



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

(11) BR 112013011705-2 B1



(22) Data do Depósito: 14/11/2011

(45) Data de Concessão: 05/04/2022

(54) Título: ANTÍGENOS DE PRÓSTATA DE CONSENSO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICA OS MESMOS E VACINA E USOS COMPREENDENDO OS MESMOS

(51) Int.Cl.: C07H 21/00; C07K 14/00.

(30) Prioridade Unionista: 12/11/2010 US 61/413,176; 29/11/2010 US 61/417,817.

(73) Titular(es): THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA; INOVIO PHARMACEUTICALS, INC..

(72) Inventor(es): WEINER, DAVID B; YAN JIAN; SARDESAI, NIRANJAN Y; FERRARO, BERNADETTE; RAMANATHAN, MATHURA P.

(86) Pedido PCT: PCT US2011060592 de 14/11/2011

(87) Publicação PCT: WO 2012/065164 de 18/05/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 10/05/2013

(57) Resumo: ANTÍGENOS DE PRÓSTATA DE CONSENSO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICA OS MESMOS E VACINA E USOS COMPREENDENDO OS MESMOS Este documento prover as sequências de ácidos nucléicos que codificam proteínas de próstata de consenso que são capazes de melhorar a tolerância em uma espécie alvo, incluindo antígenos PSA, PSMA, STEAP e PSCA, tanto quanto construtores/vetores genéticos e vacinas expressando as sequências. Também são providos neste documento métodos para gerar uma resposta de autoimunidade contra células de câncer de próstata por administração de uma ou mais das vacinas, proteínas e/ou sequências de ácido nucléico que são providas

**ANTÍGENOS DE PRÓSTATA DE CONSENSO, MOLÉCULA DE ÁCIDO
NUCLEICO QUE CODIFICA OS MESMOS E VACINA E USOS
COMPREENDENDO OS MESMOS
CAMPO DA INVENÇÃO**

5 A presente invenção se refere a sequências de ácidos nucleicos que codificam proteínas de próstata de consenso e fragmentos das mesmas; vacinas contra câncer de próstata melhoradas, métodos melhorados para indução de respostas imunes contra células de câncer de próstata, métodos melhorados para imunizar profilaticamente e/ou terapêuticamente indivíduos contra câncer de próstata.

10 **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

O câncer de próstata é um importante alvo imune terapêutico. O desenvolvimento de uma abordagem terapêutica imune é complexo, na medida em que precisam ser desenvolvidos imunógenos que são capazes de induzir fortes respostas imunes, preferencialmente, incluindo respostas de CTL.

15 A administração direta de sequências de ácidos nucleicos para vacinar contra doenças em humanos e em animais tem sido estudada e muito esforço foi feito em meios eficazes e eficientes para a distribuição de ácidos nucleicos, a fim de obter a expressão necessária dos antígenos desejados, resultando em resposta imunogênica e, finalmente, no sucesso desta técnica.

20 Vacinas de DNA têm muitas vantagens conceituais sobre os métodos de vacinação mais tradicionais, tais como vírus vivos atenuados e vacinas baseadas em proteínas recombinantes. As vacinas de DNA são seguras, estáveis, facilmente produzidas, e bem toleradas em humanos com os ensaios pré-clínicos indicando pouca evidência de integração de plasmídeo [Martin, T., et al., Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. Hum Gene Ther, 1999. 10(5): p. 759-68; Nichols, W.W., et al., Potential DNA vaccine integration into host cell genome. Ann N Y Acad Sci, 1995. 772: p. 30-9]. Além disso, as vacinas de DNA são bem adequadas para administração repetida, devido ao fato da eficácia da vacina não ser influenciada por anticorpos pré-existentes para o vetor [Chattergoon, M., J. Boyer, and D.B. Weiner, 25 Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. FASEB J, 1997. 11(10): p. 753-63]. No entanto, um grande obstáculo para a adoção clínica de vacinas de DNA tem sido uma diminuição da imunogenicidade da plataforma quando se volta para animais maiores [Liu, M.A. and J.B. Ulmer, Human clinical trials of plasmid DNA 30

vaccines. *Adv Genet*, 2005. 55: p. 25-40]. Os recentes avanços tecnológicos em engenharia do imunogene da vacina de DNA, tal como otimização de códon, otimização de RNA e adição de sequências líderes de imunoglobulina melhoraram a expressão e imunogenicidade de vacinas de DNA [Andre, S., et al., Increased immune response elicited
5 by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J Virol*, 1998. 72(2): p. 1497-503; Deml, L., et al., Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J Virol*, 2001. 75(22): p. 10991-1001; Laddy, D.J., et al., Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian
10 influenza. *Vaccine*, 2007. 25(16): p. 2984-9; Frelin, L., et al., Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. *Gene Ther*, 2004. 11(6): p. 522-33].

Os recentes avanços tecnológicos em sistemas de distribuição de plasmídeos melhoraram a expressão e a imunogenicidade das vacinas de DNA, incluindo tecnologias,
15 tais como eletroporação [Hirao, L.A., et al., Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine*, 2008. 26(3): p. 440-8; Luckay, A., et al., Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *J Virol*, 2007. 81(10): p. 5257-69; Ahlen, G., et al., In vivo
20 electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3+ T cells. *J Immunol*, 2007. 179(7): p. 4741-53].

Além disso, estudos têm sugerido que o uso de imunógenos de consenso pode ser capaz de aumentar a resposta imune celular em relação aos antígenos nativos sozinhos
25 [Yan, J., et al., Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. *Mol Ther*, 2007. 15(2): p. 411-21; Rolland, M., et al., Reconstruction and function of ancestral center-of-tree human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J Virol*, 2007. 81(16): p. 8507-14]. No entanto, reconhece-se que a quebra da tolerância imune para os antígenos de câncer e geração de
30 autoimunidade é o maior obstáculo para vacinas contra o câncer.

Ainda permanece a necessidade de constructos de ácido nucleico que codificam antígenos de câncer de próstata e de composições úteis para induzir respostas imunes contra antígenos de câncer de próstata e, assim, quebrar a tolerância imune. Continua a

existir uma necessidade para vacinas profiláticas e terapêuticas eficazes contra o câncer de próstata que sejam eficazes e econômicas.

SUMÁRIO DAS MODALIDADES PREFERIDAS

Aspectos da presente invenção incluem moléculas de ácido nucleico compreendendo uma sequência de codificação que codifica uma ou mais proteínas selecionadas do grupo compreendendo: a) SEQ ID NO:2; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:2, desde que os aminoácidos 69, 78, 80, 82, 102, 110, 137, 139, 165, 189, 203, 220, 232 e 248 da SEQ ID NO:2 sejam conservados; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:2 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 256 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:2, desde que os aminoácidos 69, 78, 80, 82, 102, 110, 137, 139, 165, 189, 203, 220, 232 e 248 da SEQ ID NO:2 sejam conservados; b) SEQ ID NO:4; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:4, desde que os aminoácidos 21, 86, 127, 129, 154, 156, 182, 195, 206, 218, 220, 237, 249, 255, 265, 271 e 275 da SEQ ID NO:4 sejam conservados; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:4 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 274 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:4, desde que os aminoácidos 21, 86, 127, 129, 154, 156, 182, 195, 206, 218, 220, 237, 249, 255, 265, 271 e 275 da SEQ ID NO:4 sejam conservados; c) SEQ ID NO:6; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:6, desde que os aminoácidos 14, 15, 32, 47, 58, 79, 111, 157, 223, 320, 350, 475, 499, 569, 613, 624, 653, 660, 663, 733 e 734 da SEQ ID NO:6 sejam conservados; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:6 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 735 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:6, desde que os aminoácidos 14, 15, 32, 47, 58, 79, 111, 157, 223, 320, 350, 475, 499, 569, 613, 624, 653, 660, 663, 733 e 734 da SEQ ID NO:6 sejam conservados; d) SEQ ID NO:8; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:8, desde que os aminoácidos 21, 31, 32, 49, 64, 75, 96, 128, 174, 240, 337, 367, 492, 516, 565, 586, 630, 641, 670, 677, 680, 750 e 751 da SEQ ID NO:8 sejam conservados; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:8 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 752 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:8, desde que os aminoácidos 21, 31, 32, 49, 64, 75, 96, 128, 174, 240, 337, 367, 492, 516, 565, 586, 630, 641, 670, 677, 680, 750 e 751 da SEQ ID NO:8 sejam conservados; e) SEQ ID NO:10; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:10; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:10 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 333 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:10; f) SEQ ID NO:12; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID

NO:12; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:12 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 349 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:12; g) SEQ ID NO:14; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:14 ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:14 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 129 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:14; ou h) um peptídeo sinal ligado aos aminoácidos 19-131 da SEQ ID NO:14; uma proteína que tem um peptídeo sinal ligado a uma sequência de aminoácidos que é 98% homóloga aos aminoácidos 19-131 da SEQ ID NO:14; ou proteína que tem um peptídeo sinal ligado a um fragmento imunogênico dos aminoácidos 19-131 da SEQ ID NO:14, o fragmento compreendendo pelo menos 110 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:14 e ligado a um peptídeo sinal. Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico são escolhidas dentre as proteínas que codificam a), b), c), ou d).

Em um outro aspecto, a invenção inclui métodos para tratar um indivíduo que tenha sido diagnosticado com câncer de próstata compreendendo a administração de uma molécula de ácido nucleico descrita aqui a um indivíduo.

Em um outro aspecto, são fornecidas proteínas selecionadas do grupo consistindo em: a) SEQ ID NO:2; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:2, desde que os aminoácidos 69, 78, 80, 82, 102, 110, 137, 139, 165, 189, 203, 220, 232 e 248 da SEQ ID NO:2 sejam conservados; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:2 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 261 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:2, desde que os aminoácidos 69, 78, 80, 82, 102, 110, 137, 139, 165, 189, 203, 220, 232 e 248 da SEQ ID NO:2 sejam conservados; b) SEQ ID NO:4; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:4, desde que os aminoácidos 21, 86, 127, 129, 154, 156, 182, 195, 206, 218, 220, 237, 249, 255, 265, 271 e 275 da SEQ ID NO:4 sejam conservados; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:4 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 274 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:4, desde que os aminoácidos 21, 86, 127, 129, 154, 156, 182, 195, 206, 218, 220, 237, 249, 255, 265, 271 e 275 da SEQ ID NO:4 sejam conservados; c) SEQ ID NO:6; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:6, desde que os aminoácidos 14, 15, 32, 47, 58, 79, 111, 157, 223, 320, 350, 475, 499, 569, 613, 624, 653, 660, 663, 733 e 734 da SEQ ID NO:6 sejam conservados; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:6 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 735 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:6, desde que os aminoácidos 14, 15, 32, 47, 58, 79, 111, 157, 223, 320, 350,

475, 499, 569, 613, 624, 653, 660, 663, 733 e 734 da SEQ ID NO:6 sejam conservados; d) SEQ ID NO:8; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:8, desde que os aminoácidos 21, 31, 32, 49, 64, 75, 96, 128, 174, 240, 337, 367, 492, 516, 565, 586, 630, 641, 670, 677, 680, 750 e 751 da SEQ ID NO:8 sejam conservados; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:8 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 752 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:8, desde que os aminoácidos 21, 31, 32, 49, 64, 75, 96, 128, 174, 240, 337, 367, 492, 516, 565, 586, 630, 641, 670, 677, 680, 750 e 751 da SEQ ID NO:8 sejam conservados; e) SEQ ID NO:10; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:10; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:10 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 333 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:10; f) SEQ ID NO:12; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:12; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:12 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 349 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:12; g) SEQ ID NO:14; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:14; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:14 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 129 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:14; ou h) um peptídeo sinal ligado aos aminoácidos 19-131 da SEQ ID NO:14; uma proteína que tem um peptídeo sinal ligado a uma sequência de aminoácidos que é 98% homóloga aos aminoácidos 19-131 da SEQ ID NO:14; ou proteína que tem um peptídeo sinal ligado a um fragmento imunogênico dos aminoácidos 19-131 da SEQ ID NO:14, o fragmento compreendendo pelo menos 110 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:14 e ligado a um peptídeo sinal. Em algumas modalidades, a proteína é selecionada do grupo compreendendo: proteínas a), b), c), ou d).

Alguns aspectos da invenção incluem métodos para tratar um indivíduo que tenha sido diagnosticado com câncer de próstata compreendendo a administração ao dito indivíduo de uma proteína descrita aqui.

Outros aspectos da invenção são as composições farmacêuticas que compreendem as moléculas de ácido nucleico aqui fornecidas e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra os resultados de tradução *in vitro* realizada para confirmar a expressão dos antígenos PSA e PSMA.

A Figura 2A mostra os resultados de imunogenicidade celular. A imunogenicidade celular de antígenos PSA foi determinada por ELISpot de Interferon-gama.

A Figura 2B mostra dados de imunogenicidade celular. A imunogenicidade celular de antígenos PSA foi determinada por ELISpot de Interferon-gama.

As Figuras 3A-C mostram as respostas de células T CD4+ como caracterizadas por citometria de fluxo, apresentando gráficos que mostram a produção de citocina específica de PSA (painel à esquerda), específica de PSMA (painel do meio) e específica de vacina total (painel à direita); % de células T CD4+ produtoras de IFN γ (Fig. 3A); % de células T CD4+ produtoras de IL-2 (Fig. 3B), e % de células T CD4+ produtoras de TNF α (Fig. 3C).

As Figuras 4A-C mostram as respostas de células T CD8+ como caracterizadas por citometria de fluxo, apresentando gráficos que mostram a produção de citocinas específica de PSA (painel à esquerda), específica de PSMA (painel do meio) e específica de vacina total (painel à direita): % de células T CD8+ produtoras de IFN γ (Fig. 4A); % de células T CD8+ produtoras de IL-2 (Fig. 4B), e % de células T CD8+ produtoras de TNF α (Fig. 4C).

As Figuras 5A-B mostram dados de ELISA para os anticorpos específicos para PSA, uma semana após a imunização final. (Fig. 5A) Titulações de ponto final de PSA IgG terminal. (Fig. 5B) Curvas de titulação representativas de IgG.

DESCRIÇÃO DETALHADA

São fornecidas aqui proteínas da próstata da sequência de consenso e moléculas de ácido nucleico isolado que as codificam e, em particular, antígenos específicos da próstata (PSA), antígeno de membrana específico da próstata (PSMA), antígeno epitelial seis-transmembranar do antígeno da próstata (STEAP) e antígeno de células-tronco específico de próstata (PSCA).

Os antígenos de câncer de próstata aqui descritos são sequências de consenso derivadas de um pool de antígenos homólogos de múltiplas espécies, incluindo a espécie a que a vacina se destina. As espécies selecionadas a partir das quais as sequências de antígenos estão alinhadas de modo a formar um consenso devem ser escolhidas com base na proximidade das espécies em uma árvore filogenética, por exemplo, *H. sapiens* (humanos), *M. mulatta* (macacos rhesus), e *M. fascicularis* (macaco cinomolgo). O antígeno de consenso não é idêntico ao antígeno da próstata nativo, mas terá estreita identidade, cujas sequências partilham pelo menos 85%, e preferencialmente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade. Estes antígenos de câncer de consenso descritos são capazes de quebrar a tolerância na espécie alvo (ou causar a autoimunidade) e gerar uma resposta imune eficaz contra o antígeno de câncer de próstata. São fornecidos aqui métodos para gerar uma vacina de DNA baseada em antígeno de consenso de câncer.

Aspectos da presente invenção incluem moléculas de ácido nucleico compreendendo uma sequência de codificação que codifica uma ou mais proteínas selecionadas do grupo compreendendo: a) SEQ ID NO:2; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:2, desde que os aminoácidos 69, 78, 80, 82, 102, 110, 137, 139, 165, 189, 203, 220, 232 e 248 da SEQ ID NO:2 sejam conservados; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:2 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 256 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:2, desde que os aminoácidos 69, 78, 80, 82, 102, 110, 137, 139, 165, 189, 203, 220, 232 e 248 da SEQ ID NO:2 sejam conservados; b) SEQ ID NO:4; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:4, desde que os aminoácidos 21, 86, 127, 129, 154, 156, 182, 195, 206, 218, 220, 237, 249, 255, 265, 271 e 275 da SEQ ID NO:4 sejam conservados; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:4 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 274 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:4, desde que os aminoácidos 21, 86, 127, 129, 154, 156, 182, 195, 206, 218, 220, 237, 249, 255, 265, 271 e 275 da SEQ ID NO:4 sejam conservados; c) SEQ ID NO:6; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:6, desde que os aminoácidos 14, 15, 32, 47, 58, 79, 111, 157, 223, 320, 350, 475, 499, 569, 613, 624, 653, 660, 663, 733 e 734 da SEQ ID NO:6 sejam conservados; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:6 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 735 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:6, desde que os aminoácidos 14, 15, 32, 47, 58, 79, 111, 157, 223, 320, 350, 475, 499, 569, 613, 624, 653, 660, 663, 733 e 734 da SEQ ID NO:6 sejam conservados; d) SEQ ID NO:8; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:8, desde que os aminoácidos 21, 31, 32, 49, 64, 75, 96, 128, 174, 240, 337, 367, 492, 516, 565, 586, 630, 641, 670, 677, 680, 750 e 751 da SEQ ID NO:8 sejam conservados; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:8 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 752 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:8, desde que os aminoácidos 21, 31, 32, 49, 64, 75, 96, 128, 174, 240, 337, 367, 492, 516, 565, 586, 630, 641, 670, 677, 680, 750 e 751 da SEQ ID NO:8 sejam conservados; e) SEQ ID NO:10; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:10; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:10 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 333 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:10; f) SEQ ID NO:12; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:12; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:12 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 349 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:12; g) SEQ ID NO:14; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:14; ou um fragmento

imunogênico da SEQ ID NO:14 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 129 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:14; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:14 compreendendo pelo menos 129 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:14; ou h) um peptídeo sinal ligado aos aminoácidos 19-131 da SEQ ID NO:14; uma

5 proteína que tem um peptídeo sinal ligado a uma sequência de aminoácidos que é 98% homóloga aos aminoácidos 19-131 da SEQ ID NO:14; ou proteína que tem um peptídeo sinal ligado a um fragmento imunogênico dos aminoácidos 19-131 da SEQ ID NO:14, o fragmento compreendendo pelo menos 110 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:14 e ligado a um peptídeo sinal. Duas sequências de proteína de consenso para PSA são

10 divulgadas: sequência de Antígeno de Consenso de PSA 1 (SEQ ID NO:2) e sequência de Antígeno de Consenso de PSA 2 (SEQ ID NO:4). Duas sequências de proteína de consenso para PSMA são divulgadas: sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 1 (SEQ ID NO:6) e sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 2 (SEQ ID NO:8). Duas sequências de proteína de consenso para STEAP (também referida como STEAP1) são

15 divulgadas: sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 1 (SEQ ID NO:10) e sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 2 (SEQ ID NO:12). Uma sequência de proteína de consenso para PSCA: sequência de Antígeno de Consenso de PSCA (SEQ ID NO:14). SEQ ID NO:14 inclui um peptídeo sinal de IgE. Em algumas modalidades, um Antígeno de Consenso de PSCA pode incluir aminoácidos 19-131 da SEQ ID NO:14 ligados a uma

20 sequência sinal diferente da sinal de IgE na SEQ ID NO:14. Em algumas modalidades as moléculas de ácido nucleico são escolhidas daquelas codificando proteínas a), b), c), ou d), acima. Em outras modalidades, as moléculas de ácido nucleico são aquelas que codificam uma ou mais proteínas selecionadas do grupo compreendendo: pelo menos uma selecionada daquelas que codificam qualquer uma das proteínas a) ou b), e pelo menos

25 uma selecionada daquelas que codificam qualquer uma das proteínas c) ou d).

As moléculas de ácido nucleico podem ainda ser moléculas que codificam uma ou mais proteínas selecionadas do grupo compreendendo: SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:12; ou SEQ ID NO:14; e preferencialmente, SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:6; ou SEQ ID NO:8. Em

30 algumas modalidades, as moléculas de ácidos nucleicos podem ser aquelas que codificam uma ou mais proteínas selecionadas do grupo compreendendo: pelo menos uma selecionada quer de SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4, e pelo menos uma selecionada quer de SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:8.

Em um outro aspecto, são fornecidas proteínas selecionadas do grupo consistindo em: a) SEQ ID NO:2; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:2, desde que os aminoácidos 69, 78, 80, 82, 102, 110, 137, 139, 165, 189, 203, 220, 232 e 248 da SEQ ID NO:2 sejam conservados; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:2 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 256 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:2, desde que os aminoácidos 69, 78, 80, 82, 102, 110, 137, 139, 165, 189, 203, 220, 232 e 248 da SEQ ID NO:2 sejam conservados; b) SEQ ID NO:4; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:4, desde que os aminoácidos 21, 86, 127, 129, 154, 156, 182, 195, 206, 218, 220, 237, 249, 255, 265, 271 e 275 da SEQ ID NO:4 sejam conservados; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:4 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 274 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:4, desde que os aminoácidos 21, 86, 127, 129, 154, 156, 182, 195, 206, 218, 220, 237, 249, 255, 265, 271 e 275 da SEQ ID NO:4 sejam conservados; c) SEQ ID NO:6; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:6, desde que os aminoácidos 14, 15, 32, 47, 58, 79, 111, 157, 223, 320, 350, 475, 499, 569, 613, 624, 653, 660, 663, 733 e 734 da SEQ ID NO:6 sejam conservados; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:6 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 735 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:6, desde que os aminoácidos 14, 15, 32, 47, 58, 79, 111, 157, 223, 320, 350, 475, 499, 569, 613, 624, 653, 660, 663, 733 e 734 da SEQ ID NO:6 sejam conservados; d) SEQ ID NO:8; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:8, desde que os aminoácidos 21, 31, 32, 49, 64, 75, 96, 128, 174, 240, 337, 367, 492, 516, 565, 586, 630, 641, 670, 677, 680, 750 e 751 da SEQ ID NO:8 sejam conservados; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:8 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 752 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:8, desde que os aminoácidos 21, 31, 32, 49, 64, 75, 96, 128, 174, 240, 337, 367, 492, 516, 565, 586, 630, 641, 670, 677, 680, 750 e 751 da SEQ ID NO:8 sejam conservados; e) SEQ ID NO:10; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:10; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:10 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 333 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:10; f) SEQ ID NO:12; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:12; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:12 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 349 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:12; g) SEQ ID NO:14; uma proteína que é 98% homóloga à SEQ ID NO:14; ou um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:14 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo

menos 129 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:14; ou h) um peptídeo sinal ligado aos aminoácidos 19-131 da SEQ ID NO:14; uma proteína que tem um peptídeo sinal ligado a uma sequência de aminoácidos que é 98% homóloga aos aminoácidos 19-131 da SEQ ID NO:14; ou proteína que tem um peptídeo sinal ligado a um fragmento imunogênico dos aminoácidos 19-131 da SEQ ID NO:14, o fragmento compreendendo pelo menos 110 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:14 e ligado a um peptídeo sinal. Em algumas modalidades, a proteína é selecionada do grupo compreendendo: proteínas a), b), c), ou d). Em outras modalidades as proteínas são aquelas que codificam uma ou mais proteínas selecionadas do grupo compreendendo: pelo menos uma selecionada quer de proteínas a) ou b), e pelo menos uma selecionada quer de proteínas c) ou d).

As proteínas podem ser ainda proteínas selecionadas do grupo compreendendo: SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:12; ou SEQ ID NO:14; e preferencialmente, SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:6; ou SEQ ID NO:8. Em algumas modalidades, as proteínas podem ser aquelas selecionadas do grupo compreendendo: pelo menos uma selecionada quer de SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4, e pelo menos uma selecionada quer de SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:8.

As sequências de ácidos nucleicos foram geradas para melhorar e otimizar a expressão. Os códons usados nas moléculas de ácidos nucleicos foram selecionados para gerar RNA tendo formação de estrutura secundária reduzida devido à hibridação intramolecular. As sequências de ácidos nucleicos que codificam a sequência de Antígeno de Consenso de PSA 1 (SEQ ID NO:1) e sequência de Antígeno de Consenso de PSA 2 (SEQ ID NO:3) são divulgadas. Do mesmo modo, a sequência de codificação de ácido nucleico para a sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 1 (SEQ ID NO:5 de nucleotídeos 1-2250 da SEQ ID NO:5) e sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 2 (SEQ ID NO:7 ou nucleotídeos 1-2301 da SEQ ID NO:7) bem como a sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 1 (SEQ ID NO:9), sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 2 (SEQ ID NO:11) e sequência de Antígeno de Consenso de PSCA (SEQ ID NO:13) são fornecidas. Também são fornecidas sequências de ácidos nucleicos que são 98% homólogas à SEQ ID NO:1 e codificam quer a sequência de Antígeno de Consenso de PSA 1 (SEQ ID NO:2) ou uma proteína até 98% homóloga à SEQ ID NO:2, preferencialmente incluindo aminoácidos 69, 78, 80, 82, 102, 110, 137, 139, 165, 189, 203, 220, 232 e 248 da SEQ ID NO:2, e sequências de ácidos nucleicos que são 98% homólogas

à SEQ ID NO:3 e codificam quer a sequência de Antígeno de Consenso de PSA 2 (SEQ ID NO:4) ou uma proteína até 98% homóloga à SEQ ID NO:4, preferencialmente incluindo aminoácidos 21, 86, 127, 129, 154, 156, 182, 195, 206, 218, 220, 237, 249, 255, 265, 271 e 275 da SEQ ID NO:4. Do mesmo modo, as sequências de ácidos nucleicos que são 98%
5 homóloga aos nucleotídeos 2250 da SEQ ID NO:5 e codificam quer a sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 1 (SEQ ID NO:6) ou uma proteína até 98% homóloga à SEQ ID NO:6, preferencialmente incluindo aminoácidos 14, 15, 32, 47, 58, 79,111, 157, 223, 320, 350, 475, 499, 569, 613, 624, 653, 660, 663, 733 e 734 da SEQ ID NO:6, ou sequências de ácidos nucleicos que são 98% homóloga aos nucleotídeos 2301 da SEQ ID
10 NO:7 e codificam quer a sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 1 (SEQ ID NO:8) ou uma proteína até 98% homóloga à SEQ ID NO:8, preferencialmente incluindo aminoácidos 21, 31, 32, 49, 64, 75, 96, 128, 174, 240, 337, 367, 492, 516, 565, 586, 630, 641, 670, 677, 680, 750 e 751 da SEQ ID NO:8 bem como nucleotídeos 98% homólogos à SEQ ID NO 9 e codificam quer a sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 1 (SEQ
15 ID NO:10) ou uma proteína que é até 98% homóloga à SEQ ID NO:10, nucleotídeos 98% homólogos à SEQ ID NO:11 e codificam quer a sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 2 (SEQ ID NO:12) ou uma proteína que é até 98% homóloga à SEQ ID NO:12, e nucleotídeos 98% homólogos à SEQ ID NO:13 e codifica a sequência de Antígeno de Consenso de PSCA (SEQ ID NO:14) ou uma proteína que é até 98% homóloga à SEQ ID
20 NO:14. Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico codificam uma proteína que compreende um peptídeo sinal de IgE (por exemplo, SEQ ID NO:3 que codifica SEQ ID NO:4; nucleotídeos 1-2301 da SEQ ID NO:7 que codifica SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:11 que codifica SEQ ID NO:12, e SEQ ID NO:13 que codifica SEQ ID NO:14).

As composições que compreendem moléculas de ácido nucleico as quais
25 compreendem as sequências que codificam as moléculas de ácido nucleico isolado aqui fornecidas podem ser úteis para induzir respostas imunes contra uma proteína da próstata quando administradas em um animal. As composições que contêm uma ou mais destas sequências de ácidos nucleicos podem ser usadas como vacinas ou componentes de vacinas para imunizar profilaticamente ou terapêuticamente contra o câncer de próstata. Da mesma
30 forma, as composições compreendendo proteínas de consenso podem ser úteis para a indução de respostas imunes contra uma proteína da próstata quando administradas em um animal. Combinações de composições que compreendem moléculas de ácido nucleico as quais compreendem as sequências de codificação das moléculas de ácido nucleico isolado

fornecidas aqui podem ser úteis para induzir respostas imunes contra uma proteína da próstata e podem ser usadas coletivamente como vacinas ou componentes de vacinas para imunizar profilaticamente ou terapeuticamente contra o câncer de próstata. Da mesma forma, composições compreendendo proteínas de consenso podem ser úteis para a indução de respostas imunes contra uma proteína da próstata quando administradas em um animal. As composições que contêm uma ou mais destas proteínas de consenso podem ser usadas como vacinas ou componentes de vacinas para imunizar profilaticamente ou terapeuticamente contra o câncer de próstata.

As vacinas são fornecidas as quais compreendem as sequências de ácidos nucleicos aqui fornecidas. Em algumas modalidades, são fornecidas vacinas que compreendem sequências de ácidos nucleicos que codificam um ou mais antígenos de próstata de consenso selecionados do grupo consistindo em: antígeno PSA de consenso 1, antígeno PSA de consenso 2, antígeno PSMA de consenso 1, antígeno PSMA de consenso 2, antígeno STEAP de consenso 1, antígeno STEAP de consenso 2 e PSCA de consenso. Métodos para induzir as respostas imunes que utilizam as sequências de ácidos nucleicos que codificam um ou mais antígenos da próstata selecionados a partir do grupo que consiste em: antígeno PSA de consenso 1, antígeno PSA de consenso 2, antígeno PSMA de consenso 1, antígeno PSMA de consenso 2, antígeno STEAP de consenso 1, antígeno STEAP de consenso 2 e PSCA de consenso.

As vacinas que compreendem um ou mais de antígeno PSA de consenso 1, antígeno PSA de consenso 2, antígeno PSMA de consenso 1, antígeno PSMA de consenso 2, antígeno STEAP de consenso 1, antígeno consenso STEAP 2 e PSCA de consenso são fornecidas. Métodos para induzir respostas imunes que utilizam um ou mais de antígeno PSA de consenso 1, antígeno PSA de consenso 2, antígeno PSMA de consenso 1, antígeno PSMA de consenso 2, antígeno STEAP de consenso 1, antígeno STEAP de consenso 2, e PSCA de consenso também são fornecidos.

Métodos de proteção de um indivíduo contra o câncer de próstata ou de tratamento de um indivíduo que tenha sido identificado como tendo câncer de próstata são fornecidos. Os métodos compreendem a etapa de: administrar ao dito indivíduo uma quantidade eficaz de uma ou mais moléculas de ácido nucleico compreendendo uma ou mais sequências de ácidos nucleicos aqui fornecidas. Em alguns métodos, a distribuição de moléculas de ácido nucleico é facilitada por eletroporação do tecido alvo ou do tecido que recebe as moléculas de ácido nucleico. A sequência de ácidos nucleicos é expressa nas células do indivíduo e a

resposta imune é induzida contra a proteína da próstata codificada pela sequência de ácidos nucleicos.

1. Definições.

A terminologia usada aqui é para o propósito de descrever modalidades particulares e não tem a intenção de ser limitante. Como usado no relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas singulares “um”, “uma” e “o, a” incluem os referentes nos plurais a menos que o contexto dite claramente o contrário.

Para a recitação das faixas numéricas aqui apresentadas, cada número de intervenção ali, entre o mesmo grau de precisão é explicitamente contemplado. Por exemplo, para a faixa de 6-9, os números 7 e 8 são contemplados além de 6 e 9, e para a faixa de 6,0-7,0, os números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 e 7,0 são explicitamente contemplados.

a. Adjuvante

“Adjuvante”, tal como aqui usado, significa qualquer molécula adicionada às vacinas de DNA de plasmídeo descrita aqui para melhorar a imunogenicidade dos antígenos codificados pelos plasmídeos de DNA e as sequências de codificação de ácido nucleico descritas a seguir.

b. Anticorpo

“Anticorpo”, tal como aqui usado, significa um anticorpo das classes de IgG, IgM, IgA, IgD ou IgE, ou fragmentos, fragmentos ou derivados das mesmas, incluindo fragmentos Fab, F(ab')₂, Fd, e anticorpos de cadeia simples, diacorpos, anticorpos biespecíficos, anticorpos e seus derivados bifuncionais. O anticorpo pode ser um anticorpo isolado a partir da amostra de soro de um mamífero, anticorpos policlonais, anticorpos purificados por afinidade, ou misturas dos mesmos, que apresenta uma especificidade de ligação à suficiente para um desejado epítipo ou uma sequência derivada do mesmo.

c. Sequência de Codificação

“Sequência de codificação” ou “ácido nucleico de codificação”, tal como aqui usado, significa que os ácidos nucleicos (RNA ou DNA) que compreendem uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína. A sequência de codificação pode incluir ainda os sinais de iniciação e de terminação operativamente ligados a elementos reguladores incluindo um promotor e sinal de poliadenilação capazes de dirigir a expressão nas células de um indivíduo ou de mamíferos para os quais o ácido nucleico é administrado.

d. Complemento

“Complemento” ou “complementar”, tal como usado aqui, significa um ácido nucleico que pode significar o emparelhamento de bases de Watson-Crick (por exemplo, A-T/U e C-G) ou de Hoogsteen entre os nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos de moléculas de ácido nucleico.

5 **e. Consenso ou Sequência de Consenso**

“Consenso” ou “sequência de consenso”, tal como aqui usado, significa uma sequência de polipeptídeo com base na análise de um alinhamento dos múltiplos subtipos de um antígeno específico da próstata. As sequências de ácidos nucleicos que codificam uma sequência de polipeptídeo de consenso podem ser preparadas. As vacinas
10 compreendendo proteínas que compreendem sequências de consenso e/ou moléculas de ácidos nucleicos que codificam tais proteínas podem ser usadas para induzir a imunidade ampla contra um antígeno específico da próstata.

f. Eletroporação

“Eletroporação”, “eletropermeabilização,” ou “intensificação eletrocínética”
15 (“EP”), como aqui usado indiferentemente significa o uso de um impulso de campo elétrico da transmembrana para induzir vias microscópicas (poros) em uma biomembrana; a sua presença permite que as biomoléculas, tais como plasmídeos, oligonucleotídeos, siRNA, fármacos, íons e água para passar de um lado da membrana celular para o outro.

g. Fragmento

“Fragmento”, como aqui usado em relação às sequências de ácidos nucleicos
20 significa uma sequência de ácidos nucleicos ou uma porção da mesma, que codifica um polipeptídeo capaz de desencadear uma resposta imune em um mamífero que reage de forma cruzada com um antígeno da próstata de comprimento completo. Os fragmentos podem ser fragmentos de DNA selecionados a partir de pelo menos uma das várias
25 sequências de nucleotídeos que codificam as sequências de aminoácidos de consenso e constructos compreendendo tais sequências. Os fragmentos de DNA podem compreender sequências líderes de imunoglobulina, tais como sequências de codificação IgE ou IgG. Os fragmentos de DNA podem codificar os fragmentos proteicos descritos abaixo.

“Fragmento” em relação às sequências de polipeptídeos significa um polipeptídeo
30 capaz de desencadear uma resposta imune em um mamífero que reage de forma cruzada com um antígeno da próstata, incluindo, por exemplo, PSA, PSMA, STEAP e PSCA.

A sequência de PSA humana tem cerca de 261 aminoácidos. Os fragmentos de antígeno de consenso de PSA 1 podem compreender pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% da SEQ ID NO:2, e preferencialmente 98% ou 99%, desde que os fragmentos incluam um ou mais dos aminoácidos 69, 78, 80, 82, 102, 110, 137, 139, 165, 189, 203, 220, 232 e 248. Os fragmentos de antígeno de consenso de PSA 1 podem compreender 255, 256, 257, 258, 259 ou 260 aminoácidos da SEQ ID NO:2, mas preferencialmente 256 aminoácidos ou mais. Os fragmentos de antígeno de consenso de PSA 2 podem compreender pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% da SEQ ID NO:4, e preferencialmente 98% ou 99%, desde que os fragmentos incluam um ou mais dos aminoácidos 21, 86, 127, 129, 154, 156, 182, 195, 206, 218, 220, 237, 249, 255, 265, 271 e 275. Todos esses fragmentos de antígeno de consenso de PSA 2 podem também opcionalmente excluir os aminoácidos 1-17. Em algumas modalidades, os fragmentos de antígeno de consenso de PSA 2 podem opcionalmente compreender um ou mais aminoácidos 1-17 e dos aminoácidos a partir do aminoácido 18 ao aminoácido 278, os fragmentos de antígeno de consenso de PSA 2 podem também compreender 255, 256, 257, 258, 259 ou 260 aminoácidos da SEQ ID NO:4, mas preferencialmente 274 aminoácidos ou mais.

A sequência de PSMA humano tem cerca de 749-750 aminoácidos. Os fragmentos de antígeno de PSMA de consenso 1 podem compreender pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% da SEQ ID NO:6, e preferencialmente 98% ou 99%, desde que os fragmentos incluam um ou mais dos aminoácidos 14, 15, 32, 47, 58, 79, 111, 157, 223, 320, 350, 475, 499, 569, 613, 624, 653, 660, 663, 733 e 734. Os fragmentos de antígeno de PSMA de consenso 1 podem compreender 745, 746, 747, 748 ou 749 aminoácidos da SEQ ID NO:6, mas preferencialmente 735 aminoácidos ou mais. Os fragmentos de antígeno de PSMA de consenso 2 podem compreender pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% da SEQ ID NO:8, e preferencialmente 98% ou 99%, desde que os fragmentos incluam um ou mais dos aminoácidos 21, 31, 32, 49, 64, 75, 96, 128, 174, 240, 337, 367, 492, 516, 565, 586, 630, 641, 670, 677, 680, 750 e 751. Todos esses fragmentos de antígeno de consenso de PSA 2 podem também opcionalmente excluir os aminoácidos 1-17. Em algumas modalidades, os fragmentos de antígeno de consenso de PSA 2 podem opcionalmente compreender um ou mais aminoácidos 1-17 e dos aminoácidos a partir do aminoácido 18 ao aminoácido 767, os fragmentos de antígeno de PSMA de consenso 2 podem também compreender 761, 762, 763, 764, 765 ou 766 aminoácidos da SEQ ID NO:8, mas preferencialmente 752 aminoácidos ou mais.

A sequência de STEAP humano tem cerca de 339 aminoácidos. As sequências de STEAP de consenso podem compreender sequências de aminoácidos para o líder de imunoglobulina como IgE ou IgG. O antígeno STEAP de consenso 2 contém uma sequência líder de 18 aminoácidos no lugar de metionina na posição 1. Os fragmentos de antígeno de PSMA de consenso 2 podem compreender uma sequência líder e pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de aminoácidos 18-356 da SEQ ID NO:12, e preferencialmente 98% ou 99%. Os fragmentos de antígeno de PSMA de consenso 1 podem compreender aminoácidos 1-350, 1-351, 1-352, 1-353, 1-354 ou 1-355 da SEQ ID NO:12.

A sequência de PSCA humano tem cerca de 114 aminoácidos. As sequências de STEAP de consenso podem compreender sequências de aminoácidos para o líder de imunoglobulina como IgE ou IgG. O antígeno PSCA de consenso contém uma sequência líder de 18 aminoácidos no lugar de metionina na posição 1. Os fragmentos de antígeno de consenso de PSCA podem compreender uma sequência líder e pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de aminoácidos 18-131 da SEQ ID NO:14, e preferencialmente 98% ou 99%. Os fragmentos de antígeno de PSMA de consenso 1 podem compreender aminoácidos 1-125, 1-126, 1-127, 1-128, 1-129 ou 1-130 da SEQ ID NO:14.

h. Constructo Genético

Tal como aqui usado, o termo “constructo genético” refere-se às moléculas de DNA ou RNA que compreendem uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína. A sequência de codificação inclui sinais de iniciação e de terminação operativamente ligados a elementos reguladores incluindo um promotor e sinal de poliadenilação capazes de dirigir a expressão nas células do indivíduo ao qual a molécula de ácido nucleico é administrada. Tal como aqui usado, o termo “forma expressável” refere-se a constructos de genes que contêm os elementos reguladores operáveis necessários ligados a uma sequência de codificação que codifica uma proteína tal que, quando presente na célula do indivíduo, a sequência de codificação será expressa.

i. Homologia

A homologia de múltiplos alinhamentos de sequências e o filograma foram gerados usando ClustalW, um programa de alinhamento de sequências de múltiplas finalidade geral para DNA ou proteínas.

j. Idêntico

“Idêntico” ou “identidade”, tal como aqui usado no contexto de dois ou mais ácidos nucleicos ou de sequências de polipeptídeos, significa que as sequências têm uma porcentagem especificada de resíduos, que são as mesmas ao longo de uma região especificada. A porcentagem pode ser calculada por alinhamento ótimo das duas sequências, comparando as duas sequências ao longo da região determinada, determinando o número de posições nas quais o resíduo idêntico ocorre em ambas as sequências, para produzir o número de posições correspondentes, dividindo o número de posições correspondentes pelo número total de posições na região especificada, e multiplicando o resultado por 100 para produzir a porcentagem de identidade de sequência. Nos casos onde as duas sequências são de diferentes comprimentos ou o alinhamento produz uma ou mais extremidades escalonadas e a região especificada de comparação inclui apenas uma única sequência, os resíduos da sequência sinal estão incluídos no denominador, mas não no numerador do cálculo. Quando se compara o DNA e o RNA, a timina (T) e uracila (U) podem ser consideradas equivalentes. A identidade pode ser realizada manualmente ou por meio de um algoritmo de sequência de computador, tais como BLAST ou BLAST 2.0.

k. Resposta Imune

A “resposta imune”, tal como aqui usado, significa a ativação do sistema imune de um hospedeiro, por exemplo, a de um mamífero, em resposta à introdução do antígeno tal como um antígeno de consenso da próstata. A resposta imune pode ser na forma de uma resposta celular ou humoral, ou ambas.

l. Ácido Nucleico

“Ácido nucleico” ou “oligonucleotídeo” ou “polinucleotídeo”, tal como aqui usado, significa pelo menos dois nucleotídeos ligados covalentemente em conjunto. A representação de uma fita simples também define a sequência da fita complementar. Assim, um ácido nucleico engloba também a fita complementar de uma cadeia simples descrita. Muitas variantes de um ácido nucleico podem ser usadas para o mesmo objetivo que um determinado ácido nucleico. Assim, um ácido nucleico engloba também os ácidos nucleicos substancialmente idênticos e os seus complementos. Um único fio fornece uma sonda que pode hibridizar com uma sequência alvo, sob condições de hibridação rigorosas. Assim, um ácido nucleico engloba também uma sonda que hibridiza sob condições rigorosas de hibridação.

Os ácidos nucleicos podem ser de fita simples ou de fita dupla, ou podem conter porções de ambas as sequências de fita simples e de fita dupla. O ácido nucleico pode ser

DNA, tanto cDNA quanto genômico, RNA, ou um híbrido, onde o ácido nucleico pode conter combinações de desoxiribonucleotídeo e ribonucleotídeos, e combinações de bases incluindo uracila, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Os ácidos nucleicos podem ser obtidos por métodos de síntese química ou por métodos recombinantes.

m. Operativamente ligado

Tal como aqui usado “operativamente ligado” significa que a expressão de um gene está sob o controle de um promotor com o qual está espacialmente ligado. Um promotor pode ser posicionado 5' (a montante) e 3' (a jusante) de um gene sob o seu controle. A distância entre o promotor e um gene pode ser aproximadamente a mesma que a distância entre o promotor e o gene que o mesmo controla na gene do qual o promotor é derivado. Como é conhecida na técnica, esta variação na distância pode ser acomodada sem perda da função do promotor.

n. Promotor

“Promotor”, tal como aqui usado, significa uma molécula sintética ou de origem natural, que é capaz de conferir, ativar ou intensificar a expressão de um ácido nucleico em uma célula. Um promotor pode compreender uma ou mais sequências reguladoras de transcrição específicas para intensificar ainda mais a expressão e/ou alterar a expressão espacial e/ou expressão temporal do mesmo. Um promotor também pode compreender elementos repressores ou intensificadores distais, que podem estar localizados até vários milhares de pares de bases a partir do sítio de partida da transcrição. Um promotor pode ser derivado de fontes, incluindo virais, bacterianas, fúngicas, de plantas, insetos, e animais. Um promotor pode regular a expressão de um componente de gene constitutivamente, ou diferencialmente em relação à célula, o tecido ou órgão em que a expressão ocorre ou, no que diz respeito ao estágio de desenvolvimento no qual ocorre a expressão, ou em resposta a estímulos externos tais como estresse fisiológico, patógenos, íons metálicos ou agentes indutores. Exemplos representativos de promotores incluem o promotor do bacteriófago T7, promotor do bacteriófago T3, promotor SP6, promotor-operador lac, promotor tac, promotor tardio de SV40, promotor precoce de SV40, promotor de RSV-LTR, promotor CMV IE, promotor precoce de SV40 ou promotor tardio de SV40 e o promotor CMV IE.

o. Condições de Hibridação Rigorosas

“Condições de hibridação rigorosas”, tal como aqui usado, significa as condições em que uma primeira sequência de ácidos nucleicos (por exemplo, sonda) vai hibridizar

com uma segunda sequência de ácidos nucleicos (por exemplo, alvo), como em uma mistura complexa de ácidos nucleicos. As condições rigorosas são dependentes da sequência e serão diferentes em diferentes circunstâncias. As condições rigorosas podem ser selecionadas para serem cerca de 5 a 10°C mais baixas do que o ponto de fusão térmico (T_m) para a sequência específica a um pH de força iônica definida. O T_m pode ser a temperatura (sob força iônica, pH e concentração nucleica definidos) à qual 50% das sondas complementares ao alvo hibridam com a sequência alvo em equilíbrio (já que as sequências alvos estão presentes em excesso, a T_m , 50% das sondas estão ocupadas em equilíbrio). As condições rigorosas podem ser aquelas em que a concentração de sal é inferior a cerca de 1,0 M de íon de sódio, tal como cerca de 0,01-1,0 M da concentração de íon de sódio (ou outros sais) a pH 7,0 a 8,3 e a temperatura é pelo menos cerca de 30°C para sondas curtas (por exemplo, cerca de 10-50 nucleotídeos) e pelo menos cerca de 60°C para sondas longas (por exemplo, maior do que cerca de 50 nucleotídeos). As condições rigorosas podem também ser conseguidas com a adição de agentes de desestabilização tal como a formamida. Para hibridação seletiva ou específica, um sinal positivo pode ser de pelo menos 2 a 10 vezes a base da hibridação. As condições de hibridação rigorosas exemplares incluem os seguintes: 50% de formamida, 5x SSC, e SDS 1%, incubando a 42°C, ou, 5x SSC, SDS a 1%, incubando a 65°C, com lavagem em 0,2 x SSC, e SDS 0,1 % a 65°C.

20 **p. Substancialmente Complementar**

“Substancialmente complementar” como usado aqui significa que a primeira sequência é pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% ao longo do complemento de uma segunda sequência ao longo de uma região de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 180, 270, 360, 450, 540, 630, 720, 810, 900, 990, 1080, 1170, 1260, 1350, 1440, 1530, 1620, 1710, 1800, 1890, 1980, 2070 ou mais nucleotídeos ou aminoácidos, ou as duas sequências que hibridizam sob condições de hibridação rigorosas.

q. Substancialmente idêntico

“Substancialmente idêntico” como usado aqui significa que a primeira e a segunda sequências são pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idênticas ao longo de uma região de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 180, 270, 360, 450, 540, 630, 720, 810, 900, 990, 1080, 1170, 1260, 1350, 1440, 1530, 1620, 1710, 1800,

1890, 1980, 2070 ou mais nucleotídeos ou aminoácidos, ou com respeito aos aminoácidos, se a primeira sequência é substancialmente complementar ao complemento da segunda sequência.

r. Subtipo ou Sorotipo

5 “Subtipo” ou “sorotipo”: tal como é aqui usado, indiferentemente, e em referência aos antígenos de câncer de próstata, significa variantes genéticas de um antígeno de câncer de próstata tal que um subtipo (ou variante) é reconhecido por um sistema imune além de um subtipo diferente.

s. Variante

10 “Variante” é aqui usado com respeito a um ácido nucleico significa (i) uma porção ou fragmento de uma sequência de nucleotídeos referenciada; (ii) o complemento de uma sequência de nucleotídeos referenciada ou uma porção do mesmo; (iii) um ácido nucleico que é substancialmente idêntico a um ácido nucleico referenciado ou o complemento do mesmo, ou (iv) um ácido nucleico que hibridiza sob condições rigorosas para o ácido
15 nucleico referenciado, ou complemento do mesmo, ou uma sequência substancialmente idêntica à mesma.

“Variante” diz respeito a um peptídeo ou polipeptídeo que difere na sequência de aminoácidos pela inserção, deleção ou substituição conservativa de aminoácidos, mas retêm pelo menos uma atividade biológica. Variante também pode significar uma proteína
20 com uma sequência de aminoácidos que é substancialmente idêntica a uma proteína de referência, com uma sequência de aminoácidos que retém pelo menos uma atividade biológica. Uma substituição conservativa de um aminoácido, isto é, a substituição de um aminoácido por um aminoácido diferente de propriedades semelhantes (por exemplo, hidrofili-
25 dade, grau e distribuição de regiões carregadas) é reconhecida na técnica como tipicamente envolvendo uma alteração menor. Estas pequenas alterações podem ser identificadas, em parte, considerando o índice hidropático dos aminoácidos, tal como é entendido na técnica. Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982). O índice hidropático de aminoácidos baseia-se na consideração da sua hidrofobicidade e carga. É conhecido na técnica que os aminoácidos de índices hidropáticos semelhantes podem ser substituídos, e
30 ainda retêm a função da proteína. Em um aspecto, os aminoácidos que têm índices hidropáticos de ± 2 são substituídos. A hidrofili-
35 dade de aminoácidos também pode ser usada para revelar as substituições que poderiam resultar na função biológica de retenção de proteínas. Uma consideração da hidrofili-
40 dade dos aminoácidos no contexto de um

peptídeo permite o cálculo da maior hidrofiliçidade média local do peptídeo, uma medida útil que foi relatada como se correlacionando bem com a antigenicidade e imunogenicidade. Patente US 4.554.101, totalmente incorporada aqui por referência. A substituição de aminoácidos tendo valores de hidrofiliçidade semelhantes pode resultar em peptídeos retendo a atividade biológica, por exemplo, imunogenicidade, tal como é entendido na técnica. As substituições podem ser realizadas com aminoácidos tendo valores de hidrofiliçidade dentro de ± 2 de cada outro. Tanto o índice de hidrofobicidade quanto o valor de hidrofiliçidade dos aminoácidos são influenciados pela cadeia lateral particular desse aminoácido. Consistente com esta observação, as substituições de aminoácidos que são compatíveis com a função biológica são entendidas como dependendo da similaridade relativa dos aminoácidos e, em particular, das cadeias laterais dos referidos aminoácidos, tal como revelado pela hidrofobicidade, hidrofiliçidade, carga, tamanho, e outras propriedades.

t. Vetor

“Vetor”, tal como aqui usado, significa uma sequência de ácidos nucleicos contendo uma origem de replicação. Um vetor pode ser um vetor, bacteriófago, cromossomo artificial bacteriano ou cromossomo artificial de levedura. Um vetor pode ser um vetor de DNA ou de RNA. Um vetor pode ser um vetor extracromossômico, autorreplicante e, preferencialmente, é um plasmídeo de DNA.

2. Antígenos de próstata de consenso

São fornecidos aqui os antígenos de consenso capazes de induzir uma resposta imune em um mamífero contra um antígeno da próstata. O antígeno de consenso pode compreender epítomos que os tornam particularmente eficazes como imunógenos contra células de câncer de próstata que podem ser induzidas. O antígeno de próstata de consenso pode compreender o produto de tradução de comprimento completo, uma variante do mesmo, um fragmento do mesmo ou uma combinação dos mesmos.

Sete diferentes antígenos de próstata de consenso foram projetados. Dois dos antígenos de próstata de consenso são antígeno PSA de consenso 1 (SEQ ID NO:2) e antígeno PSA de consenso 2 (SEQ ID NO:4). Dois dos antígenos de próstata de consenso são antígeno de PSMA de consenso 1 (SEQ ID NO:6) e antígeno de PSMA de consenso 2 (SEQ ID NO:8). Dois dos antígenos de próstata de consenso são o antígeno STEAP de consenso 1 (SEQ ID NO:10) e o antígeno STEAP de consenso 2 (SEQ ID NO:12). Um dos antígenos de próstata de consenso é o antígeno PSCA de consenso (SEQ ID NO:14).

Proteínas podem compreender sequências homólogas aos antígenos de próstata, fragmentos dos antígenos de próstata e proteínas com sequências homólogas aos fragmentos dos antígenos de próstata.

5 O antígeno PSA de consenso 1 (SEQ ID NO:2) é cerca de 91% homólogo às sequências de PSA humano, cerca de 95% homóloga à PSA de *M. fascicularis* e cerca de 96% homóloga à PSA de *M. mulatta*. O antígeno PSA de consenso 1 difere das sequências de PSA humano nos aminoácidos 69, 78, 80, 82, 102, 110, 137, 139, 165, 189, 203, 220, 232 e 248 da SEQ ID NO:2.

10 O antígeno PSA de consenso 2 (SEQ ID NO:4) é cerca de 90-91% homólogo às sequências de PSA humano, cerca de 95% homólogo a PSA de *M. fascicularis* e cerca de 95% homóloga a PSA de *M. mulatta*. Antígeno PSA de consenso 2 compreende uma sequência líder no seu N terminal. Antígeno PSA de consenso 2 também difere das sequências de PSA humano nos aminoácidos 21, 86, 127, 129, 154, 156, 182, 195, 206, 218, 220, 237, 249, 255, 265, 271 e 275 da SEQ ID NO:4.

15 O antígeno de PSMA de consenso 1 (SEQ ID NO:6) é cerca de 96% homólogo às sequências de PSMA humano e cerca de 94% homólogo a PSMA de *M. mulatta*. O antígeno de PSMA de consenso 1 difere das sequências de PSMA humano nos aminoácidos 14, 15, 32, 47, 58, 79, 111, 157, 223, 320, 350, 475, 499, 569, 613, 624, 653, 660, 663, 733 e 734 da SEQ ID NO:6.

20 O antígeno de PSMA de consenso 2 (SEQ ID NO:8) é cerca de 96% homólogo às sequências de PSA humano e cerca de 94% homóloga a PSA de *M. mulatta*. O antígeno de PSMA de consenso 2 compreende uma sequência líder no seu N terminal. O antígeno de PSMA de consenso 2 também difere das sequências de PSA humano nos aminoácidos 21, 31, 32, 49, 64, 75, 96, 128, 174, 240, 337, 367, 492, 516, 565, 586, 630, 641, 670, 677, 25 680, 750 e 751 da SEQ ID NO:8.

O antígeno STEAP de consenso 1 (SEQ ID NO:10) é cerca de 94% homólogo a algumas sequências de STEAP humano e cerca de 99% homólogo a outras sequências de STEAP humana. O antígeno STEAP de consenso 1 (SEQ ID NO:10) é também cerca de 94% homóloga a PSMA de *M. mulatta*.

30 O antígeno STEAP de consenso 2 (SEQ ID NO:12) é cerca de 88% homólogo a algumas sequências de STEAP humano e cerca de 94% homólogo a outras sequências de STEAP humana. O antígeno STEAP de consenso 2 (SEQ ID NO:12) é também cerca de

94% homólogo a PSMA de *M. mulatta*. O antígeno STEAP de consenso 2 compreende uma sequência líder no seu N terminal.

O antígeno PSCA de consenso (SEQ ID NO:14) é cerca de 87% homólogo a PSCA humano. O antígeno PSCA de consenso (SEQ ID NO:14) difere de PSCA humano por
5 inclusão de uma sequência líder no seu N terminal.

Proteínas podem ter sequências 98% homólogas à sequência de Antígeno de Consenso de PSA 1 (SEQ ID NO:2), sequência de Antígeno de Consenso de PSA 2 (SEQ ID NO:4), sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 1 (SEQ ID NO:6), sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 2 (SEQ ID NO:8), sequência de Antígeno de Consenso
10 de STEAP 1 (SEQ ID NO:10), sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 2 (SEQ ID NO:12) ou sequência de Antígeno de Consenso de PSCA (SEQ ID NO:14).

Proteínas podem ter sequências 99% homólogas à sequência de Antígeno de Consenso de PSA 1 (SEQ ID NO:2), sequência de Antígeno de Consenso de PSA 2 (SEQ ID NO:4), sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 1 (SEQ ID NO:6), sequência de
15 Antígeno de Consenso de PSMA 2 (SEQ ID NO:8), sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 1 (SEQ ID NO:10), sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 2 (SEQ ID NO:12) ou sequência de Antígeno de Consenso de PSCA (SEQ ID NO:14).

Como observado acima, algumas modalidades compreendem uma sequência líder no N terminal. Em algumas modalidades, a sequência líder é uma sequência líder de IgE
20 que é SEQ ID NO:16. Em algumas modalidades das sequências de proteínas fornecidas aqui, SEQ ID NO:16 é removida da mesma. Do mesmo modo, em algumas modalidades das sequências de ácidos nucleicos fornecidas, SEQ ID NO:15 (que codifica SEQ ID NO:16) é removida da mesma.

Assim, algumas modalidades se relacionam a proteínas que compreendem um
25 peptídeo sinal ligado à SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, ou SEQ ID NO:10 no lugar da metionina N terminal estabelecida na reivindicação (a sequência de codificação do peptídeo sinal tipicamente inclui um códon de partida que codifica uma metionina N terminal). Algumas modalidades se relacionam a uma proteína que compreende um peptídeo sinal ligado ao aminoácido 19-131 da SEQ ID NO:14. Algumas modalidades se
30 relacionam a proteínas que compreendem um peptídeo sinal ligado à proteína 98% homóloga à SEQ ID NO:2 desde que os aminoácidos 69, 78, 80, 82, 102, 110, 137, 139, 165, 189, 203, 220, 232 e 248 da SEQ ID NO:2 sejam conservados. Algumas modalidades se relacionam a proteínas que compreendem um peptídeo sinal ligado à proteína 98%

homóloga à SEQ ID NO:6 desde que os aminoácidos 14, 15, 32, 47, 58, 79,111, 157, 223, 320, 350, 475, 499, 569, 613, 624, 653, 660, 663, 733 e 734 da SEQ ID NO:6 sejam conservados. Algumas modalidades se relacionam a proteínas que compreendem um peptídeo sinal ligado à proteína 98% homóloga à SEQ ID NO:10. Em cada caso em que o

5 peptídeo sinal é ligado ao N terminal o mesmo é ligado no lugar da metionina N terminal estabelecida na reivindicação (a sequência de codificação do peptídeo sinal tipicamente inclui um códon de partida que codifica uma metionina N terminal). Algumas modalidades se relacionam a uma proteína que compreende um peptídeo sinal ligado a uma proteína 98% homóloga ao aminoácido 19-131 da SEQ ID NO:14. Algumas

10 modalidades se relacionam a uma proteína que compreende um peptídeo sinal ligado a um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:2 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 256 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:2, desde que os aminoácidos 69, 78, 80, 82, 102, 110, 137, 139, 165, 189, 203, 220, 232 e 248 da SEQ ID NO:2 sejam conservados. Algumas modalidades se relacionam a uma proteína que compreende um

15 peptídeo sinal ligado a um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:6 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 735 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:6, desde que os aminoácidos 14, 15, 32, 47, 58, 79,111, 157, 223, 320, 350, 475, 499, 569, 613, 624, 653, 660, 663, 733 e 734 da SEQ ID NO:6 sejam conservados. Algumas modalidades se relacionam a uma proteína que compreende um peptídeo sinal ligado a um

20 fragmento imunogênico da SEQ ID NO:10 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 333 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:10. Algumas modalidades se relacionam a uma proteína que compreende um peptídeo sinal ligado à proteína que tem um peptídeo sinal ligado a um fragmento imunogênico de aminoácidos 19-131 da SEQ ID NO:14, o fragmento compreendendo pelo menos 110 resíduos de aminoácidos da SEQ ID

25 NO:14.

3. Sequências Genéticas, Constructos e Plasmídeos

As moléculas de ácido nucleico que codificam as sequências de aminoácidos de consenso foram geradas para otimizar a estabilidade e a expressão em humanos. A seleção de códon foi determinada com base, *inter alia*, em um esforço para minimizar as interações

30 intramoleculares e a formação da estrutura secundária, bem como no uso de códons que resultam na expressão melhorada. As vacinas podem compreender uma ou mais sequências de ácidos nucleicos que codificam uma ou mais das versões de consenso das proteínas imunogênicas selecionadas a partir deste grupo de sequências geradas para otimizar a

estabilidade e a expressão em humanos. As sequências de ácidos nucleicos que incorporam a sequência de codificação para o líder de IgE na extremidade 5' da sequência de ácido nucleico de codificação de consenso, otimizada, foram geradas cujas proteínas codificadas tendo a sequência líder de IgE no terminal N da sequência de aminoácidos de consenso.

5 Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o líder de IgE é a SEQ ID NO: 15

As sequências de ácidos nucleicos são fornecidas as quais codificam a sequência de Antígeno de Consenso de PSA 1 (sequência de proteína SEQ ID NO:2; sequência de ácidos nucleicos SEQ ID NO:1), sequência de Antígeno de Consenso de PSA 2 (sequência de proteína SEQ ID NO:4; sequência de ácidos nucleicos SEQ ID NO:3), sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 1 (sequência de proteína SEQ ID NO:6; sequência de ácidos nucleicos tendo nucleotídeos 1-2250 da SEQ ID NO:5), sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 2 (sequência de proteína SEQ ID NO:8; sequência de ácidos nucleicos tendo nucleotídeos 1-2301 da SEQ ID NO:7), sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 1 (sequência de proteína SEQ ID NO:10; sequência de ácidos nucleicos SEQ ID NO:9), sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 2 (sequência de proteína SEQ ID NO:12; sequência de ácidos nucleicos SEQ ID NO:11) ou sequência de Antígeno de Consenso de PSCA (sequência de proteína SEQ ID NO:14; sequência de ácidos nucleicos SEQ ID NO:13). A sequência de ácidos nucleicos SEQ ID NO:5 que codifica a sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 1 compreende, além do PSMA que codifica os nucleotídeos, um adicional de 9 códons (27 nucleotídeos) imediatamente antes dos códons de parada que codificam o HA Tag (SEQ ID NO:32), não mostrado na SEQ ID NO:6. O HA Tag é a sequência de peptídeo que corresponde a um epítopo de influenza útil, para entre outras coisas, detectar a expressão de proteína usando anticorpos anti-HA Tag comercialmente disponíveis. SEQ ID NO:5 codifica a SEQ ID NO:6 mais um adicional de 9 sequências de aminoácidos SEQ ID NO:32 ligadas no seu N terminal ao C terminal da SEQ ID NO:6. Em algumas modalidades, o antígeno de Consenso PSMA-1 é codificado pela SEQ ID NO:5 e compreende as proteínas tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:6 ligada em seu C terminal para o N terminal da SEQ ID NO:32. Em algumas modalidades, o antígeno de Consenso PSMA-1 é codificado pelos nucleotídeos 1-2250 da SEQ ID NO:5 e compreende as proteínas tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:6. A sequência de codificação tendo nucleotídeos 1-2250 da SEQ ID NO:5 tem um ou mais códons de parada em sua extremidade 3'. A sequência de ácidos nucleicos SEQ ID

NO:7 que codifica a sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 2 compreende, em
adição aos nucleotídeos que codificam o sinal de IgE ligado ao PSMA, a proteína mais um
adicional de 9 códons (27 nucleotídeos) imediatamente antes dos códons de parada que
codificam o HA Tag (SEQ ID NO:32), não mostrado na SEQ ID NO:8. SEQ ID NO:7
5 codifica a SEQ ID NO:8 mais um adicional de 9 sequências de aminoácidos SEQ ID
NO:32 ligadas no seu N terminal ao C terminal da SEQ ID NO:8. Em algumas
modalidades, o antígeno de Consenso de PSMA-2 é codificado pela SEQ ID NO:7 e
compreende as proteínas tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:8 ligada em
seu C terminal para o N terminal da SEQ ID NO:32. Em algumas modalidades, o antígeno
10 de Consenso de PSMA-2 é codificado pelos nucleotídeos 1-2301 da SEQ ID NO:7 e
compreende as proteínas tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:8. A
sequência de codificação tendo os nucleotídeos 1-2301 da SEQ ID NO:7 tem um ou mais
códon de parada em sua extremidade 3'.

As moléculas de ácido nucleico isolado podem codificar as proteínas que têm
15 sequências 98% homóloga à sequência de Antígeno de Consenso de PSA 1 (SEQ ID
NO:2), desde que os aminoácidos 69, 78, 80, 82, 102, 110, 137, 139, 165, 189, 203, 220,
232 e 248 da SEQ ID NO:2 sejam conservados, sequência de Antígeno de Consenso de
PSA 2 (SEQ ID NO:4), desde que os aminoácidos 21, 86, 127, 129, 154, 156, 182, 195,
206, 218, 220, 237, 249, 255, 265, 271 e 275 da SEQ ID NO:4 sejam conservados,
20 sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 1 (SEQ ID NO:6), desde que os
aminoácidos 14, 15, 32, 47, 58, 79, 111, 157, 223, 320, 350, 475, 499, 569, 613, 624, 653,
660, 663, 733 e 734 da SEQ ID NO:6 sejam conservados, sequência de Antígeno de
Consenso de PSMA 2 (SEQ ID NO:8), desde que os aminoácidos 21, 31, 32, 49, 64, 75,
96, 128, 174, 240, 337, 367, 492, 516, 565, 586, 630, 641, 670, 677, 680, 750 e 751 da
25 SEQ ID NO:8 sejam conservados, sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 1 (SEQ
ID NO:10), sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 2 (SEQ ID NO:12) ou
sequência de Antígeno de Consenso de PSCA (SEQ ID NO:14).

As moléculas de ácido nucleico isolado podem codificar proteínas que têm
sequências 99% homólogas à sequência de Antígeno de Consenso de PSA 1 (SEQ ID
30 NO:2), desde que os aminoácidos 69, 78, 80, 82, 102, 110, 137, 139, 165, 189, 203, 220,
232 e 248 da SEQ ID NO:2 sejam conservados, sequência de Antígeno de Consenso de
PSA 2 (SEQ ID NO:4), desde que os aminoácidos 21, 86, 127, 129, 154, 156, 182, 195,
206, 218, 220, 237, 249, 255, 265, 271 e 275 da SEQ ID NO:4 sejam conservados,

sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 1 (SEQ ID NO:6), desde que os aminoácidos 14, 15, 32, 47, 58, 79,111, 157, 223, 320, 350, 475, 499, 569, 613, 624, 653, 660, 663, 733 e 734 da SEQ ID NO:6 sejam conservados, sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 2 (SEQ ID NO:8), desde que os aminoácidos 21, 31, 32, 49, 64, 75, 96, 128, 174, 240, 337, 367, 492, 516 , 565, 586, 630, 641, 670, 677, 680, 750 e 751 da SEQ ID NO:8 sejam conservados, sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 1 (SEQ ID NO:10), sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 2 (SEQ ID NO:12) ou sequência de Antígeno de Consenso de PSCA (SEQ ID NO:14).

As moléculas de ácido nucleico isolado podem codificar proteínas que têm sequências 98% homólogas à sequência que codifica a sequência de Antígeno de Consenso de PSA 1 (SEQ ID NO:1), sequência de Antígeno de Consenso de PSA 2 (SEQ ID NO:3), sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 1 (SEQ ID NO:5 ou preferencialmente, nucleotídeos 1-2250 da SEQ ID NO:5), sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 2 (SEQ ID NO:7 ou preferencialmente, nucleotídeos 1-2301 da SEQ ID NO:7), sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 1 (SEQ ID NO:9), sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 2 (SEQ ID NO:11) ou sequência de Antígeno de Consenso de PSCA (SEQ ID NO:13).

As moléculas de ácido nucleico isolado podem codificar proteínas que têm sequências 99% homólogas à sequência que codifica a sequência de Antígeno de Consenso de PSA 1 (SEQ ID NO:1), sequência de Antígeno de Consenso de PSA 2 (SEQ ID NO:3), sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 1 (SEQ ID NO:5 ou, preferencialmente, nucleotídeos 1-2250 da SEQ ID NO:5), sequência de Antígeno de Consenso de PSMA 2 (SEQ ID NO:7 ou, preferencialmente, nucleotídeos 1-2301 da SEQ ID NO:7), sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 1 (SEQ ID NO:9), sequência de Antígeno de Consenso de STEAP 2 (SEQ ID NO:11) ou sequência de Antígeno de Consenso de PSCA (SEQ ID NO:13).

As moléculas de ácido nucleico isolado podem codificar proteínas que compreendem uma sequência líder no N terminal. Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico podem codificar a sequência líder de IgE que é SEQ ID NO:16. Em algumas modalidades as moléculas de ácido nucleico isolado podem codificar proteínas que compreendem um peptídeo sinal ligado à SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, ou SEQ ID NO:10 no lugar da metionina N terminal estabelecida na reivindicação (a sequência de codificação do peptídeo sinal tipicamente inclui um códon de partida que codifica uma

metionina N terminal). Em algumas modalidades as moléculas de ácido nucleico isolado podem codificar proteínas que compreendem um peptídeo sinal ligado ao aminoácido 19-131 da SEQ ID NO:14. Em algumas modalidades as moléculas de ácido nucleico isolado podem codificar proteínas que compreendem um peptídeo sinal ligado à proteína 98% homóloga à SEQ ID NO:2 desde que os aminoácidos 69, 78, 80, 82, 102, 110, 137, 139, 165, 189, 203, 220, 232 e 248 da SEQ ID NO:2 sejam conservados. Em algumas modalidades as moléculas de ácido nucleico isolado podem codificar proteínas que compreendem um peptídeo sinal ligado à proteína 98% homóloga à SEQ ID NO:6 desde que os aminoácidos 14, 15, 32, 47, 58, 79,111, 157, 223, 320, 350, 475, 499, 569, 613, 624, 653, 660, 663, 733 e 734 da SEQ ID NO:6 sejam conservados. Em algumas modalidades as moléculas de ácido nucleico isolado podem codificar proteínas que compreendem um peptídeo sinal ligado à proteína 98% homóloga à SEQ ID NO:10. No caso em que a sequência de codificação para um peptídeo sinal é fornecida, o peptídeo sinal é ligado à sequência de peptídeos no lugar da metionina N terminal estabelecida nas sequências mostradas (a sequência de codificação do peptídeo sinal tipicamente inclui um códon de partida que codifica uma metionina N terminal). Em algumas modalidades as moléculas de ácido nucleico isolado podem codificar proteínas que compreendem um peptídeo sinal ligado a uma proteína 98% homóloga ao aminoácido 19-131 da SEQ ID NO:14. Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico isolado podem codificar proteínas que compreendem um peptídeo sinal ligado a um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:2 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 256 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:2, desde que os aminoácidos 69, 78, 80, 82, 102, 110, 137, 139, 165, 189, 203, 220, 232 e 248 da SEQ ID NO:2 sejam conservados. Em algumas modalidades as moléculas de ácido nucleico isolado podem codificar proteínas que compreendem um peptídeo sinal ligado a um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:6 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 735 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:6, desde que os aminoácidos 14, 15, 32, 47, 58, 79,111, 157, 223, 320, 350, 475, 499, 569, 613, 624, 653, 660, 663, 733 e 734 da SEQ ID NO:6 sejam conservados. Em algumas modalidades as moléculas de ácido nucleico isolado podem codificar proteínas que compreendem um peptídeo sinal ligado a um fragmento imunogênico da SEQ ID NO:10 compreendendo aminoácidos correspondendo a pelo menos 333 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:10. Em algumas modalidades as moléculas de ácido nucleico isolado podem codificar proteínas que compreendem um peptídeo sinal ligado à

proteína que tem um peptídeo sinal ligado a um fragmento imunogênico de aminoácidos 19-131 da SEQ ID NO:14, o fragmento compreendendo pelo menos 110 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO:14.

São fornecidos aqui constructos genéticos que podem compreender uma sequência
5 de ácidos nucleicos que codifica o antígeno de próstata de consenso aqui divulgado, incluindo sequências da proteína de consenso, sequências homólogas às sequências da proteína de consenso, fragmentos de sequências de proteínas de consenso e as sequências homólogas a fragmentos de sequências de proteínas de consenso. O constructo genético pode estar presente na célula como uma molécula extracromossômica funcional. O
10 constructo genético pode ser minicromossoma linear incluindo centrômero, telômeros ou plasmídeos ou cosmídeos.

O constructo genético pode também ser parte de um genoma de um vetor viral recombinante, incluindo adenovírus recombinante, adenovírus recombinante associado a vírus, e vaccinia recombinante. O constructo genético pode ser parte do material genético
15 em micro-organismos vivos atenuados ou vetores microbianos recombinantes que vivem nas células.

Os constructos genéticos podem compreender elementos reguladores para a expressão do gene das sequências de codificação do ácido nucleico. Os elementos de regulação podem ser um promotor, um intensificador de um códon de iniciação, um códon
20 de parada, ou um sinal de poliadenilação.

As sequências de ácidos nucleicos podem constituir um constructo genético que pode ser um vetor. O vetor pode ser capaz de expressar um antígeno na célula de um mamífero com uma quantidade eficaz para induzir uma resposta imune no mamífero. O vetor pode ser recombinante. O vetor pode compreender ácido nucleico heterólogo que
25 codifica o antígeno. O vetor pode ser um plasmídeo. O vetor pode ser útil para transfectar células com o ácido nucleico que codifica um antígeno, cuja célula hospedeira transformada é cultivada e mantida sob condições em que a expressão do antígeno ocorre.

Em algumas modalidades, as sequências de codificação para um antígeno de próstata de consenso único é fornecida em um vetor único. Em algumas modalidades, as
30 sequências de codificação para um antígeno de próstata de consenso múltiplo são fornecidas em um único vetor. Em algumas modalidades, são fornecidas composições compreendendo sequências que codificam um antígeno de próstata de consenso múltiplo em vários vetores, quer um antígeno por vetor ou múltiplos antígenos por vetor.

Em algumas modalidades, as sequências de codificação para dois ou mais antígenos de próstata de consenso diferentes podem ser fornecidos sobre um único vetor. Em algumas modalidades, as sequências de codificação podem ter uma única expressão controladora de promotores separada. Em algumas modalidades, as sequências de codificação podem ter uma única expressão controladora de promotores com uma sequência de IRES separando a sequência de codificação. A presença da sequência de IRES resulta na tradução separada do produto de transcrição. Em algumas modalidades, as sequências de codificação podem ter uma única expressão controladora de promotores com a sequência de codificação que codifica uma sequência de peptídeos de clivagem proteolítica que separa sequências de codificação dos antígenos. Um produto de tradução único é produzido o qual é, em seguida, processado pela protease que reconhece o sítio de clivagem da protease para gerar moléculas de proteínas separadas. O sítio de clivagem de protease usado é normalmente reconhecido por uma protease endogenamente presente na célula onde ocorre a expressão. Em algumas modalidades, uma sequência de codificação separada para uma protease pode ser incluída para fornecer a produção da protease necessária para processar o produto de tradução da poliproteína. Em algumas modalidades, os vetores compreendem sequências de codificação para um, dois, três, quatro, cinco, seis ou todos os sete antígenos de próstata de consenso.

Em todos e quaisquer casos aqui estabelecidos, as sequências de codificação podem ser otimizadas para a estabilidade e altos níveis de expressão. Em alguns casos, os códons são selecionados para reduzir a formação da estrutura secundária do RNA, como as que se formaram devido à ligação intramolecular.

O vetor pode compreender ácido nucleico heterólogo que codifica um antígeno e pode compreender ainda um códon de iniciação, o qual pode estar a montante da sequência de codificação de antígeno, e um códon de parada, que pode estar a jusante da sequência de codificação de antígeno. O códon de iniciação e de terminação pode estar na estrutura com a sequência de codificação de antígeno. O vetor pode também incluir um promotor que está operativamente ligado à sequência de codificação de antígeno. O promotor operativamente ligado à sequência de codificação de antígeno pode ser um promotor do vírus símio 40 (SV40), um promotor de vírus de tumor mamário de camundongo (MMTV), um promotor do vírus da imunodeficiência humana (HIV), tal como o promotor de repetição terminal longa (LTR) do vírus de imunodeficiência bovina (BIV), um promotor do vírus Moloney, um promotor do vírus de leucose aviária (ALV), um promotor

de citomegalovirus (CMV), tal como o promotor precoce imediato de CMV, o promotor do vírus Epstein Barr (EBV), ou um promotor do vírus de sarcoma de Rous (RSV). O promotor também pode ser um promotor de um gene humano, tal como actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana, ou metalotioneína humana. O promotor também pode ser um promotor específico do tecido, tal como um músculo ou promotor específico de pele, natural ou sintético. Exemplos de tais promotores são descritos na publicação de pedido de patente US 20040175727, os conteúdos do qual sendo aqui incorporados na sua totalidade.

O vetor também pode compreender um sinal de poliadenilação, que pode estar à jusante da sequência de codificação do antígeno de próstata de consenso. O sinal de poliadenilação pode ser um sinal de poliadenilação de SV40, sinal de poliadenilação de LTR, hormônio de crescimento bovino (bGH), sinal de poliadenilação bovina, sinal de poliadenilação de hormônio de crescimento humano (hGH), ou um sinal de poliadenilação de β -globina humana. O sinal de poliadenilação de SV40 pode ser um sinal de poliadenilação de um vetor pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA).

O vetor também pode compreender um intensificador à montante da sequência de codificação do antígeno de próstata de consenso. O intensificador pode ser necessário para a expressão de DNA. O intensificador pode ser actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana ou um intensificador viral, tal como um de CMV, HA, RSV ou EBV. Os intensificadores da função de polinucleotídeo são descritos nas Patentes US 5.593.972, 5.962.428, e WO94/016737, os conteúdos de cada uma sendo totalmente incorporados por referência.

O vetor pode também compreender uma origem de replicação de mamífero de modo a manter o vetor extracromossomicamente e produzir múltiplas cópias do vetor em uma célula. O vetor pode ser pVAX1, pCEP4 ou pREP4 da Invitrogen (San Diego, CA), que pode compreender a origem de replicação do vírus Epstein Barr e região codificadora de antígeno nuclear EBNA-1, a qual pode produzir a replicação episomal de alta cópia sem integração. O esqueleto do vetor pode ser pAV0242. O vetor pode ser um tipo 5 (Ad5) de adenovírus de replicação defeituoso.

O vetor também pode compreender uma sequência reguladora, que pode ser bem adequada para a expressão do gene em uma célula de mamífero ou de humano na qual o vetor é administrado. A sequência de codificação do antígeno de próstata de consenso pode

incluir um códon, que pode permitir a transcrição eficiente da sequência de codificação na célula hospedeira.

O vetor pode ser pSE420 (Invitrogen, San Diego, Califórnia), o qual pode ser usado para a produção de proteína em *Escherichia coli* (E. coli). O vetor também pode ser
5 pYES2 (Invitrogen, San Diego, Califórnia), o qual pode ser usado para a produção de proteínas em amostras de leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*. O vetor também pode ser o sistema de expressão de baculovírus completo MAXBAC™ (Invitrogen, San Diego, Califórnia), o qual pode ser usado para a produção de proteínas em células de insetos. O vetor também pode ser pcDNA I ou pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Califórnia), o qual
10 pode ser usado para a produção de proteínas em células de mamíferos, tais como células de ovário de hamster chinês (CHO). O vetor pode ser vetores ou sistemas de expressão para produzir a proteína por meio de técnicas de rotina e materiais de partida prontamente disponíveis, incluindo Sambrook et al., Molecular Cloning Laboratory Manual, Segunda Ed., Cold Spring Harbor (1989), que é totalmente incorporada por referência.

15 As vacinas podem compreender um ou mais dos antígenos de próstata aqui definidos e/ou as vacinas podem compreender uma ou mais sequências de ácidos nucleicos que codificam um ou mais dos antígenos de próstata de consenso selecionados a partir deste grupo. As vacinas podem compreender um ou mais dos antígenos de próstata de consenso aqui definidos em combinação com outras proteínas de próstata imunogênicas
20 com sequências diferentes das sequências de consenso aqui divulgadas, incluindo sequências nativas e/ou as vacinas podem compreender uma ou mais sequências de ácidos nucleicos que codificam um ou mais dos antígenos de próstata de consenso selecionados deste grupo em combinação com moléculas de ácido nucleico que codificam outros antígenos da próstata com sequências diferentes das sequências de consenso aqui
25 divulgadas.

Embora não sendo limitados pela teoria científica, uma vacina que pode ser usada para induzir uma resposta imune (humoral, celular, ou ambas) amplamente contra células de câncer de próstata pode compreender uma ou mais das seguintes sequências de ácidos nucleicos que codificam uma ou mais proteínas selecionadas a partir do grupo que consiste
30 em: consenso, antígeno de PSA 1, consenso, antígeno de PSA 2, consenso, antígeno de PSMA 1, consenso, antígeno de PSMA 2, consenso, antígeno STEAP de consenso 1, antígeno STEAP consenso 2, e antígeno PSCA de consenso 1. As sequências de

codificação podem também incluir aquelas aqui fornecidas que compreendem sequências homólogas, fragmentos, e sequências homólogas de fragmentos.

Algumas modalidades fornecem métodos para gerar respostas imunes contra as células de câncer de próstata que compreendem a administração a um indivíduo com uma ou mais composições que compreendem coletivamente uma ou mais sequências de codificação ou combinações aqui descritas. Algumas modalidades fornecem métodos para vacinar profilaticamente um indivíduo contra o câncer de próstata que compreendem a administração de uma ou mais composições que compreendem coletivamente uma ou mais sequências de codificação ou combinações aqui descritas. Algumas modalidades fornecem métodos para vacinar terapêuticamente um indivíduo que tem câncer de próstata que compreendem a administração de uma ou mais composições coletivamente que compreendem uma ou mais sequências de codificação ou combinações aqui descritas.

4. Composições Farmacêuticas

São fornecidas aqui composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção que compreendem cerca de 1 nanograma a cerca de 10 mg de DNA. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção compreendem desde entre: 1) pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 100 nanogramas, ou pelo menos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995 ou 1000 microgramas, ou pelo menos 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 ou 10 mg ou mais; e 2) até e incluindo 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 100 nanogramas, ou até e incluindo 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300,

305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 5 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995, ou 1000 microgramas, ou até e incluindo 1, 5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 ou 10 mg. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção 10 compreendem cerca de 5 nanogramas a cerca de 10 mg de DNA. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção compreendem cerca de 25 nanogramas a cerca de 5 mg de DNA. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas contêm cerca de 50 nanogramas a cerca de 1 mg de DNA. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas contêm cerca de 15 15 0,1 a cerca de 500 microgramas de DNA. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas contêm cerca de 1 a cerca de 350 microgramas de DNA. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas contêm cerca de 5 a cerca de 250 microgramas de DNA. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas contêm cerca de 10 a cerca de 200 microgramas de DNA. Em algumas modalidades, as composições 20 farmacêuticas contêm cerca de 15 a cerca de 150 microgramas de DNA. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas contêm cerca de 20 a cerca de 100 microgramas de DNA. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas contêm cerca de 25 a cerca de 75 microgramas de DNA. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas contêm cerca de 30 a cerca de 50 microgramas de DNA. Em 25 algumas modalidades, as composições farmacêuticas contêm cerca de 35 a cerca de 40 microgramas de DNA. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas contêm cerca de 100 a cerca de 200 microgramas de DNA. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreende cerca de 10 microgramas a cerca de 100 microgramas de DNA. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreende 30 cerca de 20 microgramas a cerca de 80 microgramas de DNA. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreende cerca de 25 microgramas a cerca de 60 microgramas de DNA. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreende cerca de 30 nanogramas a cerca de 50 microgramas de DNA. Em algumas modalidades, a

composição farmacêutica compreende cerca de 35 nanogramas a cerca de 45 microgramas de DNA. Em algumas modalidades preferidas, as composições farmacêuticas contêm cerca de 0,1 a cerca de 500 microgramas de DNA. Em algumas modalidades preferidas, as composições farmacêuticas contêm cerca de 1 a cerca de 350 microgramas de DNA. Em algumas modalidades preferidas, as composições farmacêuticas contêm cerca de 25 a cerca de 250 microgramas de DNA. Em algumas modalidades preferidas, as composições farmacêuticas contêm cerca de 100 a cerca de 200 microgramas de DNA.

As composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção são formuladas de acordo com o modo de administração a ser usado. Nos casos em que as composições farmacêuticas injetáveis são composições farmacêuticas, que são estéreis, livres de pirogênios e livres de partículas. Uma formulação isotônica é, preferencialmente, usada. Geralmente, os aditivos para a isotonicidade podem incluir cloreto de sódio, dextrose, manitol, sorbitol e lactose. Em alguns casos, as soluções isotônicas, tais como salina tamponada com fosfato são preferidas. Estabilizadores incluem gelatina e albumina. Em algumas modalidades, um agente de vasoconstrição é adicionado à formulação.

Preferencialmente, a composição farmacêutica é uma vacina e, mais preferencialmente, uma vacina de DNA.

A vacina pode ser uma vacina de DNA. A vacina de DNA pode compreender uma pluralidade dos mesmos ou diferentes plasmídeos contendo sequências de ácidos nucleicos que codificam um ou mais dos antígenos de próstata de consenso. A vacina de DNA pode compreender uma ou mais sequências de ácidos nucleicos que codificam um ou mais dos antígenos de próstata de consenso. Quando a vacina de DNA compreende sequências de codificação de mais de um antígeno de próstata de consenso todas essas sequências podem estar presentes em um único plasmídeo, ou cada uma destas sequências pode estar presente em um diferente plasmídeo.

Em algumas modalidades, as vacinas podem compreender sequências de ácidos nucleicos que codificam um ou mais dos antígenos de próstata de consenso em combinação com um ou mais dos antígenos de próstata de consenso.

As vacinas de DNA são descritas nas Patentes US 5.593.972, 5.739.118, 5.817.637, 5.830.876, 5.962.428, 5.981.505, 5.580.859, 5.703.055, e 5.676.594, que são aqui incorporadas na totalidade por referência. A vacina de DNA pode ainda incluir elementos ou reagentes que inibem a mesma de integração no cromossoma. A vacina pode ser um RNA do antígeno de próstata. A vacina de RNA pode ser introduzida na célula.

A vacina pode ser uma vacina recombinante que compreende o constructo genético ou antígeno descrito acima. A vacina pode também compreender um ou mais antígenos de próstata de consenso na forma de uma ou mais subunidades da proteína, ou uma ou mais partículas virais atenuadas compreendendo um ou mais antígenos de próstata de consenso.

5 As vacinas atenuadas podem ser vacinas vivas atenuadas, vacinas mortas e vacinas que utilizam vetores recombinantes para distribuir genes estranhos que codificam um ou mais antígenos de próstata de consenso, e assim como vacinas de glicoproteína e subunidades. Exemplos de vacinas vivas atenuadas, aqueles que utilizam vetores recombinantes para distribuir antígenos de próstata, vacinas de subunidades e vacinas glicoproteína estão
10 descritos nas Patentes US 4.510.245, 4.797.368, 4.722.848, 4.790.987, 4.920.209, 5.017.487, 5.077.044, 5.110.587, 5.112.749, 5.174.993, 5.223.424; 5.225.336, 5.240.703, 5.242.829, 5.294.441, 5.294.548, 5.310.668, 5.387.744, 5.389.368, 5.424.065, 5.451.499; 5,453,3 64; 5.462.734, 5.470.734, 5.474.935, 5.482.713, 5.591.439, 5.643.579, 5.650.309, 5.698.202, 5.955.088, 6.034.298, 6.042.836, 6.156.319 e 6.589.529, que são aqui
15 incorporadas por referência.

A vacina fornecida pode ser usada para induzir as respostas imunes, incluindo respostas imunes terapêuticas ou profiláticas. Os anticorpos e/ou células T assassinas podem ser gerados, os que são dirigidos para o antígeno de próstata de consenso. Tais anticorpos e células podem ser isolados.

20 A vacina pode compreender ainda um excipiente farmacologicamente aceitável. O excipiente farmacologicamente aceitável pode ser de moléculas funcionais, como veículos, adjuvantes, carreadores, ou diluentes. O excipiente farmacologicamente aceitável pode ser um agente facilitador de transfecção, que pode incluir agentes ativos de superfície, tais como complexos imunoestimulantes (ISCOMS), adjuvante incompleto de Freund, análogo
25 de LPS incluindo monofosforil-lipídeo A, peptídeos de muramil, análogos de quinona, vesículas tais como esqualeno e esqualano, ácido hialurônico, lipídeos, lipossomas, os íons de cálcio, as proteínas virais, poliânions, policátions ou nanopartículas, ou outros agentes facilitadores de transfecção conhecidos.

O agente facilitador de transfecção é um poliânion, policátion, incluindo poli-L-
30 glutamato (LGS) ou lipídeos. O agente facilitador de transfecção é poli-L-glutamato, e mais preferencialmente, o poli-L-glutamato está presente na vacina, a uma concentração inferior a 6 mg/ml. O agente facilitador de transfecção também pode incluir agentes ativos de superfície tais como complexos imuno-estimulantes (ISCOMS), adjuvante incompleto

de Freund, análogo de LPS incluindo monofosforil-lipídeo A, peptídeos de muramil, análogos de quinona e vesículas tais como esqualeno e esqualeno e ácido hialurônico, pode também ser usados administrados em conjunto com o constructo genético. Em algumas modalidades, as vacinas de vetor de DNA podem também incluir um agente facilitador de transfecção, tais como lipídeos, lipossomas, incluindo os lipossomas de lecitina ou outros lipossomas conhecidos na técnica, como uma mistura de DNA-lipossoma (ver, por exemplo, W09324640), os íons de cálcio, proteínas virais, poliânions, policátions, ou nanopartículas, ou outros agentes facilitadores de transfecção conhecidos. Preferencialmente, o agente facilitador de transfecção é um poliânion, policátion, incluindo poli-L-glutamato (LGS) ou lipídeo. A concentração do agente de transfecção da vacina é menos de 4 mg/ml, menos de 2 mg/ml, menos de 1 mg/ml, menos de 0,750 mg/ml, menos de 0,500 mg/ml, menos de 0,250 mg/ml, menos de 0,100 mg/ml, menos de 0,050 mg/ml, ou menos de 0,010 mg/ml.

O excipiente farmacologicamente aceitável pode ser um adjuvante. O adjuvante pode ser de outros genes que são expressos em plasmídeos alternativos ou são distribuídos como proteínas em combinação com o plasmídeo acima na vacina. O adjuvante pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: α -interferon (IFN- α), β -interferon (IFN- β), γ -interferon, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, fator de crescimento epidérmico (EGF), quimiocina atrativa de células-T cutâneas (CTACK), quimiocina expressa em timo epitelial (TECK), quimiocina epitelial associada à mucosa (MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80, CD86 incluindo IL-15 tendo a sequência sinal deletada e opcionalmente incluindo o peptídeo sinal de IgE. O adjuvante pode ser IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, fator de crescimento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, ou uma combinação dos mesmos.

Outros genes que podem ser adjuvantes úteis incluem aqueles que codificam: MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, L-selectina, P-selectina, E-selectina, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, fator de crescimento vascular, fator de crescimento de fibroblastos, IL-7, fator de crescimento do nervo, fator de crescimento endotelial vascular, Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspase ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel,

MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, NIK inativo, SAP K, SAP-1, JNK, genes de resposta de interferon, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Ox40, Ox40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 e fragmentos funcionais dos mesmos.

5 A vacina pode ainda compreender um agente facilitador de vacina genética como descrito no US 021.579 depositado em 1 de abril de 1994, que é totalmente incorporado por referência.

5. Métodos de Distribuição

10 É fornecido aqui um método de distribuição de formulações farmacêuticas, preferencialmente, vacinas para o fornecimento de constructos genéticos e antígeno de próstata de consenso que compreendem epítomos que os tornam imunógenos particulares eficazes contra o qual uma resposta imune a células de câncer de próstata pode ser induzida. O método de distribuição da vacina, ou vacinação, pode ser fornecido para induzir uma resposta imune terapêutica e/ou profilática. A vacina pode ser distribuída a um
15 indivíduo para modular a atividade do sistema imune de mamíferos e melhorar a resposta imune.

Mediante a distribuição da vacina ao mamífero, e assim do vetor nas células de um mamífero, as células transfectadas vão expressar e secretar a proteína de próstata de consenso correspondente. Estas proteínas secretadas, ou antígenos sintéticos, serão
20 reconhecidas pelo sistema imune, que vai montar uma resposta imune, que pode incluir: anticorpos produzidos contra antígenos, e a resposta de células-T especialmente contra o antígeno. Em alguns exemplos, um mamífero vacinado com as vacinas aqui discutidas terá um sistema imune iniciado. A vacina pode ser distribuída a um indivíduo para modular a atividade do sistema imune do indivíduo aumentando assim a resposta imune.

25 A vacina pode ser distribuída na forma de uma vacina de DNA e os métodos de distribuição de vacinas de DNA encontram-se descritos nas Patentes US 4.945.050 e 5.036.006, que são ambas incorporadas na totalidade por referência.

A vacina pode ser administrada a um mamífero para induzir uma resposta imune num mamífero. O mamífero pode ser humano, primata não humano, vaca, porco, ovelha,
30 cabra, antílope, bisões, búfalos de água, bovinos, veados, ouriços, elefantes, lhama, alpaca, camundongos, ratos, ou frangos, preferencialmente, humanos, vacas, porcos ou frangos.

a. Combinação de Tratamentos

As composições farmacêuticas, preferencialmente, as vacinas podem ser administradas em combinação com uma ou mais outras proteínas ou genes da próstata. A vacina pode ser administrada em combinação com os adjuvantes que codificam genes ou proteínas, que podem incluir: α -interferon(IFN- α), β -interferon (IFN- β), γ -interferon, IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, fator de crescimento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, L-selectina, P-selectina, E-selectina, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, fator de crescimento vascular, fator de crescimento de fibroblastos, IL-7, fator de crescimento do nervo, fator de crescimento endotelial vascular, Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspase ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, NIK inativo, SAP K, SAP-1, JNK, genes de resposta de interferon, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, O \times 40, O \times 40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, ou TAP2, ou fragmentos funcionais dos mesmos.

b. Rotas de Administração

A vacina pode ser administrada por diferentes rotas incluindo a via oral, parenteral, sublingual, transdérmica, retal, transmucosa, tópica, por inalação, por via bucal, intrapleuralmente, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, intranasal, intratecal e intra-articular, ou suas combinações. Para uso veterinário, a composição pode ser administrada como uma formulação adequadamente aceitável de acordo com a prática veterinária normal. O veterinário pode facilmente determinar o regime de dosagem e a rota de administração que seja mais apropriada para um animal em particular. A vacina pode ser administrada por seringas tradicionais, dispositivos de injeção sem agulha, “pistolas de bombardeamento de microprojéteis”, ou outros métodos físicos, tais como a eletroporação (“EP”), “método de hidrodinâmico”, ou ultrassom.

O vetor de vacina pode ser distribuído a um mamífero por várias tecnologias bem conhecidas incluindo a injeção de DNA (também referida como vacinação com DNA), com e sem a eletroporação *in vivo* com vetores recombinantes mediada por lipossomas, facilitada por nanopartículas, tais como o adenovírus recombinante, vírus associado a

adenovírus recombinante e vaccinia recombinante. O antígeno da próstata pode ser distribuído através da injeção de DNA e, juntamente com a eletroporação *in vivo*.

c. Eletroporação

A administração da vacina através de eletroporação dos plasmídeos da vacina pode ser realizada utilizando dispositivos de eletroporação, que podem ser configurados para distribuir a um tecido desejado de um mamífero um pulso de energia eficaz para fazer com que poros reversíveis se formem na membrana celular e, em algumas modalidades, o pulso de energia é uma corrente constante semelhante a uma entrada de corrente pré-estabelecida por um usuário.

Em algumas modalidades onde a eletroporação é usada, o dispositivo de eletroporação pode compreender um componente de eletroporação e um conjunto de eletrodos ou conjunto portátil. O componente de eletroporação pode incluir e incorporar um ou mais dos vários elementos dos dispositivos de eletroporação, incluindo: tratamento, gerador de forma de onda de corrente, testador de impedância, registrador de forma de onda, elemento de entrada, elemento de informação de estado, porta de comunicação, componente de memória, fonte de energia, e comutador de energia. A eletroporação pode ser realizada utilizando-se um dispositivo de eletroporação *in vivo*, por exemplo, sistema CELLECTRA® EP (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA) ou eletroporador Elgen (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA), para facilitar a transfecção de células pelo plasmídeo.

O componente de eletroporação pode funcionar como um elemento de dispositivos de eletroporação, e os outros elementos são elementos (ou componentes) separados em comunicação com o componente de eletroporação. O componente de eletroporação pode funcionar como mais do que um elemento dos dispositivos de eletroporação, os quais podem estar em comunicação com ainda outros elementos dos dispositivos de eletroporação separadas a partir do componente de eletroporação. Os elementos dos dispositivos de eletroporação existentes como partes de um dispositivo eletromecânico ou mecânico podem não ser limitados já que os elementos podem funcionar como um dispositivo ou como elementos separados, em comunicação entre si. O componente de eletroporação pode ser capaz de fornecer o pulso de energia que produz a corrente constante no tecido desejado, e inclui um mecanismo de feedback. O conjunto de eletrodos pode incluir uma matriz de eletrodos que tem uma pluralidade de eletrodos de um arranjo espacial, em que o conjunto de eletrodo recebe o pulso de energia do componente de

eletroporação e distribui a mesma para o tecido desejado através dos eletrodos. Pelo menos um da pluralidade de eletrodos é neutro durante a distribuição do pulso de energia e medidas de impedância no tecido desejado e comunica a impedância ao componente eletroporação. O mecanismo de feedback pode receber a impedância medida e pode ajustar

5 o pulso de energia fornecido pelo componente de eletroporação para manter a corrente constante.

Uma pluralidade de eletrodos pode distribuir o pulso de energia em um padrão descentralizado. A pluralidade de eletrodos pode distribuir o pulso de energia no padrão descentralizado através do controle dos eletrodos sob uma sequência programada, e uma

10 sequência programada é introduzida por um usuário para o componente de eletroporação. A sequência programada pode compreender uma pluralidade de pulsos distribuídos em sequência, em que cada pulso da pluralidade de pulsos é distribuído por pelo menos dois eletrodos ativos com um eletrodo neutro que mede a impedância, e em que um pulso posterior da pluralidade de impulsos é distribuído por um diferente de pelo menos dois

15 eletrodos ativos com um eletrodo neutro que mede a impedância.

O mecanismo de feedback pode ser realizado por hardware ou software. O mecanismo de feedback pode ser realizado por um circuito fechado analógico. O feedback ocorre a cada 50 μ s, 20 μ s, 10 μ s ou 1 μ s, mas é preferencialmente uma reação em tempo real ou instantânea (isto é, substancialmente instantânea, conforme determinado por meio

20 de técnicas disponíveis para a determinação do tempo de resposta). O eletrodo neutro pode medir a impedância do tecido desejado e comunicar a impedância para o mecanismo de feedback, e o mecanismo de feedback responde à impedância e ajusta o pulso de energia para manter a corrente constante a um valor semelhante ao da corrente pré-estabelecida. O mecanismo de feedback pode manter a corrente constante continuamente e

25 instantaneamente durante a distribuição do pulso de energia.

Os exemplos de dispositivos de eletroporação e métodos de eletroporação que podem facilitar a distribuição de vacinas de DNA da presente invenção incluem os descritos na Patente US 7.245.963 por Draghia-Akli et al., Publicação de Patente US 2005/0052630 depositada por Smith et al., Os conteúdos das quais sendo aqui incorporado

30 por referência na sua totalidade. Outros dispositivos de eletroporação e métodos eletroporação que podem ser usados para facilitar a administração das vacinas de DNA incluem aqueles fornecidos no pedido de patente copendente e de copropriedade US 11/874072, depositado em 17 de outubro de 2007, que reivindica o benefício de acordo

com 35 USC 119(e) dos Pedidos Provisórios US 60/852.149, depositado em 17 de outubro de 2006, e 60/978.982, depositado em 10 de outubro de 2007, todos as quais sendo aqui incorporados na sua totalidade.

5 A Patente US 7.245.963 de Draghia-Akli et al. descreve sistemas de eletrodos modulares e seu uso para facilitar a introdução de uma biomolécula em células de um tecido selecionado em um organismo ou planta. Os sistemas de eletrodos modulares podem compreender uma pluralidade de eletrodos de agulha; uma agulha hipodérmica, um conector elétrico que fornece uma ligação condutora de um controlador de pulsos de corrente constante programável para a pluralidade de eletrodos de agulha, e uma fonte de energia. Um operador pode compreender a pluralidade de eletrodos de agulha que é montada em uma estrutura de suporte e inseri-los firmemente no tecido selecionado em um corpo ou planta. As biomoléculas são, então, distribuídas através da agulha hipodérmica no tecido selecionado. O controlador de impulsos de corrente constante programável é ativado e os pulsos elétricos de corrente constante são aplicados à pluralidade de eletrodos de agulha. O pulso elétrico de corrente constante aplicado facilita a introdução da biomolécula na célula entre a pluralidade de eletrodos. O conteúdo total da Patente US 7.245.963 é aqui incorporado por referência.

A Publicação de Patente US 2005/0052630 depositada por Smith, et al. descreve um dispositivo de eletroporação que pode ser eficazmente usado para facilitar a introdução de uma biomolécula em células de um tecido selecionado em um organismo ou planta. O aparelho de eletroporação compreende um dispositivo eletrocínético (“dispositivo EKD”), cujo funcionamento é especificado por software ou firmware. O dispositivo EKD produz uma série de padrões de pulsos de corrente constante programáveis entre os eletrodos em uma matriz baseada no controle de usuário e entrada dos parâmetros de pulso, e permite o armazenamento e aquisição de dados de forma de onda de corrente. O dispositivo de eletroporação também compreende um disco de eletrodo substituível com uma matriz de eletrodos de agulha, um canal de injeção central para uma agulha de injeção, e um disco de guia removível. O conteúdo integral da Publicação de Patente US 2005/0052630 é aqui incorporado por referência.

30 A matriz de eletrodos e os métodos descritos na Patente US 7.245.963 e Publicação de Patente US 2005/0052630 podem ser adaptados para a penetração profunda, não só nos tecidos tais como o músculo, mas também em outros tecidos ou órgãos. Devido à configuração da matriz de eletrodos, a agulha de injeção (para distribuir a biomolécula de

escolha) também é totalmente inserida no órgão alvo, e a injeção é administrada perpendicular ao problema alvo, na área que é pré-delineada pelos eletrodos. Os eletrodos descritos na Patente US 7.245.963 e Publicação de Patente US 2005/005263 tem preferencialmente 20 mm de comprimento e calibre 21.

5 Em adição, são contemplados em algumas modalidades que incorporam dispositivos de eletroporação e seus usos, os dispositivos de eletroporação que são os descritos nas seguintes patentes: Patente US 5.273.525 concedida em 28 de dezembro de 1993, Patente US 6.110.161, concedida em 29 de agosto de 2000, 6.261.281 concedida em 17 de Julho 2001, 6.958.060 concedida em 25 de outubro de 2005, e Patente US 6939862
10 concedida em 6 de Setembro de 2005. Além disso, as patentes que abrangem a matéria em questão fornecida na Patente US 6.697.669 concedida em 24 de fevereiro de 2004, que diz respeito à distribuição de DNA utilizando qualquer de uma variedade de dispositivos, e a patente US 7.328.064 concedida em 5 de fevereiro de 2008, voltada para o método de injeção de DNA são aqui contempladas. As patentes acima são incorporadas por referência
15 na sua totalidade. Outra modalidade de um dispositivo de eletroporação para ser usado com os antígenos de câncer aqui descritos é o dispositivo EP Elgen (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA).

d. Método de Preparação de Vacina

São fornecidos aqui os métodos para a preparação dos plasmídeos de DNA que
20 compreendem as vacinas de DNA aqui discutidas. Os plasmídeos de DNA, após a etapa de subclonagem final no plasmídeo de expressão de mamífero, podem ser usados para inocular uma cultura de células em um tanque de fermentação de larga escala, utilizando-se métodos conhecidos na técnica.

Os plasmídeos de DNA para uso com os dispositivos de PE da presente invenção
25 podem ser formulados ou fabricados com uma combinação de dispositivos e técnicas conhecidas, mas preferencialmente, eles são fabricados utilizando uma técnica de fabricação de plasmídeo otimizada que está descrita em um Pedido de Patente US provisório, licenciado, copendente número de série 60/939.792, que foi depositado em 23 de Maio, 2007. Em alguns exemplos, os plasmídeos de DNA usados nestes estudos podem
30 ser formulados em concentrações maiores ou iguais a 10 mg/ml. As técnicas de fabricação também incluem ou incorporam diversos equipamentos e protocolos que são vulgarmente conhecidos dos versados na técnica, além daqueles descritos na US 60/939.792, incluindo aqueles descritos na patente licenciada, Patente US 7.238.522, expedida em 3 de julho de

2007. O pedido e a patente acima mencionados, o US 60/939.792 e a Patente US 7.238.522, respectivamente, são aqui incorporados na sua totalidade.

EXEMPLOS

A presente invenção é ainda ilustrada nos Exemplos seguintes. Deve ser entendido
5 que estes Exemplos, embora indiquem modalidades preferidas da invenção, são dados apenas a título de ilustração. A partir da discussão acima e destes exemplos, um versado na técnica pode determinar as características essenciais da presente invenção, e sem se afastar do espírito e escopo da mesma, pode fazer várias alterações e modificações da invenção para adaptá-la a vários usos e condições. Assim, várias modificações da invenção em
10 adição às apresentadas e descritas aqui serão evidentes para aqueles versados na técnica a partir da descrição anterior. Essas modificações também se destinam fazer parte do escopo das reivindicações anexas.

EXEMPLO 1

Imunógenos de consenso para PSA e PSMA foram projetados a partir das
15 sequências humanas e Macaca completas disponíveis no GenBank como previamente descrito em Laddy, D.J., Yan, J., Corbitt, N., Kobasa, D., Kobinger, G.P., Weiner, D.B. (2007). Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza. Vaccine. 25,2984-2989, and Laddy, D.J., Yan, J., Kutzler, M., Kobasa, D., Kobinger, G.P., Khan, A.S., Greenhouse, J., Sardesai, N.Y., Draghia-Akli, R., Weiner, D.B. (2008).
20 Heterosubtypic Protection against Pathogenic Human and Avian Influenza Viruses via In Vivo Electroporation of Synthetic Consensus DNA Antigens. PLoS ONE. 3,e2517.

As sequências de antígenos de consenso foram sintetizadas por GeneScript (Piscataway, NJ). Um HA tag foi incluído na extremidade C-terminal da sequência do antígeno. As sequências de antígeno foram otimizadas para a estabilidade do mRNA e de
25 uso de códons em humanos. As sequências finais foram clonadas nos sítios BamHI e XhoI do vetor pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Um antígeno PSA de consenso 1 (SEQ ID NO: 2) foi gerado. Esta sequência, que compreende 261 aminoácidos, foi comparada com cada uma das sequências de PSA apresentadas na Tabela 1. As sequências de PSA usados incluem duas sequências
30 humanas, uma sequência de *M. fascicularis*, e uma sequência de *M. mulatta*. A Tabela 1 inclui a SEQ ID NO: e número de acesso para cada sequência usada na comparação com antígeno PSA de consenso 1 (SEQ ID NO: 2).

Tabela 1

<u>SEQ ID NO</u>	<u>Espécies e Proteína</u>	<u>Número de acessão</u>	<u>Número de aminoácidos</u>	<u>% de homologia com a SEQ ID NO:2</u>
17	PSA isol de <i>H. sapiens</i>	NP001639.1	261	91
18	PSA de <i>H. sapiens</i>	gbAAA60193.1	262	91
19	KLK3 de <i>M. fascicularis</i>	Q6DT45.1	261	95
20	PSA de <i>M. mulatta</i>	NP001036241.1 p	261	96

Um alinhamento de sequência múltipla de Sequências de PSA de *H. Sapiens* (SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:18), *M. mulatta* (SEQ ID NO:20) e *M. facicularis* (SEQ ID NO:19) foi gerado com o antígeno PSA de consenso 1 (SEQ ID NO:2). KLK3 (calicreína 3) é o gene que codifica PSA e é pseudônimo com PSA. O antígeno PSA 1 é 91% homólogo à sequência de proteínas de PSA de comprimento completo de *H. sapiens*, 96% homólogo à de *M. mulatta* e 95% homólogo à de *M. facicularis*.

EXEMPLO 2

A antígeno PSA de consenso 2 (SEQ ID NO:4) foi gerado. Esta sequência, que compreende 279 aminoácidos incluindo uma sequência líder de IgE, foi comparada com cada uma das sequências de PSA estabelecidas na Tabela 2. As sequências de PSA usadas incluem duas sequências humanas, uma sequência de *M. fascicularis*, e uma sequência de *M. mulatta*. A Tabela 2 inclui a SEQ ID NO: e Número de acessão para cada sequência usada em comparação com o antígeno PSA de consenso 2 (SEQ ID NO:4).

Table 2

<u>SEQ ID NO</u>	<u>Espécies e proteína</u>	<u>Número de acessão</u>	<u>Número de aminoácidos</u>	<u>% de homologia com a SEQ ID NO:4</u>
17	PSA isol de <i>H. sapiens</i>	NP001639.1	261	91
18	PSA de <i>H. sapiens</i>	gbAAA60193.1	262	90
19	KLK3 de <i>M. fascicularis</i>	Q6DT45.1	261	95

21 PSA de *M. mulatta* AAZ82258.1 244 95

Um alinhamento de sequência múltipla de Sequências de PSA de *H. Sapiens* (SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:18), *M. mulatta* (SEQ ID NO:21) e *M. facicularis* (SEQ ID NO:19) foi gerado com o antígeno PSA de consenso 1 (SEQ ID NO:4). KLK3 (calicreína 3) é o gene que codifica PSA e é pseudônimo com PSA. O antígeno PSA 1 é 90-91%
5 homólogo às sequências de proteínas de PSA parcial de comprimento completo de *H. sapiens* e 95% homólogo à de *M. facicularis*, e 95% homóloga à sequência de proteínas de PSA parcial de comprimento completo de de *M. mulatta*.

EXEMPLO 3

10 A antígeno de PSMA de consenso 1 (SEQ ID NO:6) foi gerado. Esta sequência, que compreende 750 aminoácidos foi comparada com cada uma das sequências de PSMA estabelecidas na Tabela 3. As sequências de PSMA usadas incluem duas sequências humanas e uma sequência de *M. mulatta*. A Tabela 3 inclui a SEQ ID NO: e Número de
15 acesso para cada sequência usada em comparação com o antígeno de PSMA de consenso 1 (SEQ ID NO:6).

Tabela 3

<u>SEQ ID NO</u>	<u>Espécies e proteína</u>	<u>Número de acesso</u>	<u>Número de aminoácidos</u>	<u>% de homologia com a SEQ ID NO:6</u>
22	PSMA GCPII_isol de <i>H. sapiens</i>	NP_004467.1	750	96
23	PSMA de <i>H. sapiens</i>	AAC83972.1	749	96
24	GCPII isol de <i>M. mulatta</i>	XP_001096141.2	735	94

Um alinhamento de sequência múltipla de *H. Sapiens* e *M. mulatta* sequências de PSMA foi gerado com antígeno PSMA 1. A sequência de consenso de antígeno PSMA 1 (SEQ ID NO:6) é 96% homóloga à sequência de proteína de PSMA de comprimento completo de *H. sapiens* (SEQ ID NO:22 e SEQ ID NO:23) e 94% homóloga à sequência
20 de proteína de PSMA de comprimento completo de *M. mulatta* (SEQ ID NO:24).

EXEMPLO 4

A antígeno de PSMA de consenso 2 (SEQ ID NO:8) foi gerado. Esta sequência, que compreende 767 aminoácidos incluindo uma sequência líder de IgE, foi comparada com cada uma das sequências de PSMA estabelecidas na Tabela 4. As sequências de PSMA usadas incluem duas sequências humanas e uma sequência de *M. mulatta*. A Tabela 4 inclui a SEQ ID NO: e Número de acesso para cada sequência usada em comparação com o antígeno de PSMA de consenso 2 (SEQ ID NO:8).

Tabela 4

<u>SEQ ID NO</u>	<u>Espécies e proteína</u>	<u>Número de acesso</u>	<u>Número de aminoácidos</u>	<u>% de homologia com a SEQ ID NO:8</u>
22	PSMA GCPII_isol de <i>H. sapiens</i>	NP_004467.1	750	96
23	PSMA de <i>H. sapiens</i>	AAC83972.1	749	96
24	GCPII isol de <i>M. mulatta</i>	XP_001096141.2	735	94
25	GCPII iso2 de <i>M. mulatta</i>	XP_002799784.1	704	94

Um alinhamento de sequência múltipla de Sequências de PSMA de *H. sapiens* (SEQ ID NO:22 e SEQ ID NO:23) e *M. mulatta* (SEQ ID NO:24 e SEQ ID NO:25) foi gerado com antígeno PSMA 2. A sequência de consenso de antígeno PSMA 2 (SEQ ID NO:8) é 96% homóloga à sequência de proteínas de PSMA de *H. sapiens* e 94% homóloga à sequência de proteínas de PSMA de *M. mulatta*.

EXEMPLO 5

Uma antígeno STEAP de consenso 1 (SEQ ID NO:10) foi gerado. Esta sequência, que compreende 339 aminoácidos foi comparada com cada uma das sequências de STEAP estabelecidas na Tabela 5. As sequências de STEAP usadas incluem duas sequências humanas de comprimento completo, uma sequência de comprimento completo de *M. mulatta* e duas sequências humanas mais curtas. A Tabela 5 inclui a SEQ ID NO: e Número de acesso para cada sequência usada em comparação com o antígeno STEAP de consenso 1 (SEQ ID NO:10).

Tabela 5

<u>SEQ ID NO</u>	<u>Espécies e proteína</u>	<u>Número de acessão</u>	<u>Número de aminoácidos</u>	<u>% de homologia com a SEQ ID NO:10</u>
26	STEAP1 de <i>H. sapiens</i>	NP_036581.1	339	99
27	STEAP1 de <i>H. sapiens</i>	Gb_EAL24167.1	339	99
28	STEAP1 de <i>M. mulatta</i>	XP_001103605.1	339	98
29	STEAP1 CRA b de <i>H. sapiens</i>	EAW93751.1	259	94
30	STEAP1 isoform de <i>H. sapiens</i>	EAW93749.1	258	94

Um alinhamento de sequência múltipla de sequências de STEAP *H. Sapiens* e *M. mulatta* foi gerado com o antígeno STEAP de consenso 1. A sequência de consenso de STEAP 1 (SEQ ID NO:10) é 99% homóloga às isoformas de comprimento completo humanas (SEQ ID NO:26 e SEQ ID NO:27), 94% homóloga a isoformas de *H. sapiens* mais curtas (SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30), e 94% homóloga à sequência de proteína de STEAP 1 de comprimento completo de *M. mulatta* (SEQ ID NO:28).

EXEMPLO 6

A o antígeno STEAP de consenso 2 (SEQ ID NO:12) foi gerado. Esta sequência, que compreende 356 aminoácidos foi comparada com cada uma das sequências de STEAP estabelecidas na Tabela 6. As sequências de STEAP usadas incluem duas sequências humanas de comprimento completo, uma sequência de comprimento completo de *M. mulatta* e duas sequências humanas mais curtas. A Tabela 6 inclui a SEQ ID NO: e Número de acessão para cada sequência usada em comparação com o antígeno STEAP de consenso 2 (SEQ ID NO:12).

15

Tabela 6

<u>SEQ ID NO</u>	<u>Espécies e proteína</u>	<u>Número de acessão</u>	<u>Número de aminoácidos</u>	<u>% de homologia com a SEQ ID NO:12</u>
------------------	----------------------------	--------------------------	------------------------------	--

26	STEAP1 de <i>H. sapiens</i>	NP_036581.1	339	94
27	STEAP1 de <i>H. sapiens</i>	Gb_EAL24167.1	339	94
28	STEAP1 de <i>M. mulatta</i>	XP_001103605.1	339	94
29	STEAP1 CRA b de <i>H. sapiens</i>	EAW93751.1	259	88
30	STEAP1 isoform de <i>H. sapiens</i>	EAW93749.1	258	88

Um alinhamento de sequência múltipla de sequências de STEAP1 de *H. Sapiens* e *M. mulatta* foi gerado com o antígeno STEAP1 de consenso 2. A sequência de consenso de antígeno STEAP1 2 (SEQ ID NO:12) é 94% homóloga às isoformas humanas de comprimento completo (SEQ ID NO:26 e SEQ ID NO:27), 88% homóloga às isoformas de *H. sapiens* mais curtas (SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30), e 94% homóloga às sequências de proteína de STEAP 1 de comprimento completo de *M. mulatta* (SEQ ID NO:28).

EXEMPLO 7

A o antígeno PSCA de consenso (SEQ ID NO:14) foi gerado. Esta sequência, que compreende 131 aminoácidos incluídos na sequência líder de IgE foi comparada com a sequência de PSCA estabelecida na Tabela 7. A sequência de PSCA usada foi uma sequência humana de comprimento completo. A Tabela 7 inclui a SEQ ID NO: e Número de acesso para a sequência usada em comparação com o antígeno PSCA de consenso (SEQ ID NO:14).

Tabela 7

<u>SEQ ID NO</u>	<u>Espécies e proteína</u>	<u>Número de acesso</u>	<u>Número de aminoácidos</u>	<u>% de homologia com a SEQ ID NO:14</u>
31	PSCA de <i>H. sapiens</i>	NP_005663.2	114	87

Um alinhamento de sequência múltipla de sequência de PSCA de *H. Sapiens* (SEQ ID NO:31) foi gerado com o antígeno PSCA de consenso (SEQ ID NO:14). A sequência de consenso de antígeno PSCA é 87% homóloga à de PSCA de comprimento completo de *H. sapiens*.

EXEMPLO 8

Tradução *in vitro* realizada para confirmar a expressão dos antígenos PSA e PSMA. O Sistema de transcrição/tradução acoplado a TNT® Quick e 35S-metionina (Promega) foram usados. O vetor pVAX sozinho (controle negativo) ou esqueleto de pVAX com as inserções do antígeno PSA ou PSMA e 35S-metionina foi adicionado à mistura de reação de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi realizada a 30°C durante 2 horas. As proteínas marcadas foram imunoprecipitadas com gel de afinidade anti-HA (Sigma, St. Louis, MO), por rotação durante a noite em tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) a 4°C. As proteínas imunoprecipitadas foram sujeitas a eletroforese em um gel de SDS-PAGE que foi posteriormente corrigido e seco. A expressão das proteínas marcadas com 35S foi detectada por autorradiografia. Os resultados são mostrados na Figura 1

EXEMPLO 9

A imunogenicidade celular dos antígenos PSA e PSMA foi determinada por ELISpot de Interferon-gama.

Camundongos BALB/c fêmeas com 4 a 6 semanas de idade foram adquiridos de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Todos os animais foram abrigados em uma instalação de controle de temperatura, de luz ciclada da Universidade da Pensilvânia. Cuidados com os animais foram realizados de acordo com as diretrizes do National Institutes of Health e University of Pennsylvania Institutional Care and Use Committee.

Para os estudos de imunogenicidade celular, 10 ou 20 µg de cada antígeno foram distribuídos para o músculo tibial anterior de camundongos Balb/c por injeção intramuscular seguida de eletroporação utilizando o dispositivo de corrente constante CELLECTRA® adaptativo (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA). Os camundongos (n = 5 por grupo) receberam 2 imunizações nas semanas 0 e 2. Dois pulsos de onda quadrada de correntes constantes de 0.1 Amp foram distribuídos através de uma matriz de 3 eletrodos triangulares consistindo em eletrodos de aço inoxidável sólido de calibre 26. Cada pulso foi de 52 milissegundos de comprimento, com um retardo de 1 segundo entre os pulsos. Os camundongos receberam um total de duas imunizações que foram administradas com 2 semanas de intervalo. Os camundongos foram sacrificados humanamente 1 semana após a segunda imunização para a análise das respostas imunes humorais e celulares.

As respostas celulares foram analisadas uma semana após a última imunização (semana 5). A análise de ELISpot foi usada para determinar a secreção específica de antígeno de IFN- γ . O anticorpo de captura de IFN- γ de camundongo (R&D Systems, Minneapolis, MN) foi usado para revestir as placas de fundo plano de Immobilon-P (Millipore, Billerica, MA) durante a noite a 4°C. Os esplenócitos foram isolados assepticamente e ressuspensos em meios R10 (Rosewell ParK Memorial Institute 1640 com meio suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico-antimicótico e 0,1% de 2-mercaptoetanol). 2×10^5 de esplenócitos de camundongos imunizados foram adicionados a cada poço placas com 96 poços e estimulados durante a noite a 37°C, 5% de CO₂, na presença de R10 (controle negativo), concanavalina A (controle positivo) (Sigma, St Louis, MO) ou em pools de peptídeos específicos para o antígeno. No dia seguinte, o anticorpo de detecção de IFN- γ do camundongo (R & D Systems, Minneapolis, MN) foi adicionado às placas que foram então incubadas durante a noite a 4°C. No dia seguinte, a estreptavidina-fosfatase alcalina (MabTech, Suécia) foi adicionada às placas durante 2 horas e manchas específicas de antígeno foram visualizadas com substrato de BCIP/NPT (MabTech, Suécia). Peptídeos de PSA e PSMA foram peptídeos 15-mero que abrangiam todo o comprimento do imunogene de consenso, não incluindo o HA tag ou sequência líder, sobrepondo 11 aminoácidos, e foram sintetizados por GenScript (Piscataway, NJ). Os peptídeos PSA e PSMA foram usados a uma concentração final de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ para cada peptídeo. ELISpot de IFN- γ foi usada para avaliar a resposta celular específica de antígeno 1 semana após a última imunização. Para o PSA, as respostas de IFN- γ foram semelhantes para as doses de vacina de 10 μg (772,2 +/- 138 SFU 2.) e 20 μg (771,1 +/- 155,2 SFU) (Figura 2A). Em contraste, houve um aumento dependente da dose nas respostas de FN γ específicas de PSMA com 20 microgramas da vacina (1585,0 +/- 194,0 SFU), em comparação com 10 μg da vacina (1047,2 +/- 160,7 SFU) (Figura 2B). Fundo mínimo foi observado para respostas de PSA ou PSMA em camundongos naive.

EXEMPLO 10

Produção de Células T CD4⁺ e CD8⁺ induzidas por vacina de IFN γ , IL-2 e TNF α

A imunogenicidade celular foi ainda caracterizada por citometria de fluxo para a codistribuição de vacinas contra o PSA e PSMA. A produção de células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas para o antígeno de IFN γ , IL-2 e TNF α foi determinada para a resposta específica de vacina total e os componentes de PSA e PSMA da resposta específica de vacina total (n = 5).

As respostas imunes celulares também foram determinadas por coloração de citocinas intracelulares e citometria de fluxo, utilizando o kit CytoFix/CytoPerm de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA). Os esplenócitos colhidos de camundongos imunizados foram lavados com PBS e, em seguida, ressuspensos em meio R10 até uma concentração final de 10^7 células/ml. As células foram semeadas em placas de 96 poços de fundo redondo em um volume de 100 μ l e um adicional de 100 μ l de um meio R10 (controle negativo), meio contendo pools de peptídeos específicos de antígenos ou meio contendo acetato de miristato de forbol (PMA, 10 ng/ml) e ionomicina (250 ng/ml, controle positivo) (Sigma, St. Louis, MO) foi adicionado e as placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂, durante 6 horas. Todos os meios de estimulação continham 1 μ g/ μ L cada de GolgiPlug e GolgiStop (BD Biosciences, San Diego, CA). No final do período de incubação as placas foram centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS. As células foram então coradas com um corante violeta para a viabilidade (LIVE/DEAD Violet Viability Dye, Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 30 minutos a 4°C. Depois da lavagem como acima com PBS, as células foram coradas externamente durante 30 minutos com anti-CD4 PerCPCy5.5 e anti-CD8 APC, a 4°C, seguido de fixação e permeabilização. Anti-CD3 PE-Cy5, anti-IL-2, de PE, anti-IFN γ , AlexaFluor-700 e anti-TNF α FITC (BD Biosciences, San Diego, CA) foram adicionados e as células foram novamente incubadas a 4°C durante 30 minutos. As células foram submetidas a uma lavagem final com PBS e fixas em 1% de PFA.

A codistribuição da vacina de PSA e PSMA induziu secreção de CD4⁺ robusta de IFN γ , IL-2 e TNF α . O percentual de células T CD4⁺ produtoras de IFN γ específicas de PSA (0,21%) e específicas de PSMA (0,24%) contribuiu igualmente para o total de resposta de IFN γ de células-T CD4⁺ específicas para a vacina (0,44%) (Figura 3A). A IL-2 produtora de células T CD4⁺ específicas de PSMA T (1,08%) compreendeu a maioria da porcentagem total de IL-2 específica de vacina produtora de células T CD4⁺ (1,40%) (Figura 3B). O percentual de PSA (0,31%) e PSMA (0,29%) induziu a produção de células T CD4⁺ de TNF α que contribuiu igualmente para a resposta específica de vacina total (0,60%) (Figura 3C). Em geral, as respostas de células T CD4⁺ foram bem equilibradas entre o PSA e PSMA, com a exceção de que o PSMA induziu a maioria da produção de IL-2 de células T CD4⁺ específicas de vacina.

A vacina induziu forte produção de células T CD8⁺ específica do antígeno de IFN γ e de IL-2 e, em menor extensão, o TNF α . Ambos PSA (0,70%) e PSMA (0,67%)

induziram produção de IFN γ de células T CD8+ robusta. De fato, a secreção de células T CD8+ específicas de vacina de células de IFN γ compreendeu 1,37% da população de células T CD8+ total (Figura 4A). A vacina também induziu uma forte resposta de IL-2 de células T CD8+ (1,54%). Semelhante às respostas de IL-2 de células T CD4+, a porcentagem de IL-2 de secreção de células T CD8+ específicas de PSMA (1,06%) foi aproximadamente 2 vezes maior do que a específica de PSA (0,47%) (Figura 4B). A porcentagem total de produção de células T CD8+ específicas de vacina de TNF α (0,11%) foi em resposta ao componente de PSA da vacina (Figura 4C). Em resumo, verificou-se uma porcentagem elevada de produção de células T CD8+ específica de vacina de IFN γ e IL-2. Semelhante à resposta das células T CD4+, a produção de IFN γ foi igualmente equilibrada entre PSA e PSMA e a magnitude da resposta específica de PSMA de IL-2 foi maior do que a da resposta específica de PSA.

EXEMPLO 11

Soroconversão de IgG específica de PSA

A resposta de anticorpos pode desempenhar um papel importante na imunoterapia tumoral. Assim este parâmetro da resposta imune ao antígeno PSA com base na disponibilidade da proteína alvo foi examinado.

Para a determinação das titulações de anticorpos de soros específicos de PSA, placas de 96 poços Nunc-Immuno MaxiSorp (Nunc, Rochester, NY) foram revestidas durante a noite a 4°C com 1 μ g/poço de proteína de PSA recombinante (Fitzgerald Industries, Acton, MA), diluída em PBS. As placas foram lavadas com PBS, 0,05% de Tween 20 (PBST), bloqueadas durante 1 hora à temperatura ambiente com 10% de BSA/PBST e incubadas com diluições em série de soro de animais imunizados ou naives durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com PBST e IgG de cabra anti-camundongo (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) foi adicionada em uma diluição de 1:5.000 em PBST. Enzima ligada foi detectada por dicloridrato de O-fenilenodiamina de SigmaFAST (OPD, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), e a densidade óptica foi determinada a 450 nm em leitores de placas BioTek (Winooski, VT) mostrados na Figura 5B. As titulações de ponto final foram determinadas como anteriormente descrito (Frey, A. et al. 1998). Resumidamente, o limite preditivo superior foi calculado utilizando a distribuição t de Student. A fórmula matemática que define o limite preditivo superior é expressa como o desvio padrão multiplicado por um fator que foi baseado no

número de controles negativos (n = 5) e no nível de confiança (95%). A titulação de ponto final foi avaliada como o recíproco da última diluição acima do limite preditivo superior.

Além de conferir a imunidade celular robusta mediada, a vacina de PSA também induziu fortes respostas humorais específicas de antígeno. As titulações de anticorpos foram determinadas por ELISA em soros isolados a partir de camundongos uma semana após a última imunização (n = 5). A vacina induziu uma titulação de ponto final de anticorpo específico de PSA médio de 4.427 (faixa de 1581-15.811) (Figura 5A). A longevidade destas respostas pode ser igualmente importante.

EXEMPLO 12

10 As sequências de aminoácidos de antígeno específico de próstata disponíveis no GenBank incluem: gb_EAW71923.1_H.sapiens_klk3_CRAB;
 _001639.1_H.sapiens_PSA_iso1_preproteína;
 gb_AAA59995.1_H.sapiens_PSA_precursor; gb_AAA60193.1_H.sapiens_PSA;
 gb_EAW71933.1_H.sapiens_klk3_CRA_1;
 15 NP_001025218.1_H.sapiens_PSA_iso3_preproteína;
 gb_CAD54617.1_H.sapiens_PSA;
 gb_CAD30844.1_H.sapiens_PSA; gb_AAA59996.1_H.sapiens_PSA_precursor;
 gb_AAD14185.1_H.sapiens_PSA; Q6DT45.1_M.fascicularis_KLK3;
 NP_001036241.1_M.mulatta_PSA_precursor; AAZ82258.1_M.mulatta_PSA;
 20 AAZ82255.1_G.gorilla_PSA; gi|163838666|ref|NP_001106216.1| plasma kallikrein [Papio anubis]; gi|73746696|gb|AAZ82261.1| antígeno específico de próstata [Papio anubis];
 i|73746692|gb|AAZ82259.1| antígeno específico de próstata [Erythrocebus patas];
 gi|73746694|gb|AAZ82260.1| antígeno específico de próstata [Cercopithecus
 25 cephus];
 gi|73746682|gb|AAZ82254.1| antígeno específico de próstata [Pan paniscus];
 gi|73746680|gb|AAZ82253.1| antígeno específico de próstata [Pan troglodytes];
 gi|73746686|gb|AAZ82256.1| antígeno específico de próstata [Pongo pygmaeus]; e
 3746688|gb|AAZ82257.1| antígeno específico de próstata [Nomascus gabriellae].
 30 As sequências de aminoácidos de PSMA disponíveis no GenBank incluem as seguintes:
 NP_004467.1_Humano_GCPII_iso1; Humano_PSMA_AAC83972.1;
 M.mulatta_GCPII_iso1_XP_001096141.2; e M.mulatta_GCPII_iso2_XP_002799784.1.

As sequências de aminoácidos de STEAP disponíveis no GenBank incluem as seguintes:

NP036581.1_Humano_STEAP1; EAL24167.1_Humano_STEAP1;
XP001103605.1_M.mulatta_STEAP1_iso3; EAW93751.1_Human_STEAP1_CRAb;
5 EAW93749.1_Human_STEAP1_CRaa; XP001164838.1_P.troglodytes_STEAPiso2;
XP002818311.1_P.abelii_STEAP1; NP001162459.1_P.anubis_STEAP1;
NP_999470.1_S.scrofa_STEAP1; e NP_081675.2_M.musculus_STEAP1.

NP_005663.2_Human_PSCA é o número de acesso de uma sequência de aminoácidos de PSCA disponível no GenBank.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína caracterizada por ser selecionada entre o grupo que consiste em:

- a) SEQ ID NO: 2;
- b) SEQ ID NO: 4;
- c) SEQ ID NO: 6;
- d) SEQ ID NO: 8;
- e) SEQ ID NO: 10;
- f) SEQ ID NO: 12;
- g) SEQ ID NO: 14; ou

h) um peptídeo sinal ligado aos aminoácidos 19-131 da SEQ ID NO: 14.

2. Uma molécula de ácido nucleico caracterizada por compreender uma ou mais sequências selecionadas a partir do grupo que compreende:

- a) SEQ ID NO: 1;
- b) SEQ ID NO: 3;
- c) os nucleótidos 1-2250 de SEQ ID NO: 5;
- d) nucleótidos 1-2301 da SEQ ID NO:7;
- e) SEQ ID NO: 9;
- f) SEQ ID NO: 11, ou
- g) a SEQ ID NO: 13.

3. Molécula de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por compreender uma ou mais sequências de nucleótidos selecionadas entre o grupo que compreende: os elementos a), b), c) ou d).

4. Molécula de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender uma ou mais sequências de nucleótidos selecionadas entre o grupo que compreende: pelo menos um selecionado a partir

de ambos os elementos a) ou b), e pelo menos um selecionado a partir de ambos os elementos c) ou d).

5. Molécula de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por:

a molécula de ácido nucleico ser um plasmídeo.

6. Molécula de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por:

a molécula de ácido nucleico ser um vetor de expressão e as sequências de codificação do dito mais proteínas são operáveis ligadas a elementos reguladores.

7. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender uma ou mais proteínas selecionadas a partir do grupo que compreende: os elementos a), b), c) ou d).

8. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender uma ou mais proteínas selecionadas a partir do grupo que compreende: pelo menos, um selecionado a partir de ambos os elementos a) ou b), e pelo menos um selecionado a partir de ambos os elementos c) ou d).

9. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender uma proteína selecionada de entre o grupo constituído por: SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, ou SEQ ID NO: 14.

10. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender uma proteína selecionada entre o grupo constituído por: SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6, ou SEQ ID NO: 8.

11. Composição farmacêutica caracterizada por compreender a molécula de ácido nucleico como definida

na reivindicação 2 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

Figura 1

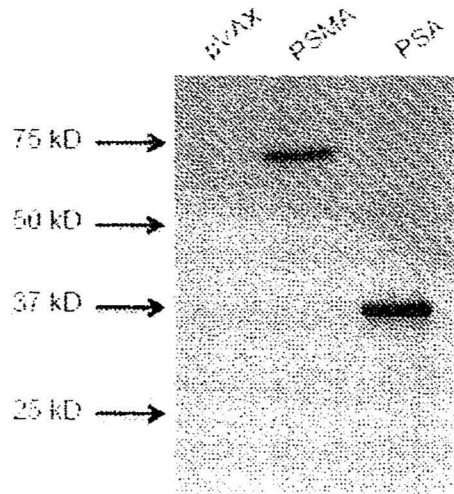


Figura 2 A

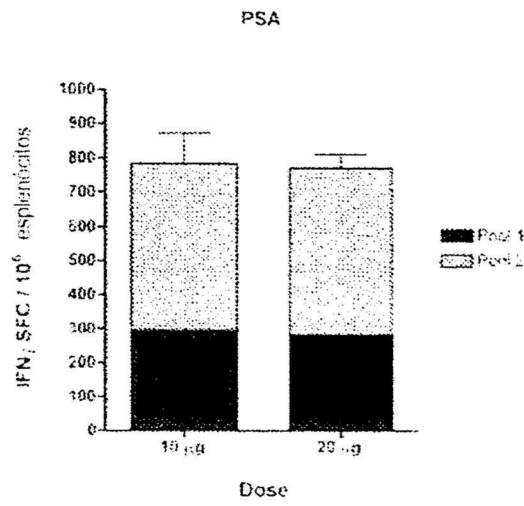
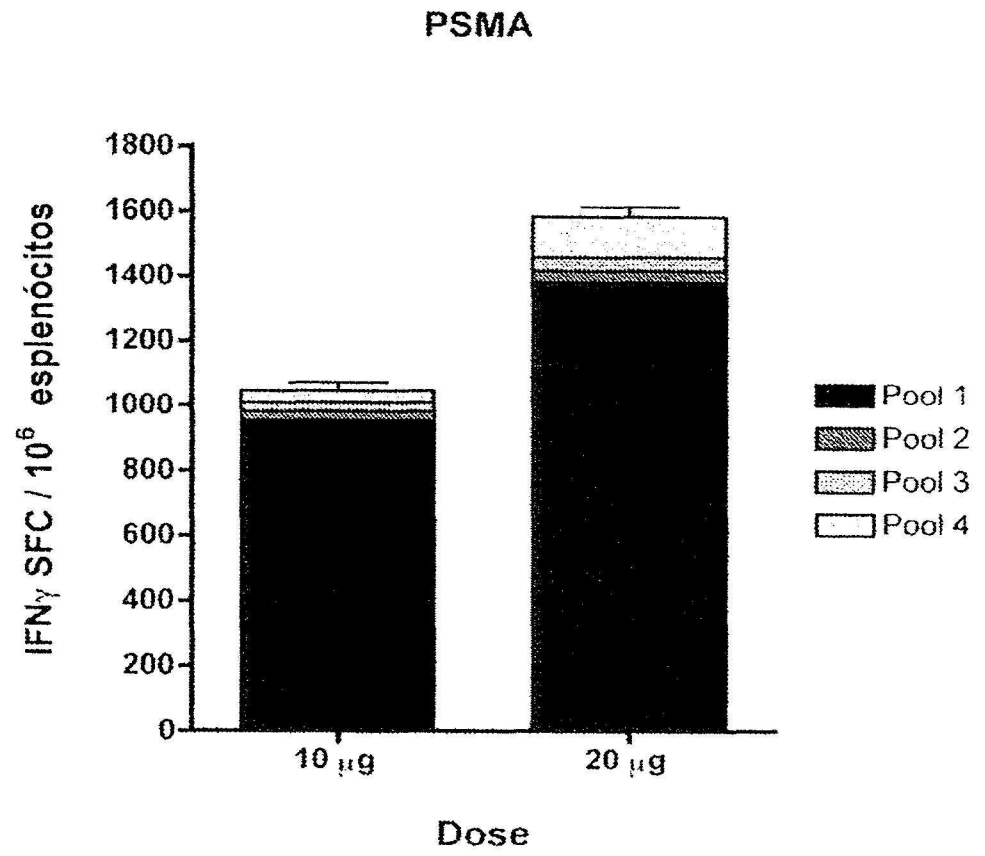
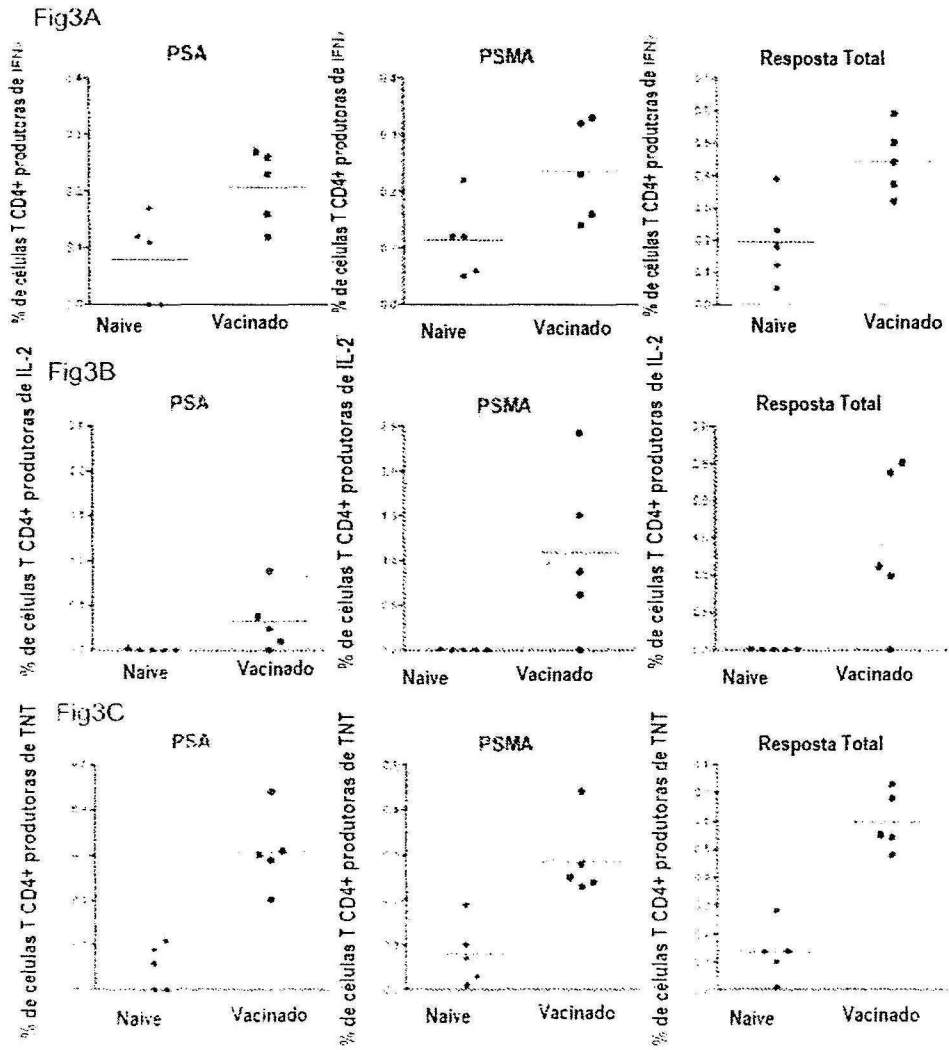


Figura 2B



Figuras 3A, 3b e 3C Respostas de Células T CD4+



Figuras 4A, 4B e 4C Respostas de Células T CD8+

Fig 4A

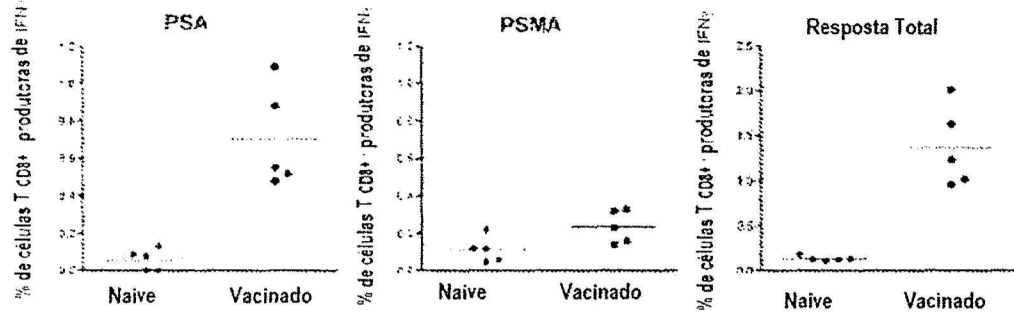


Fig 4B

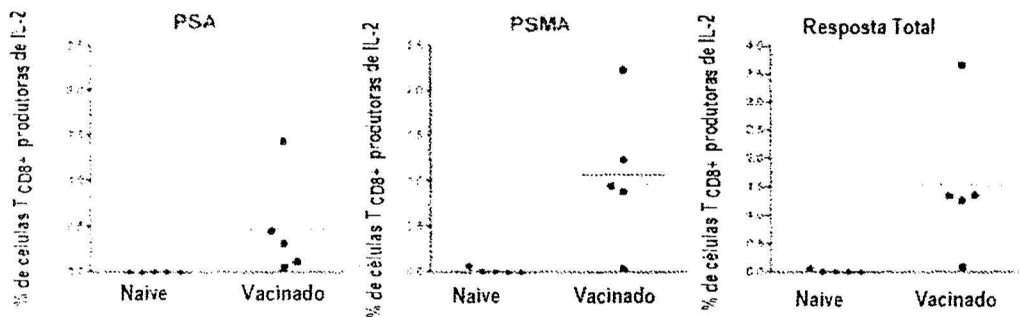
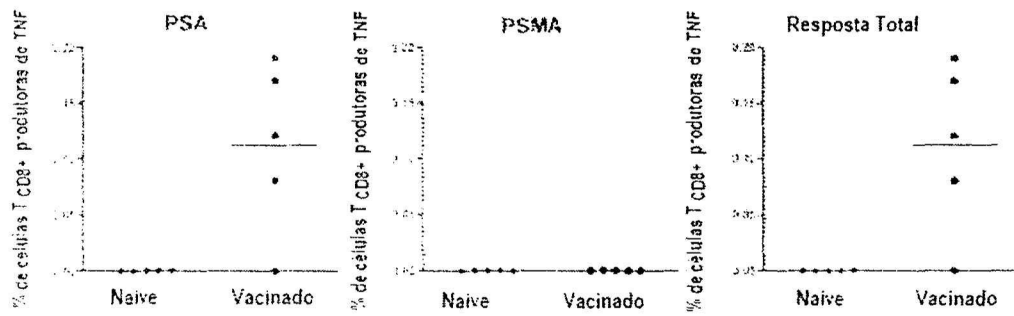


Fig 4C



Figuras 5A e 5 B Soroconversão de IgG Específica de PSA

Fig 5A

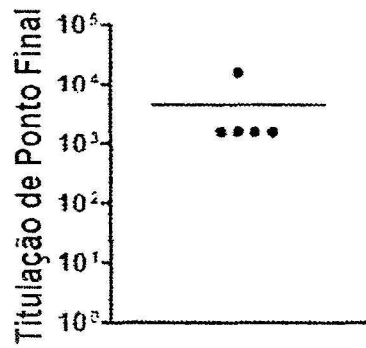


Fig 5B

