostra a quantidade mínima do vetor pgDE7h necessária à eficácia terapêutica anti-tumoral máxima da composição imunogênica 3 (pgDE7h+pIL-2). É mostrado um ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células tumorais TC-1 e imunizados com uma dose de cada um dos vetores pIL-2 e pgDE7h isoladamente ou uma dose da composição imunogênica 3 (pgDE7h+pIL-2) em diversas concentrações de DNA /dose administradas 3 dias após o desafio. Os animais foram imunizados com uma dose de 50µg DNA/100 µL/dose do vetor pIL-2, ou do vetor pgDE7h, ou da composição imunogênica 3 (pgDE7h+pIL-2) e com uma dose de 25µg DNA/100 µL/dose do vetor pgDE7h ou da composição imunogênica 3 (pgDE7h+pIL-2) (Fig. 8A), ou uma dose de 10µg DNA/100 µL/dose do vetor pgDE7h ou da composição imunogênica 3 (pgDE7h+pIL-2) ou uma dose de 5µg DNA/100 µL/dose do vetor pgDE7h ou da composição imunogênica 3 (pgDE7h+pIL-2) (Fig. 8B).

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

#### **30 Das composições imunogênicas sinérgicas**

A presente invenção fornece composições imunogênicas sinérgicas para prevenção e tratamento de tumores causados por papilomavírus em animais e humanos.

As composições imunogênicas sinérgicas da presente invenção compreendem um vetor de expressão que codifica a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de HSV, um vetor de expressão que codifica uma citocina e um veículo farmacologicamente aceitável.

Preferencialmente, o vetor de expressão que codifica a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de HSV codifica uma a seqüência de E7 de HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 ou HPV-45. Ainda mais preferencialmente, a seqüência de E7 é de HPV-16.

Preferencialmente, o vetor de expressão que codifica a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de HSV codifica uma seqüência de gD de HSV-1 ou HSV-2. Ainda mais preferencialmente, a seqüência de gD é de HSV-1.

Em outra modalidade o vetor de expressão que codifica a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de HSV codifica uma seqüência de ácido nucléico cujos códons são otimizados para a expressão em células de mamífero. Ainda mais preferencialmente códons são otimizados para a expressão em células humanas.

Preferencialmente o vetor de expressão que codifica a a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de HSV codifica uma seqüência de ácido nucléico cujos códons são otimizados para a expressão em células de mamífero ou humanas e cuja seqüência é mutada de forma impedir a interação da proteína E7 de HPV com a proteína celular Rb.

Ainda mais preferencialmente a seqüência é mutada nas posições 24 e 26 de E7. Preferencialmente as posições 24 e 26 de E7 são mutadas para uma glicina.

Em outra modalidade, a seqüência que codifica a proteína E7 poderia ser facilmente trocada por seqüências que codificam para outras oncoproteínas codificadas por outro vírus do papiloma, humano ou de outros animais, como as proteínas E5, E6 e E2.

Em outra modalidade, o vetor de expressão que codifica uma citocina, codifica a IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 ou GM-CSF assim como outras citocinas que possam atuar sinergicamente sobre os efeitos anti-tumorais da composição imunogênica. Preferencialmente o vetor de expressão que  
5 codifica uma citocina, codifica a IL-2. A citocina IL-2 pode ser humana ou de outras espécies de mamíferos.

Em outra modalidade as composições imunogênicas da presente invenção podem compreender proteínas purificadas derivadas das seqüências codificadas pelos vetores de  
10 expressão que codificam a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de HSV e pelo vetor de expressão que codifica a citocina de interesse conforme descrito na presente invenção.

As composições imunogênicas sinérgicas da presente invenção são preparadas usando boas práticas de laboratório e de boas práticas de fabricação, livres de endotoxinas e adequadas para o uso em testes pré-clínicos e/ou clínicos.  
15

As composições imunogênicas sinérgicas da presente invenção podem ser preparadas utilizando-se diversos veículos farmacologicamente aceitáveis.  
20

Conforme usado na presente invenção, o emprego do termo "farmacologicamente aceitável" significa um sólido não-tóxico, inerte, excipiente líquido semi-sólido, diluente, formulação auxiliar de qualquer tipo, ou simplesmente um meio aquoso estéril, tal como salina. Alguns exemplos dos materiais que podem servir como veículos farmacologicamente aceitáveis são açúcares, tais como lactose, glicose e sacarose, os amidos, tais como amido de milho e o amido de batata, a celulose e os seus derivados, tais como a carboximetilcelulose de sódio, a etilcelulose e o acetato de celulose, ciclodextrina; óleos, tais como óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de girassol, óleo de gergelim, óleo de oliva, óleo de  
25  
30

milho e óleo de semente de soja; glicóis, tais como propilenoglicol, polióis, tais como glicerina, sorbitol, manitol e de polietileno; ésteres, tais como o laurato etílico, oleato etílico, ágar; agentes tamponantes, tais como o hidróxido de alumínio e hidróxido de magnésio; ácido algínico; água livre de pirogênio; salina isotônica, solução de Ringer; soluções tampões de álcool etílico e fosfato, assim como outras substâncias não tóxicas compatíveis usadas em formulações farmacêuticas.

10 Preferencialmente o veículo é salina.

Em outra modalidade o veículo compreende adicionalmente sistemas de entrega não-virais, de liberação sustentada ou controlada como lipossomos, emulsões lipídicas, partículas biodegradáveis, constituídas de ácido glicólico poli-lactato (PLGA) e quitosana, assim como o emprego de outros adjuvantes voltados para o aumento da eficácia terapêutica e preventiva da composição.

Atualmente, os sistemas não-virais são os mais utilizados para a entrega de ativos farmacêuticos, dentre os quais se destacam as microesferas de PLGA e os lipossomas. As microesferas compostas por polímeros de ácido lático e glicólico (PLGA) possuem potencial para atuar como mediadores de transfecção de células fagocíticas como macrófagos e células dendríticas, além de proteger o DNA contra degradação biológica por endonucleases aumentando a taxa de transfecção. As microesferas de PLGA são compostas de material biodegradável e biocompatível, são inócuas, são fagocitadas por células APCs e já são aprovadas pelo FDA dos EUA para uso humano. As microesferas de PLGA apresentam grande aplicabilidade para vetorização de vacinas de DNA, uma vez que pode ser projetada para liberar quantidades do plasmídeo de forma contínua e/ou rápida. A velocidade de hidrólise de tais polímeros depende: de sua composição química, da proporção dos

monômeros; do tamanho da cadeia e do tamanho das partículas, podendo-se obter tempos de degradação que variam entre 2 semanas a 24 meses aproximadamente. A combinação da difusão através de poros e da erosão da matriz polimérica permite controlar a taxa de liberação do DNA ou do antígeno encapsulado nas microesferas. Esta propriedade permitiu a criação pelo grupo do conceito de vacina de dose única onde a formulação composta por microesferas de tamanho, porosidade e composição polimérica diferentes, libera os plasmídeos contendo E7 e IL-2 em intervalos de tempo que mimetizariam as doses de reforço de uma vacina. Outras vantagens na utilização desses sistemas para os plasmídeos E7 e IL-2 são: fácil administração; alta estabilidade, uma vez que são liofilizadas e podem ser reconstituídas imediatamente antes da administração.

Os lipossomas, ou vesículas de fosfolipídios, são agregados de fosfolipídios em estruturas de bicamada, contendo um volume aquoso central circundado por uma ou várias lamelas concêntricas, formando partículas unilamelares ou multilamelares, com diâmetros da ordem de dezenas de nanômetros a dezenas de micra. Durante sua formação, os lipossomas encapsulam parte do meio aquoso em que se encontram dispersos. A bicamada é capaz de acomodar moléculas hidrofóbicas e comporta-se como uma membrana semipermeável com relação ao material encapsulado no volume aquoso das vesículas. Com relação às características eletroquímicas, os lipossomas podem ser catiônicos, aniônicos ou neutros. Porém, no que se refere ao uso de biomoléculas com carga negativa (como DNA e algumas proteínas), a encapsulação dessas moléculas em lipossomas catiônicos é mais eficiente devido à interação eletrostática lipossoma-biomolécula.

Os lipossomas catiônicos são usados geralmente para carrear moléculas negativas como o DNA e facilitar a sua

entrada na célula. Esses lipossomas podem conter somente o lipídio catiônico ou uma mistura com lipídios neutros, como o, L- $\alpha$ -dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) e colesterol. Inicialmente utilizava-se a estearilamina como lipídio catiônico, porém, os estudos não prosseguiram devido à sua citotoxicidade. Atualmente vários outros lipídios catiônicos foram produzidos, dentre os quais, os sais quaternários de amônio, como o 1,2-dioleoil -3-trimetilamônio-propano (DOTAP) e o brometo de dimetildiocetadecil amônio, são os mais usados devido à citotoxicidade reduzida (de la Torre LG, Rosada RS, Trombone APF, Frantz FG, Coelho-Castelo AAM, Silva CL, and Santana MHA (2009). The synergy between structural stability and DNA-binding controls the antibody production in EPC/DOTAP/DOPE liposomes and DOTAP/DOPE lipoplexes. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 73, 175-184).

Ao contrário do que ocorre com vacinas administradas desprotegidas por via intramuscular, as vacinas de DNA encapsuladas em lipossomas e administradas pela mesma via, protegem a biomolécula de nucleases e proteases e são preferencialmente capturadas por células apresentadoras de antígenos, potencializando a resposta imune. É descrito que o principal caminho de entrada na célula é a endocitose, e o menos usual (apenas 2%), por fusão do lipossoma com a membrana celular e liberação do seu conteúdo diretamente para o citossol (TROMBONE APF, SILVA CL, ALMEIDA LP, ROSADA RS, LIMA KM, OLIVER C, JAMUR MC AND COELHO-CASTELO A (2007). Tissue distribution of DNA-Hsp65/TDM-loaded PLGA microspheres and uptake by phagocytic cells. Genetics Vaccine and Therapy, 5:9) (PAULA L, SILVA CL, CARLOS D, MATIAS-PERES C, SORGI CA, SOARES EG, SOUZA, PRM, BLADÉS, CRZ, GALLETI FCS, BONATO VLD, GONÇALVES EDC, SILVA EVG AND FACCIOLI LH (2007). Genetics Vaccine and Therapy, 5:2) Resultados prévios do grupo mostram que os plasmídeos



contendo E7 e IL-12 são eficientemente encapsulados, ou seja, complexado nas bicamadas internas das vesículas, aqui designado por DRV(DNA), ou localizado na sua superfície externa, DRV-DNA. Nessas siglas, o prefixo DRV (Dehydrated-  
5 Rehydrated Vesicles) refere-se a vesículas preparadas pelo método da desidratação-rehidratação.

As composições da presente invenção podem ser administradas por qualquer modo biologicamente aceitável, i.e. qualquer modalidade que possa produzir níveis eficazes  
10 dos compostos ativos sem causar efeitos adversos clinicamente indesejáveis. Tais modos de administração incluem as vias oral, retal, sublingual, tópica, nasal, transdermal ou parenteral. O termo "parenteral" inclui subcutânea, intravenosa, epidural, irrigação,  
15 intramuscular, bombas de liberação, ou de infusão. Particularmente, nesta invenção a via intramuscular é referida para administração das composições aqui reivindicadas.

As doses podem ser aplicadas em quantidades que podem  
20 variar entre 0,1 µg de DNA a 100 µg de DNA por dose no modelo murinho, e em humanos ou outras espécies de mamíferos com doses que podem variar entre 0,1 µg de DNA a 5 mg de DNA por dose.

Em suma, a composição imunogênica proposta está  
25 baseada na combinação de dois vetores (um que codifica para citocina e o outro que codifica para a proteína híbrida gD/E7). Esta composição inédita apresenta propriedades imunológicas e anti-tumorais aumentadas e inesperadas que conferem proteção preventiva e terapêutica contra tumores  
30 causados por papilomavírus.

A combinação dos dois vetores revelou propriedades sinérgicas inesperadas que conferem efeitos anti-tumorais únicos às composições imunogênicas da presente invenção que não podem ser alcançados com formulações baseadas apenas em

vetores que expressam as proteínas do HPV fusionadas à proteína gD do HSV já descritos no estado da técnica.

**Das seqüências que codificam a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de HSV compreendendo códons otimizados para a expressão em células de mamífero, preferencialmente células humanas.**

A presente invenção fornece também seqüências de ácido nucléico isoladas que codificam a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de HSV e compreendem códons otimizados para a expressão em células de mamífero, preferencialmente células humanas.

Esta seqüência gênica artificial promove o aumento da imunogenicidade das proteínas E7 e gD e representa um passo fundamental para o incremento da eficácia preventiva e terapêutica das composições imunogênicas da presente invenção.

Em uma outra modalidade esta seqüência pode ser adicionalmente mutada de forma impedir a interação da proteína E7 de HPV com a proteína pRb envolvida no controle do ciclo de multiplicação celular. Tais mudanças visam eliminar qualquer atividade oncogênica residual da proteína E7, evitando que a expressão da proteína quimérica possa interferir no ciclo celular das células transfectadas e aumentam a segurança da seqüência de ácidos nucléicos e das composições que a compreendam.

O estudo do mapeamento da região de interação entre E7 e Rb in vitro revelou que a troca alguns aminoácidos na região corresponde ao domínio de interação com a proteína pRB, particularmente resíduos situados entre as posições 20 ao 26. Em particular, a troca do aminoácido cisteína na posição 24 por uma serina diminui significativamente a ligação de E7 de HPV-16 à pRb. De forma semelhante, a troca do ácido glutâmico na posição 26 por uma glutamina reduziu a capacidade da proteína E7 ligar-se à pRB (MÜNGER K,

WERNES B A, DYSON N, PHELPS W C, HARLOW E, HOWLEY P M. (1989) Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. EMBO J. 8:4099-4105).

5 Assim, as mutações na seqüência que codifica a proteína E7 são preferencialmente nos aminoácidos das posições 24 e 26 de E7. Ainda mais preferencialmente a cisteína da posição 24 de E7 é mutada para uma glicina e o ácido glutâmico da posição 26 de E7 é mutado para uma  
10 glicina.

Preferencialmente as seqüências de ácido nucléico isoladas que codificam a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de HSV e que compreendem códons otimizados para a expressão em células de mamífero, codificam a proteína E7  
15 de HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 e HPV-45. Ainda mais preferencialmente as seqüências de ácido nucléico isoladas codificam a proteína E7 de HPV-16.

Preferencialmente as seqüências de ácido nucléico isoladas que codificam a proteína E7 de HPV fusionada à  
20 proteína gD de HSV e que compreendem códons otimizados para a expressão em células de mamífero codificam a gD de HSV-1 ou HSV-2. Ainda mais preferencialmente as seqüências de ácido nucléico isoladas codificam a proteína gD de HSV-1.

A presente invenção provê ainda vetores de expressão  
25 que codificam seqüências de ácido nucléico da presente invenção.

**Do uso das composições imunogênicas e das seqüências de ácido nucleio da presente invenção.**

Constitui um aspecto da presente invenção o uso de um  
30 vetor de expressão que codifica a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de HSV e de um vetor de expressão que codifica uma citocina para a prevenção e tratamento de tumores induzidos por diferentes papilomavírus em animais ou humanos.

Constitui outro aspecto da presente invenção o uso de uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas, da presente invenção na manufatura de uma vacina para prevenção, controle ou tratamento de tumores induzidos por papilomavírus em animais ou humanos.

Constitui ainda um aspecto da presente invenção métodos de prevenção de tumores induzidos por papilomavírus caracterizado por compreender administrar uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas da presente invenção animais ou humanos que delas necessitem.

Constitui ainda um aspecto da presente invenção métodos de controle ou tratamento de tumores induzidos por papilomavírus que compreendem a administração de uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas da presente invenção a animais ou humanos que delas necessitem.

Como aqui definido, preferencialmente os animais são animais de estimação (cães, gatos) ou animais de interesse agropecuário, como bovinos, eqüinos, suínos, caprinos e ovinos.

#### EXEMPLOS

Para permitir uma melhor compreensão da presente invenção e demonstrar claramente os avanços técnicos obtidos são agora apresentados como exemplos os resultados dos diferentes ensaios efetuados com relação a esta invenção.

**Exemplo 1: Construção da seqüência de ácidos nucléicos que codifica para a proteína E7 do HPV-16 fusionada à proteína gD do HSV-1 com códons otimizados para a expressão em células de mamífero.**

Foi construída uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica para a proteína E7 do HPV-16 fusionada à gD do HSV-1 contendo códons otimizados para a expressão em células de mamífero, em particular células humanas.

Aproximadamente 50% das bases nitrogenadas da seqüência híbrida (gD e E7) foram modificadas sem alterar a seqüência da proteína codificada.

5 Nessa seqüência foram inseridos os sítios de clonagem das enzimas de restrição NotI (6 primeiras bases) e BglII (6 últimas bases) para possibilitar a clonagem da seqüência no plasmídeo pUMVC3, comercializado pela firma Aldevron, e licenciado para testes clínicos.

10 Além disso, nessa seqüência foram realizadas duas mutações pontuais para impedir a interação da proteína E7 de HPV-16 com a proteína celular Rb, evitando assim o potencial oncogênico de E7. Tais mutações consistiram na troca de uma cisteína por uma glicina na posição 24 de E7 e de um ácido glutâmico por uma glicina na posição 26 de E7.  
15 Esta seqüência está descrita na SEQ. ID. 1.

### **Exemplo 2: Construção e purificação dos vetores plasmidiais.**

Para a construção do vetor pIL-2 o gene da interleucina 2 (IL-2) murino foi amplificado por PCR e  
20 clonado no vetor pcDNA3.1 (Invitrogen). O vetor pgDE7 foi construído através da amplificação do gene da proteína E7 a partir do genoma total do HPV-16 utilizando iniciadores específicos desenhados com base na seqüência depositada no GeneBank (GI:9627100) e incluindo sítios para a enzima ApaI nos iniciadores de E7. O plasmídeo pRE4 que contém o gene  
25 da glicoproteína D do HSV-1, gentilmente cedido pelo Dr. G. Cohen da Universidade da Pensilvânia, foi utilizado para a clonagem do gene de E7 fusionado ao gene gD. Para a construção do vetor pVaxgDE7 o gene gDE7 foi retirado do  
30 vetor pgDE7 através de digestão com a enzima de restrição HindIII e clonado no vetor pVax1 (Invitrogen). A construção do plasmídeo pgDE7h (SEQ. ID. 2) foi realizada após clonagem do gene sintético gDE7h (SEQ. ID. 1), que contém a seqüência dos gene da E7 do HPV-16 fusionado ao gene da gD

de HSV-1 com a seqüência de códons otimizada para expressão em células de mamífero, em particular seres humanos, nos sítios de *NheI* e *EcoRV* do plasmídeo pUMVC3. As células eletrocompetentes utilizadas para a transformação com o

5 vetor pRE4 foram bactérias *Escherichia coli* JM 110. Os tratamentos com enzimas de restrição, ligação, eletroforese em gel de agarose, purificação dos fragmentos de DNA e eletroporação seguiram procedimentos de rotina laboratorial. Todos os plasmídeos foram propagados em

10 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  em meio LB suplementado com ampicilina (100 $\mu$ g/mL) ou canamicina (100 $\mu$ g/mL) e purificados por duplo gradiente de densidade de cloreto de céσιο seguido de precipitação com etanol e ressuspensão em água estéril. O conteúdo de DNA das amostras foi

15 determinado em espectrofotômetro a 260nm e confirmado por inspeção visual em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo usando fragmentos de DNA com concentrações conhecidas (Invitrogen). Os plasmídeos foram mantidos a -20°C até o momento de uso, quando a concentração será

20 ajustada para 1 $\mu$ g/ $\mu$ L em PBS.

A Tabela 1 resume os vários plasmídeos utilizados neste estudo:

**Tabela 1.**

<b>Plasmídeo</b>	<b>Plasmídeo de Origem</b>	<b>Gene (s) clonado (s)</b>
<b>pIL2</b>	pcDNA3.1	IL-2
<b>pgD</b>	pRE4	gD
<b>pgDE7</b>	pgD	gDE7 (carrega o gene de E7 do HPV-16 fusionado ao gene de gD de HSV-1)
<b>pVAXgDE7</b>	pVax	gDE7 (carrega o gene de E7 do HPV-16 fusionado ao gene de gD de HSV-1)
<b>pgDE7h</b>	pUMVC3	gDE7h (carrega o

<b>(SEQ. ID 2)</b>		gene sintético que codifica o gene E7 de HPV-16 fusionado ao gene de gD de HSV-1 e possui seqüência de códons otimizada para expressão em células de mamíferos
--------------------	--	--

### Exemplo 3: Composições imunogênicas

As composições imunogênicas da presente invenção foram preparadas utilizando os plasmídeos descritos na Tabela 1  
5 acima.

A Tabela 2 resume as composições preparadas:

**Tabela 2.**

	<b>Plasmídeo contendo o gene que codifica gD e E7</b>	<b>Plasmídeo contendo o gene que codifica IL-2</b>	<b>Excipiente</b>
<b>Composição 1</b>	pgDE7	pIL-2	Salina
<b>Composição 2</b>	pVAXgDE7	pIL-2	Salina
<b>Composição 3</b>	pgDE7h	pIL-2	Salina

Para cada composição prepararam-se 10 composições com  
10 quantidades crescentes de DNA. Para cada composição adicionou-se de 100µg, 50µg, 25µg ou 10µg de DNA diluído em 100µL de solução salina (PBS).

### Exemplo 4: Preparação das células tumorais

A linhagem celular tumoral TC-1 é derivada de células  
15 primárias do epitélio pulmonar de C57Bl/6 transformadas com v-Has-ras e com os genes de E6 e E7 de HPV-16 (gentilmente cedida pelo Dr. T.C. Wu, Universidade Johns Hopkins, EUA). As células TC-1 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 2mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 2 mM  
20 aminoácidos não essenciais, 10mM tampão HEPES, 50 U/mL

penicilina/streptomomicina, 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. No dia do desafio tumoral as células são tratadas com tripsina, lavadas duas vezes, e ressuspensas em meio sem soro em concentrações  
5 apropriadas para a inoculação.

**Exemplo 5: Imunização dos camundongos e desafio com as células tumorais**

Os experimentos de imunização foram realizados com camundongos fêmeas C57BL/6 com idade entre 6-8 semanas  
10 adquiridos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia da USP, manuseados segundo as normas estabelecidas pela comissão de ética do ICB-USP.

Os camundongos foram inoculados por via subcutânea com das células tumorais TC-1 preparadas conforme descrito no  
15 Exemplo 4 na concentração de  $5 \times 10^4$  células/animal. As células foram ressuspensas em 100 µL de meio sem soro e inoculadas em uma região dorso-lateral do animal. Para determinar o efeito das composições imunogênicas na regressão de tumores já estabelecidos, os camundongos foram  
20 desafiados com as células TC-1 e oito horas depois teve início o protocolo vacinal.

As composições imunogênicas descritas no Exemplo 3 foram administradas por via intramuscular. Grupos de 5-10 animais foram vacinados com as composições imunogênicas ou  
25 vacinas de DNA por via intramuscular. As doses de cada composição (10µg a 100 µg de DNA diluído em 100µL de PBS) foram inoculadas no músculo tibial anterior de cada pata (50µL por pata).

O acompanhamento da evolução dos tumores nos ensaios  
30 de regressão tumoral foi feito três vezes a cada semana por um período mínimo de 60 dias. Os tumores quando presentes foram medidos com o auxílio de um paquímetro e os animais que apresentaram tumores maiores que 1.5cm de diâmetro



foram sacrificados.

**a) Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células tumorais TC-1 imunizados com uma dose de cada um dos vetores pgD, pIL-2 e pgDE7 isoladamente ou uma, duas ou três doses da composição imunogênica 1 (pgDE7+pIL-2) (Efeito protetor).**

Os animais desafiados com células tumorais TC-1 foram imunizados com uma dose de cada um dos vetores pgD, pIL-2 e pgDE7 isoladamente, ou três doses do vetor pgDE7, ou uma, duas ou três doses da composição imunogênica 1 (pgDE7+pIL-2) administrada pela via intramuscular numa concentração por dose de 100 µg DNA/100µL/dose. Os protocolos vacinais tiveram início no mesmo dia do desafio com células tumorais TC-1. As composições que compreendem os vetores pgD e pIL-2 isoladamente não foram capazes de manter os camundongos livres de tumores. O vetor pgDE7 sozinho gerou 70% de proteção após três doses do mesmo e ausência de proteção significativa com uma ou duas doses. Entretanto a composição imunogênica 1 compreendendo os vetores pgDE7 e pIL-2 foi capaz de proteger 100% dos camundongos do desenvolvimento de tumor com a inoculação de uma, duas ou três doses da composição revelando que a combinação de ambos os vetores em uma única formulação imunogênica apresenta uma efeito sinérgico inesperado (Figura 2).

**b) Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células tumorais TC-1 e imunizados com uma dose de 100µg do vetor pIL-2 ou uma dose da composição imunogênica 1 (pgDE7+pIL-2) administrada nas concentrações de 100µg, 50µg, 25µg ou 10µg DNA/100 µL/dose (Efeito protetor).**

Os animais desafiados com células tumorais TC-1 foram imunizados com uma dose de 100µg do vetor pIL-2 ou uma dose da composição farmacêutica 1 (pgDE7 e pIL-2)

administradas na quantidade de 100µg, 50µg, 25µg ou 10µg DNA/100µL/dose. Os regimes vacinais tiveram início no mesmo dia do desafio com células tumorais TC-1. A composição farmacêutica imunogênica compreendendo os vetores pgDE7 e pIL-2 foi capaz de proteger 100% dos camundongos do desenvolvimento de tumor em dose única com a inoculação de 100µg, 50µg e 25µg DNA/100µL/dose. A inoculação de 10µg de DNA/100µL/dose protegeu 50% dos camundongos do desenvolvimento de tumores e o vetor pIL-2 isoladamente não foi capaz de manter os camundongos livres tumores (Figura 3).

**c) Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células tumorais TC-1 e imunizados com uma dose de 100µg do vetor pIL-2 ou uma dose da composição imunogênica 1 (pgDE7+pIL-2) administrada na concentração de 50µg DNA/100µL/dose administrada no mesmo dia (dia 0) ou 3, 7, 10 ou 14 dias após o desafio (Efeito protetor).**

Os animais desafiados com células tumorais TC-1 foram imunizados com uma dose de 100µg do vetor pIL-2 ou uma dose da composição imunogênica 1 (pgDE7+pIL-2) administrada na concentração de 50µg DNA/100 µL/dose administrada no mesmo dia (dia 0) ou 3, 7, 10 ou 14 dias após o desafio. A composição imunogênica compreendendo os vetores pgDE7 e pIL-2 foi capaz de proteger 100% dos camundongos em dose única com a inoculação de 50µg de DNA/dose quando a vacina foi administrada no mesmo dia ou até 3 dias após o desafio. Quando a composição farmacêutica foi inoculada nos dias 7, 10 e 14, os valores de proteção obtidos foram de reduzidos para 60%, 40% e 0% dos camundongos tratados, respectivamente. O vetor pIL-2 isoladamente não foi capaz de conferir qualquer proteção anti-tumoral aos camundongos (Figura 4).

**d) Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células tumorais TC-1 e imunizados com uma**

dose de cada um dos vetores pIL-2 e pDE7 isoladamente ou com uma dose da composição imunogênica 1 (pDE7+pIL-2) na concentração de 50µg de DNA/100 µL/dose administradas 3 dias após o desafio (Variação do tamanho do tumor). Os animais desafiados com células tumorais TC-1 foram imunizados com uma dose de cada um dos vetores pIL-2 e pDE7 isoladamente ou com uma dose da composição imunogênica 1 (pgDE7+pIL-2) na concentração de 50µg de DNA/100 µL/dose administradas 3 dias após o desafio. A composição imunogênica compreendendo os vetores pgDE7 e pIL-2 protegeu todos os camundongos e não se observa o desenvolvimento de tumores. O vetor pIL-2 isoladamente não foi capaz de manter os camundongos livres tumores. Neste caso os tumores atingiram tamanhos superiores a 1 cm de diâmetro 32 dias após o desafio. Animais não imunizados atingiram tumores com o mesmo tamanho aproximadamente após 36 dias. Enquanto que camundongos imunizados com uma única dose do vetor pgDE7 desenvolverem tumores com tamanho médio de 0,35 cm ao final do período de observação do experimento (42 dias). Esses resultados demonstram de forma clara um efeito sinérgico inesperado nos animais imunizados com a composições imunogênica compreendendo os vetores pIL2 e pgDE7 (Figura 5).

**Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células tumorais TC-1 e imunizados com uma dose de cada um dos vetores pIL-2 e pVaxgDE7 isoladamente ou com uma dose da composição imunogênica 2 (pVaxgDE7+pIL-2) na concentração de 50µg de DNA/100 µL/dose administradas 3 dias após o desafio (Efeito protetor).** Os animais desafiados com células tumorais TC-1 foram imunizados com uma dose de cada um dos vetores pIL-2 e pVaxgDE7 isoladamente ou com uma dose da composição imunogênica 2 (pVaxgDE7+pIL-2) na concentração de 50µg de DNA/100 µL/dose administradas 3 dias após o desafio. A composição

imunogênica compreendendo os vetores pVaxgDE7 e pIL-2 foi capaz de proteger 100% dos camundongos do desenvolvimento de tumor em dose única. Nas mesmas condições os vetores pIL-2 e pVaxgDE7 isoladamente não foram capazes de manter os camundongos livres tumores. Esses resultados demonstram que os vetores pgDE7 e pVaxgDE7 possuem eficácias anti-tumorais semelhantes. Este resultado mostra que o vetor pVaxgDE7 apresenta o mesmo efeito anti-tumoral do vetor pgDE7 quando combinado com o vetor pIL-2 (Figura 6).

5  
10 **e) Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células tumorais TC-1 e imunizados com uma dose de cada um dos vetores pIL-2 e pgDE7 ou pgDE7h isoladamente na concentração de 50µg de DNA/100 µL/dose administradas 3 dias após o desafio (Efeito protetor).** Os animais desafiados com células tumorais TC-1 foram imunizados com uma dose de cada um dos vetores pIL-2, pgDE7 ou pgDE7h isoladamente na concentração de 50µg de DNA/100 µL/dose administradas 3 dias após o desafio. O plasmídeo pgDE7h, que compreende a seqüência artificial dos genes de E7 do HPV-16 e de gD do HSV-1 otimizada para melhor expressão em células humanas, protegeu 100% dos camundongos contra o desenvolvimento de tumores em dose única enquanto que, nas mesmas condições experimentais, o plasmídeo pgDE7 e o vetor pIL-2 isoladamente não foram capazes de manter os camundongos livres tumores. Estes resultados demonstram que o vetor pgDE7h possui efeito anti-tumoral superior ao obtido com os vetores pgDE7 e pVAXgDE7. Os resultados indicam que o vetor pgDE7h apresenta efeito anti-tumoral aumentado em relação ao vetor pgDE7 mesmo quando administrado sem o vetor pIL-2 (Figura 7).

25  
30 **f) Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células tumorais TC-1 e imunizados com uma dose de cada um dos vetores pIL-2 e pgDE7h isoladamente ou com a composição imunogênica 3 (pgDE7h+pIL-2) (Efeito**

**protetor**). Os animais desafiados com células tumorais TC-1 foram imunizados com uma dose de cada um dos vetores pIL-2 e pgDE7 isoladamente ou uma dose da composição imunogênica 3 (pgDE7h+pIL-2) em diversas concentrações de DNA /dose administradas 3 dias após o desafio. A Figura 8 mostra a quantidade mínima do vetor pgDE7h necessária à eficácia terapêutica anti-tumoral máxima da composição imunogênica 3 (pgDE7h+pIL-2). Os animais foram imunizados com uma dose de 50µg DNA/100 µL/dose do vetor pIL-2, ou do vetor pgDE7h, ou da composição imunogênica 3 (pgDE7h+pIL-2) e com uma dose de 25µg DNA/100 µL/dose do vetor pgDE7h ou da composição imunogênica 3 (pgDE7h+pIL-2) (Fig. 8A), ou uma dose de 10µg DNA/100 µL/dose do vetor pgDE7h ou da composição imunogênica 3 (pgDE7h+pIL-2) ou uma dose de 5µg DNA/100 µL/dose do vetor pgDE7h ou da composição imunogênica 3 (pgDE7h+pIL-2) (Fig. 8B). Quando administrado isoladamente, o vetor pgDE7h foi capaz de proteger todos os animais inoculados com as células tumorais apenas na concentração de 50µg DNA/100µL/dose. Na concentração de 25µg DNA/100µL/dose apenas 40% dos camundongos tratados com 25µg do vetor ficaram livres de tumores. A administração de 10µg ou 5µg DNA/100µL/dose do plasmídeo pgDE7h não foi capaz de manter camundongos livres de tumor. Por outro lado, a composição imunogênica 3 (pgDE7h+pIL-2) foi capaz de proteger todos os camundongos do desenvolvimento de tumores quando administrada nas mesmas concentrações de (50µg, 25µg e 10µg de DNA/100µL/dose) Quando administrada na concentração de 5µg DNA/100µL/dose, composição imunogênica 3 (pgDE7h+pIL-2) foi capaz de proteger 80% dos animais contra o desenvolvimento de tumores. O vetor pIL-2 isoladamente não foi capaz de manter os camundongos livres tumores nas diferentes concentrações testadas. Estes resultados confirmam os efeitos sinérgicos inesperados advindos da combinação dos vetores pIL-2 e pgDE7h em uma

composição imunogênica com propriedades anti-tumorais superiores às composições imunogênicas 1 e 2.

Os resultados apresentados nos Exemplos acima demonstram que a composições imunogênicas 1 (pgDE7 + IL-2),  
5 2 (pVAXgDE7 + pIL-2) e 3 (pgDE7h + pIL-2) proveram os camundongos com proteção terapêutica total a desafios feitos com as células TC-1 em regime de 1,2 ou 3 doses administrada pela via intramuscular em quantidades que variaram entre 25µg a 100µg de DNA/100µL/dose.

10 Vale salientar que a combinação dos vetores que codificam para a proteína E7 com o vetor que codifica IL-2 apresentou efeito sinérgico inesperado uma vez que a administração separada de cada vetor não foi capaz de promover o efeito protetor e, no caso do vetor que codifica  
15 para a citocina, apresenta efeito inverso (Figura 5). É também importante notar que a composição imunogênica 3, que compreende o vetor pgDE7h descrito na presente invenção, que compreende uma seqüência genética modificada para expressão otimizada do E7 em células de mamífero, aumentou  
20 de forma pronunciada os efeitos terapêuticos desta composição com relação às composições 1 e 2 que compreendem vetores que codificam a seqüência natural de E7. Além disto, a combinação do vetor que codifica para a IL-2 com o vetor pgDE7h promoveu efeito sinérgico evidente e aumentou  
25 ainda mais o efeito terapêutico anti-tumoral do vetor humanizado. As composições propostas, assim como outras formulações que compreendam simultaneamente plasmídeos que expressam a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de HSV e plasmídeos que codifiquem citocinas, representa uma  
30 estratégia terapêutica anti-tumoral única.

**REIVINDICAÇÕES**

1. Seqüência de ácido nucléico isolada que codifica a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de HSV **caracterizada por** compreender códons otimizados para a expressão em células de mamífero.  
5
2. Seqüência de ácido nucléico isolada de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada por** possuir códons otimizados para a expressão em células humanas.
3. Seqüência de ácido nucléico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2 **caracterizada por** ser mutada de forma impedir a interação da proteína E7 de HPV com a proteína celular Rb.  
10
4. Seqüência de ácido nucléico isolada de acordo com a a reivindicação 3 **caracterizada pelo** fato de que os amino ácidos das posições 24 e 26 de E7 são mutados.  
15
5. Seqüência de ácido nucléico isolada de acordo com a reivindicação 4 **caracterizada pelo** fato de que a cisteína da posição 24 de E7 é mutada por uma glicina.
6. Seqüência de ácido nucléico isolada de acordo com a reivindicação 4 **caracterizada pelo** fato de que o ácido glutâmico da posição 26 de E7 é mutado por uma glicina.  
20
7. Seqüência de ácido nucléico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 **caracterizada pelo** fato de o HPV ser HPV-16.
8. Seqüência de ácido nucléico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 **caracterizada pelo** fato de o HPV ser HPV-18.  
25
9. Seqüência de ácido nucléico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 **caracterizada pelo** fato de o HPV ser HPV-31.  
30
10. Seqüência de ácido nucléico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 **caracterizada pelo** fato de o HPV ser HPV-33.
11. Seqüência de ácido nucléico isolada de acordo com

qualquer uma das reivindicações 1 a 6 **caracterizada pelo** fato de o HPV ser HPV-35.

12. Seqüência de ácido nucléico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11 **caracterizada pelo** fato de o HSV ser HSV-1.

13. Seqüência de ácido nucléico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11 **caracterizada pelo** fato de o HSV ser HSV-2.

14. Seqüência de ácido nucléico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13 **caracterizada pelo** fato de ser a SEQ ID. No.1.

15. Vetor de expressão **caracterizado por** codificar qualquer uma das seqüências de ácido nucléico isoladas conforme definidas nas reivindicações 1 a 14.

16. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 15 **caracterizado por** ser a SEQ ID no. 2.

17. Composição imunogênica sinérgica **caracterizada pelo** fato de compreender um vetor de expressão que codifica a proteína E7 de HPV fusionada à proteína gD de HSV, um vetor de expressão que codifica uma citocina e um veículo farmacologicamente aceitável.

18. Composição imunogênica sinérgica de acordo com a reivindicação 17 **caracterizada pelo** fato de o HPV ser HPV-16.

19. Composição imunogênica sinérgica de acordo com a reivindicação 17 **caracterizada pelo** fato de o HPV ser HPV-18.

20. Composição imunogênica sinérgica de acordo com a reivindicação 17 **caracterizada pelo** fato de o HPV ser HPV-

31.

21. Composição imunogênica sinérgica de acordo com a reivindicação 17 **caracterizada pelo** fato de o HPV ser HPV-33.

22. Composição imunogênica sinérgica de acordo com a



reivindicação 17 **caracterizada pelo** fato de o HPV ser HPV-45.

23. Composição imunogênica sinérgica de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 22 **caracterizada pelo** fato de o HSV ser HSV-1.

24. Composição imunogênica sinérgica de acordo com a qualquer uma das reivindicações 17 a 22 **caracterizada pelo** fato de o HSV ser HSV-2.

25. Composição imunogênica sinérgica de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 24 **caraterizada pelo** fato de que vetor de expressão que codifica a proteína E7 do HPV fusionada à proteína gD de HSV codifica uma seqüência de ácido nucléico isolada conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 14.

26. Composição imunogênica sinérgica de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 24 **caraterizada pelo** fato de que vetor de expressão que codifica a proteína E7 do HPV fusionada à proteína gD de HSV é um vetor conforme definido em qualquer uma das reivindicações 14 ou 15.

27. Composição imunogênica sinérgica de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 26 **caracterizada pelo** fato da citocina ser IL-2.

28. Composição imunogênica sinérgica de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 26 **caracterizada pelo** fato da citocina ser IL-12.

29. Composição imunogênica sinérgica de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 26 **caracterizada pelo** fato da citocina ser GM-CSF.

30. Composição imunogênica sinérgica de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 29 **caracterizada pelo** fato de que o veículo farmacologicamente aceitável é salina.

31. Composição imunogênica sinérgica de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 30 **caracterizada pelo** fato de que compreende adicionalmente sistemas de liberação

sustentada ou controlada, como lipossomos, emulsões lipídicas e/ou micropartículas de PLGA.

32. Composição imunogênica sinérgica de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 31 **caracterizada por**  
5 ser para uso em animais.

33. Composição imunogênica sinérgica de acordo com a reivindicação 32 **caracterizada por** ser para uso em humanos.

34. Composição imunogênica sinérgica de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 33 caracterizada por  
10 ser para administração pelas vias oral, retal, sublingual, tópica, nasal, transdermal, parenteral, subcutânea, intradérmica, mucosa ou intramuscular, intradérmica, mucosa ou intramuscular intravenosa, epidural, irrigação, intramuscular, por bombas de liberação, ou de infusão.

15 35. Composição imunogênica sinérgica de acordo com A reivindicação 34 caracterizada por ser para administração intramuscular.

36. Uso de uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas, conforme definidas em qualquer uma das  
20 reivindicações 17 a 35, **caracterizado pelo** fato de ser na manufatura de uma vacina para prevenção de tumores induzidos por papilomavírus em animais ou humanos.

37. Uso de uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas, conforme definidas em qualquer uma das  
25 reivindicações 17 a 35, **caracterizado pelo** fato de ser na manufatura de uma vacina para controle de tumores induzidos por papilomavírus em animais ou humanos.

38. Vacina **caracterizada por** compreender uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas conforme definidas em  
30 qualquer uma das reivindicações 17 a 35.

39. Método de prevenção de tumores induzidos por papilomavírus caracterizado por compreender administrar uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 17 a 35 a

animais ou humanos que delas necessitem.

40. Método de tratamento de tumores induzidos por papilomavírus caracterizado por compreender administrar uma ou mais composições imunogênicas sinérgicas conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 17 a 35 a animais ou humanos que delas necessitem.

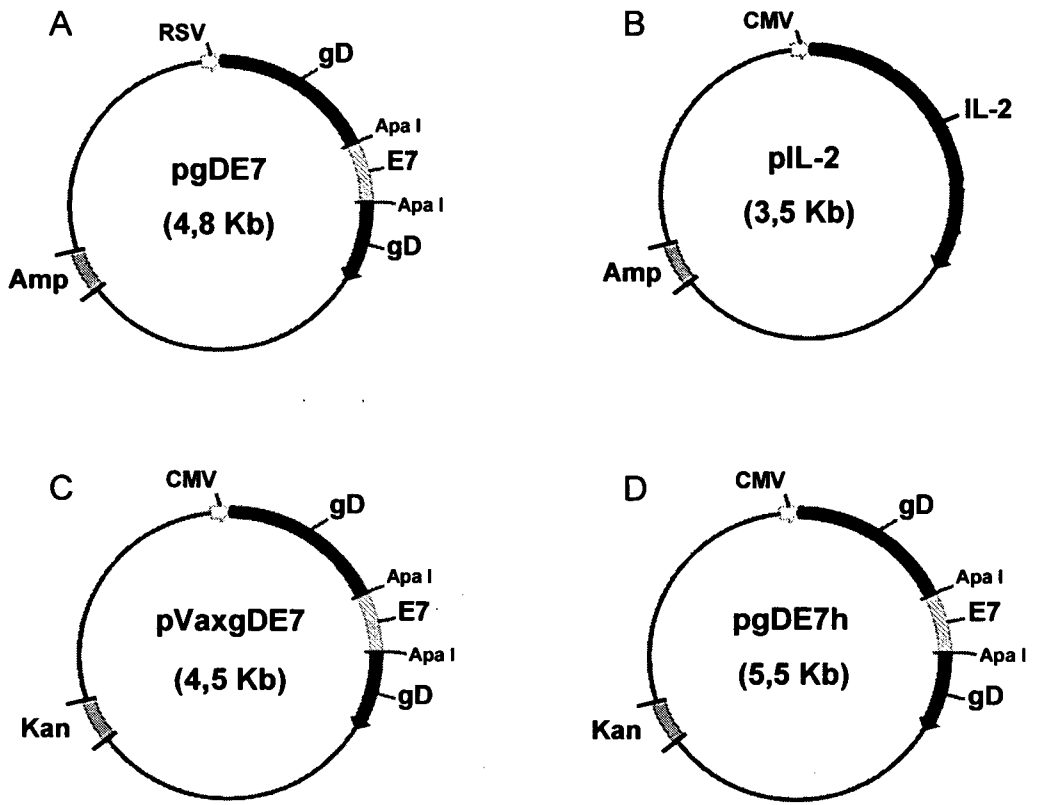


FIGURA 1

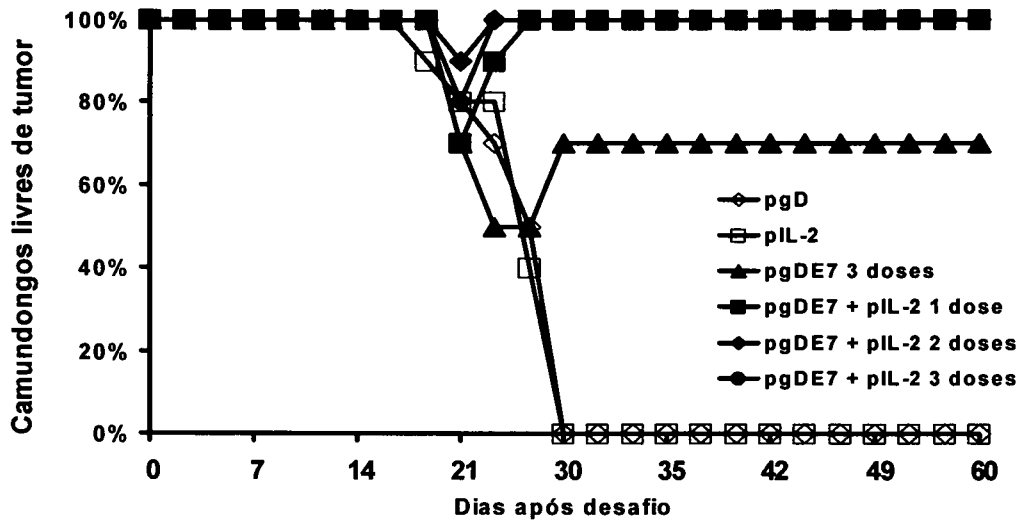


FIGURA 2

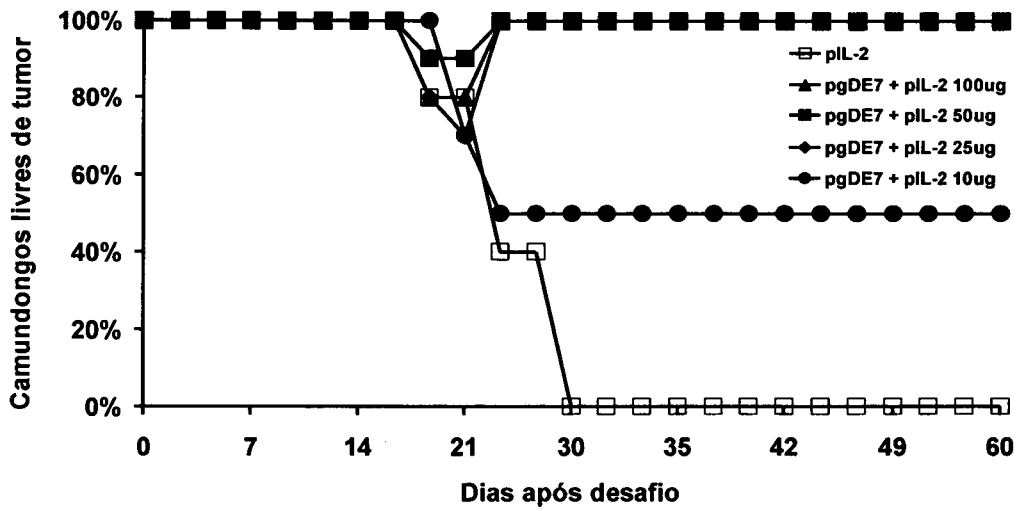


FIGURA 3

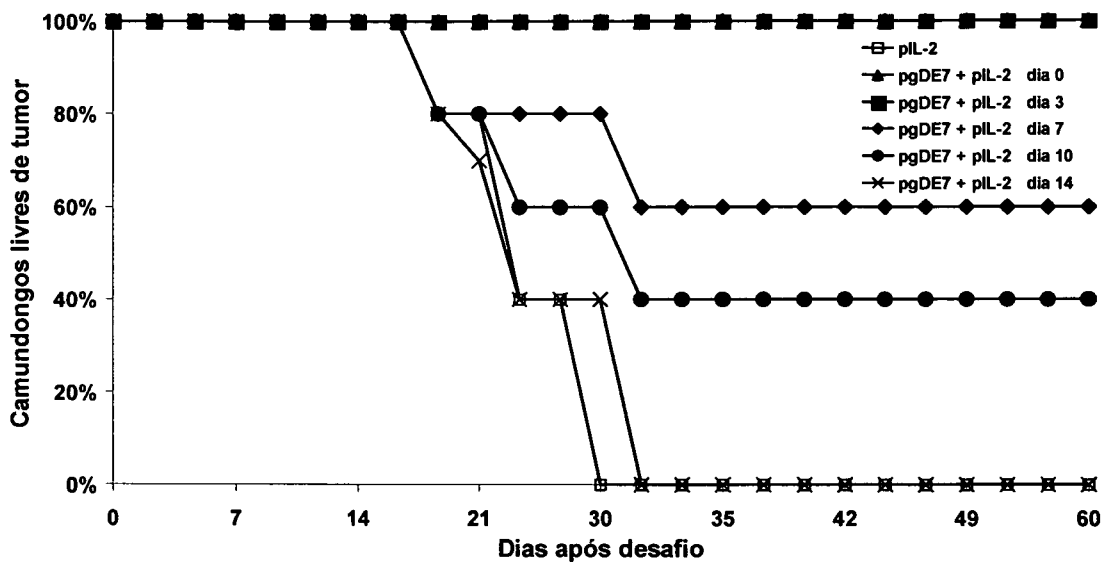


FIGURA 4

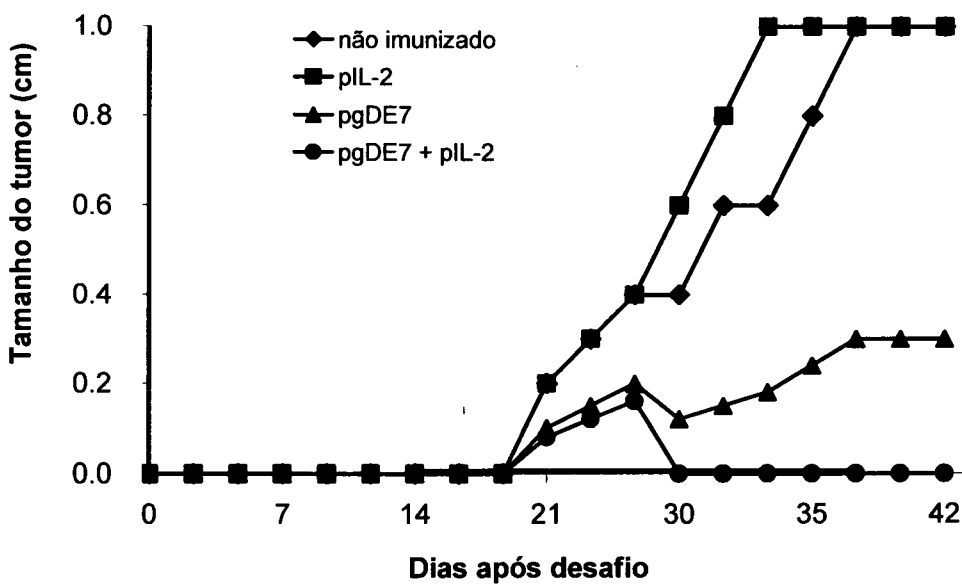


FIGURA 5

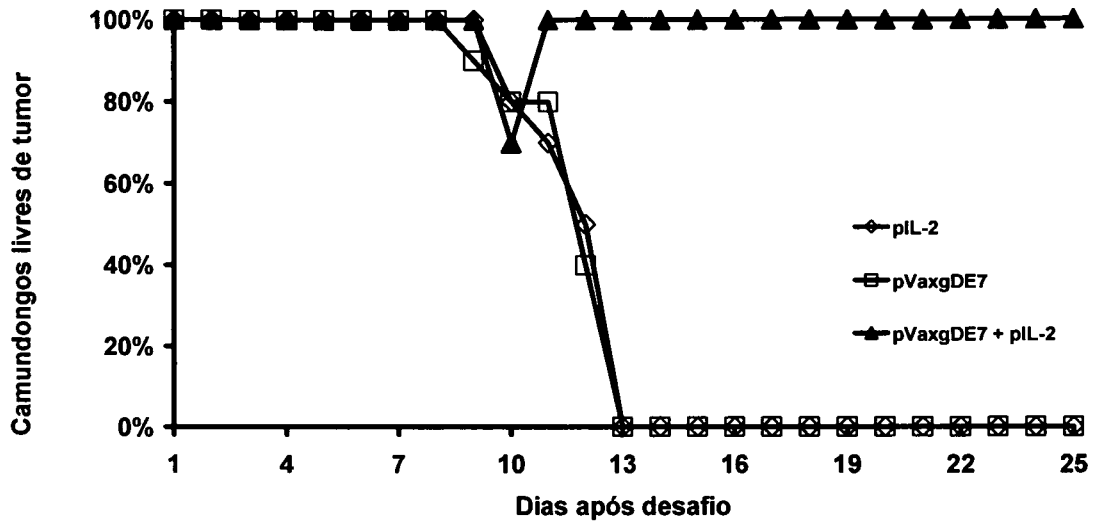


FIGURA 6

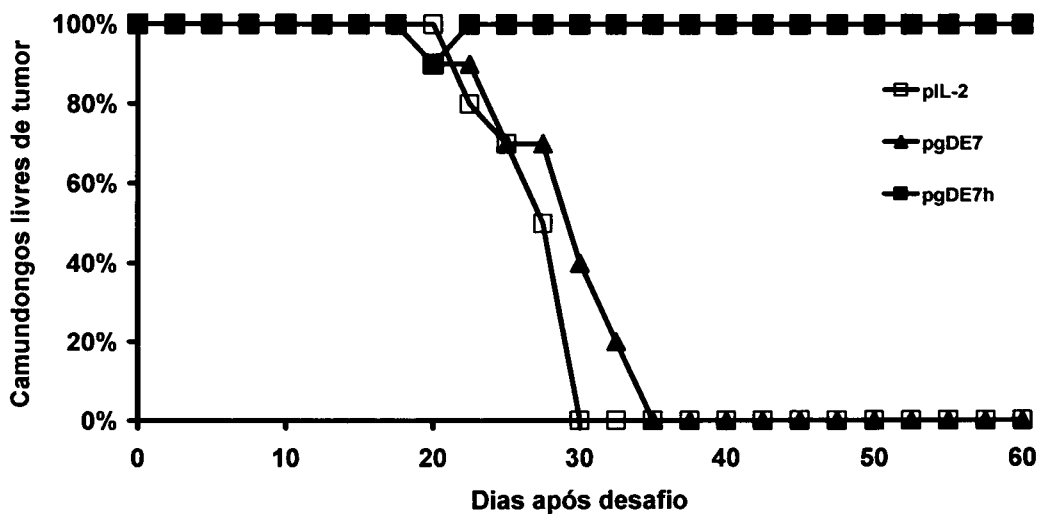


FIGURA 7

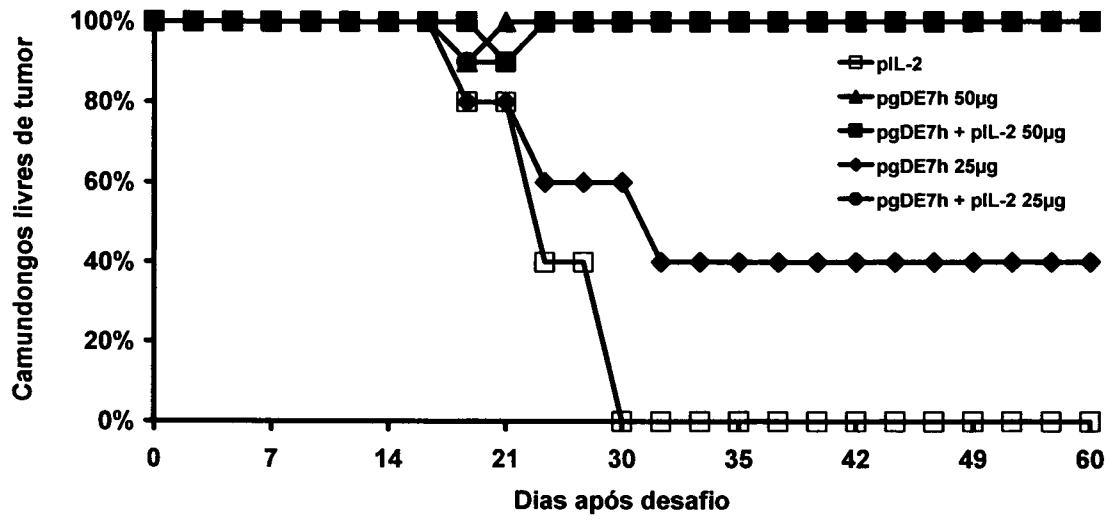


FIGURA 8A

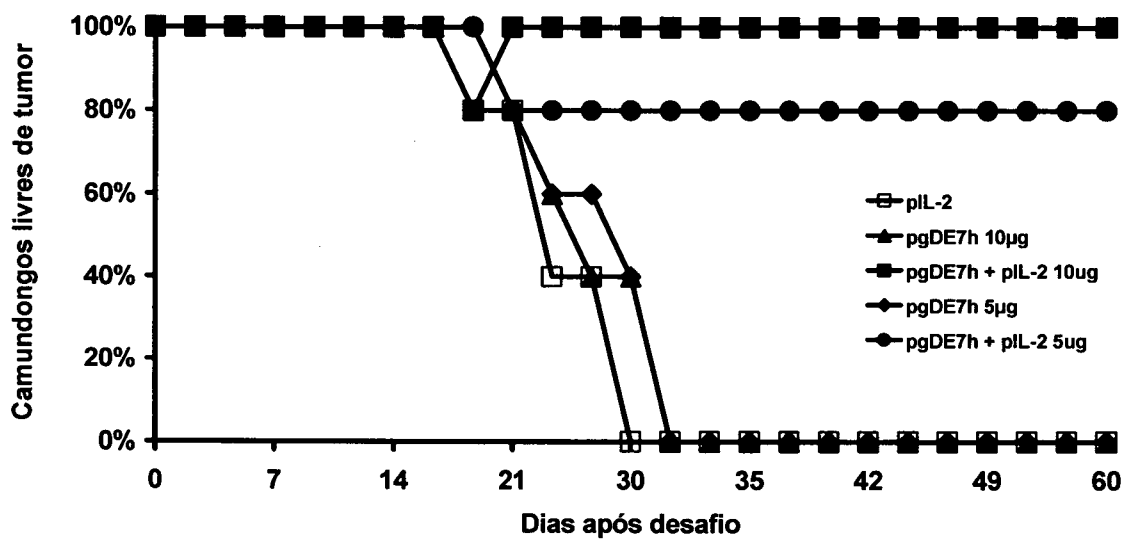


FIGURA 8B



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2010/000290

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC (2010.01) C12N15/34 C12N15/37 C12N15/38 A61K31/711 A61K39/295 A61K39/245 A61K39/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, MEDLINE, WPI DATA

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2004028693 A1 12 Feb. 2004 (2004-02-12) <b>abstract and paragraphs 76.85 e 170</b>	1-13, 15, 17-38
Y	WO 0151516 A2 ( ZENTGRAF HANSWALTER [DE]) 19 July 2001 (2001-07-19) <b>abstract 10, line 16 to pág. 11, line 10 &amp; page 4, tab. 2.</b>	1-13, 15, 17-38
Y	WO 2008027394 A2 ( LASARO MARCIO O [US]) 06 março 2008 (2008-03-06) <b>abstract, par 38, 46, 53, 60, 61 &amp; 70, page 29, tab. 1, line 4.</b>	1-13, 15, 17-38
Y	Schenck, S. et al.: "Expression of human papilloma virus type 16 antigens, specific targeting as well as formation of virus-like particles by HSV-1 amplicon vectors." Virus Genes. Outubro de 2008, Vol. 37, Nº2, page 131-143. ISSN:1572-994X. <b>abstract, page 132, 1º paragraph &amp; page 133, column 2, page 137, column 2, line 2 to 4.</b>	1-13, 15, 17-38

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 November 2010

Date of mailing of the international search report

7 December 2010

Name and mailing address of the ISA/

INSTITUTO NACIONAL DA  
PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
Rua Marink Veiga n° 9, 18° andar  
cep: 20090-050, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Facsimile No.

Authorized officer

Julia Cordeiro Fontanella

Telephone No.

+55 21 2139-3686/3742

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2010/000290

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>Lasaro, M.O. et al.: "Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fuse with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1." <i>Microbes and infection</i>, Dec. 2005, Vol. 7, N° 15, pages 1541-1550. ISSN:1769-714X.</p> <p><b>cited in the application</b>  <b>abstract, fig. 4 &amp; 6, discussion, page 1548, column 2, 2nd paragraph</b></p> <p>-----</p>	1-13, 15, 17-38
Y	<p>Hinuma, S. et al.: "A novel strategy for converting recombinant viral protein into high immunogenic antigen." <i>FEBS Letters</i>, Agosto de 1991, Vol. 288, N°1-2, pages 138-142. ISSN:1873-3468.</p> <p><b>abstract, fig. 1 &amp; 3, and page 14, last paragraph</b></p> <p>-----</p>	17-38

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2010/000290

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: **39 and 40**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

**Therapeutic or prophylactic method**

2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**Invention I (claims 1-16, 25 and 26, and 27-38 (in part)) - Subject matter related to sequences that encode fusion proteins with codons optimized for expression in mammals, compositions containing same, use of these compositions and vaccines containing these compositions**

**Invention II (claims 17 to 24, and 27 to 38 (in part)) - Compositions containing vectors that encode fusion proteins that are not optimized for expression in mammals, use of these compositions and vaccines containing these compositions**

Since the compositions claimed in claims 17 to 24 and 27 to 35 (in part) can be obtained with nucleic acids or vectors that differ from those claimed in claims 1 to 16, these claims are not linked by a single inventive concept (PCT Rule 13.1). Consequently, the use of said compositions and vaccines containing these compositions (claims 36 to 38, in part) also do not share a single inventive concept with the sequences and vectors claimed in claims 1 to 16.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International application No.


PCT/BR2010/000290

US 2004028693 A1	2004-02-12	AU 9052001 A	2002-02-13
		US 7318928 B2	2008-01-15
		US 2008286292 A1	2008-11-20
		WO 0209645 A2	2002-02-07
-----	-----	-----	-----
WO 0151516 A2	2001-07-19	AU 4042401 A	2001-07-24
		DE 10001230 A1	2001-08-02
		WO 0151516 A3	2001-12-27
-----	-----	-----	-----
WO 2008027394 A2	2008-03-06	US 2009246220 A1	2009-10-01
		WO 2008027394 A3	2008-07-10
-----	-----	-----	-----

## RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional N°

PCT/BR2010/000290

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO		
IPC (2010.01) C12N15/34 C12N15/37 C12N15/38 A61K31/711 A61K39/295 A61K39/245 A61K39/12		
De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC		
B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA		
Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)		
C12N, A61K		
Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados		
Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)		
EPODOC, MEDLINE, WPI DATA		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações N°
Y	US 2004028693 A1 12 fevereiro 2004 (2004-02-12) vide resumo e parágrafos 76,85 e 170	1-13, 15, 17-38
Y	WO 0151516 A2 ( ZENTGRAF HANSWALTER [DE]) 19 julho 2001 (2001-07-19) vide pág. 10, linha 16 a pág. 11, linha 10 e pág. 14, tabela 2.	1-13, 15, 17-38
Y	WO 2008027394 A2 ( LASARO MARCIO O [US]) 06 março 2008 (2008-03-06) vide resumo, parág. 38, 46, 53, 60, 61 e 70, pág. 29, tabela 1, linha 4	1-13, 15, 17-38
Y	Schenck, S. et al.: "Expression of human papilloma virus type 16 antigens, specific targeting as well as formation of virus-like particles by HSV-1 amplicon vectors." Virus Genes. Outubro de 2008, Vol. 37, N°2, páginas 131-143. ISSN:1572-994X. vide resumo, página 132, 1° parágrafo e página 133, coluna 2, página 137, coluna 2, linhas 2 a 4.	1-13, 15, 17-38
<input checked="" type="checkbox"/> Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C <input checked="" type="checkbox"/> Ver o anexo de famílias das patentes		
* Categorias especiais dos documentos citados: "A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância. "E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional "L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial "O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios. "P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada. "T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não confira como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção. "X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente. "Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto. "&" documento membro da mesma família de patentes.		
Data da conclusão da pesquisa internacional		Data do envio do relatório de pesquisa internacional:
16 novembro 2010		07/12/2010
Nome e endereço postal da ISA/BR		Funcionário autorizado
 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Rua Marink Veiga nº 9, 18º andar cep: 20090-050, Centro - Rio de Janeiro/RJ		Julia Cordeiro Fontanella
N° de fax: +55 21 2139-3663		N° de telefone: +55 21 2139-3686/3742

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
Y	<p>Lasaro, M.O. et al.: "Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fuse with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1." <i>Microbes and infection</i>, Dezembro de 2005, Vol. 7, Nº15, páginas 1541-1550. ISSN:1769-714X.</p> <p>citado pelo pedido vide resumo, fig 4 e 6, Discussão, página 1548, coluna 2, segundo parágrafo.</p>	1-13, 15, 17-38
Y	<p>Hinuma, S. et al.: "A novel strategy for converting recombinant viral protein into high immunogenic antigen." <i>FEBS Letters</i>, Agosto de 1991, Vol. 288, Nº1-2, páginas 138-142. ISSN:1873-3468.</p> <p>vide resumo, figura 1 e 3, e página 14, último parágrafo.</p>	17-38

**Quadro II Observações quando certas reivindicações não puderam ser objeto de pesquisa (Continuação do ponto 2 da primeira página)**

Este relatório de pesquisa internacional não foi formulado em relação a certas reivindicações, sob Artigo 17.2.a), pelas seguintes razões:

1.  Reivindicações: **39 e 40**

porque estas se referem a matéria na qual esta Autoridade não está obrigada a realizar a pesquisa, a saber:

Método terapêutico ou profilático

2.  Reivindicações:

porque estas se referem a partes do pedido internacional que não estão de acordo com os requisitos estabelecidos, de tal forma que não foi possível realizar uma pesquisa significativa, especificamente:

3.  Reivindicações:

porque estas são reivindicações dependentes e não estão redigidas de acordo com os parágrafos segundo e terceiro da Regra 6.4.a).

**Quadro III Observações por falta de unidade de invenção (Continuação do ponto da primeira página)**

Esta Autoridade de pesquisa internacional encontrou múltiplas invenções neste depósito internacional, a saber:

Invenção I (reivindicações 1-16; 25 e 26; e 27-38(parcialmente)) - Matéria relacionada a sequências que codificam a proteína de fusão com códons otimizadas para a expressão em mamíferos; composições contendo as mesmas; uso destas composições e vacinas contendo tais composições

Invenção II (reivindicações 17 a 24, e 27 a 38 (parcialmente) ) – Composições contendo vetores que codificam proteínas de fusão não otimizadas para a expressão em mamíferos; uso destas composições e vacinas contendo tais composições

Uma vez que as composições pleiteadas pelas reivindicações 17 a 24, e 27 a 35 (parcialmente) podem ser obtidas com ácidos nucleicos ou vetores diferentes dos pleiteados pelas reivindicações 1 a 16, tais reivindicações não possuem um conceito inventivo único (regra 13.1 do PCT).Consequentemente, o uso das ditas composições e vacinas contendo tais composições, (reivindicações 36 a 38, parcialmente) também não compartilham de um mesmo conceito inventivo com as sequências e vetores pleiteados nas reivindicações 1 a 16.

1.  como todas as taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa cobre todas as reivindicações pesquisáveis.
2.  como a pesquisa em todas as reivindicações pesquisáveis pode ser feita sem esforço que justifique pagamento adicional, esta Autoridade não solicitou o pagamento de taxas adicionais.
3.  como somente algumas das taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório internacional de pesquisa cobre somente aquelas reivindicações cujas taxas foram pagas, especificamente as reivindicações:
4.  as taxas de pesquisas adicionais requeridas não foram pagas dentro do prazo pelo depositante. Consequentemente, este relatório de pesquisa internacional se limita à invenção mencionada primeiramente nas reivindicações, na qual é coberta pelas reivindicações:

**Observações da reclamação**

- as taxas adicionais para pesquisas foram acompanhadas pela reclamação do depositante e, se for o caso, pelo pagamento da taxa de reclamação.
- as taxas adicionais para pesquisa foram acompanhadas pela reclamação do depositante mas a taxa de reclamação não foi paga dentro do prazo especificado pela solicitação.
- o pagamento de pesquisas adicionais não acompanha nenhuma reclamação.

**RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL**

Informação relativa a membros da família de patentes

Depósito internacional Nº

PCT/BR2010/000290

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
US 2004028693 A1	2004-02-12	AU 9052001 A	2002-02-13
		US 7318928 B2	2008-01-15
		US 2008286292 A1	2008-11-20
		WO 0209645 A2	2002-02-07
-----	-----	-----	-----
WO 0151516 A2	2001-07-19	AU 4042401 A	2001-07-24
		DE 10001230 A1	2001-08-02
		WO 0151516 A3	2001-12-27
-----	-----	-----	-----
WO 2008027394 A2	2008-03-06	US 2009246220 A1	2009-10-01
		WO 2008027394 A3	2008-07-10
-----	-----	-----	-----