

(11) **Número de Publicação:** PT 91316 B

(51) **Classificação Internacional:** (Ed. 6)

C12N015/62 A	C12N015/48 B
C12N015/36 B	A61K039/00 B
G01N033/00 B	

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

(22) Data de depósito: 1989.07.28	(73) Titular(es): INSTITUT PASTEUR 25-28 RUE DU DR. ROUX 75724 PARIS CEDEX 15 FR
(30) Prioridade: 1988.07.29 FR 88 10336	(72) Inventor(es): PIERRE TIOLLAIS MARYLINE MANCINI MARIE-LOUISE MICHEL ELIANE SOBCZAK FR FR FR FR
(43) Data de publicação do pedido: 1990.02.08	(74) Mandatário(s): ANTÓNIO LUÍS LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DE MIGUEL LUPI 16 R/C 1200 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 04/95 1995.04.07	

(54) **Epígrafe:** PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE VECTORES RECOMBINANTES E DE PARTÍCULAS HBSAG RECOMBINANTES HÍBRIDAS TENDO AS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO ANTIGÉNIO HBSAG CONTENDO UMA SEQUÊNCIA IMUNOGÉNICA QUE INDUZ ANTICORPOS NEUTRALIZANTES DIRIGIDOS CONTRA HIV OU SUSCEPTÍVEL DE SER RECONHECIDA POR TAIS ANTICORPOS

(57) **Resumo:**

[Fig.]

P. 27. n.º 91.316

4.

INSTITUT PASTEUR e INSTITUT NATIONAL DE LA
SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE

"Processo para a preparação de vectores recombinantes e de partículas HBsAg recombinantes híbridas tendo as características morfológicas do antigénio HBsAg contendo uma sequência imunogénica que induz anticorpos neutralizantes dirigidos contra HIV ou susceptível de ser reconhecida por tais anticorpos

A presente invenção diz respeito a partículas recombinantes híbridas tendo as características morfológicas do antigénio HBsAg comportando sequências de aminoácidos imunogénicas que induzem anticorpos neutralizantes dirigidos contra os retrovírus da família de HIV ou capazes de ser reconhecidos por tais anticorpos.

A presente invenção diz igualmente respeito aos ácidos nucleicos recombinantes ou vectores recombinantes, compor-

tando as inserções formadas pelos ácidos nucleicos recombinantes híbridos, eventualmente sob o controlo de um promotor reconhecido pelas polimerases de um hospedeiro celular eucariota, comportando estes ácidos nucleicos recombinantes a informação genética requerida para tornar este hospedeiro celular eucariota apto a produzir as partículas híbridas recombinantes referidas antes. A presente invenção tem igualmente por objecto hospedeiros celulares eucariotas transformados pelos vectores recombinantes anteriores.

A presente invenção proporciona, por intermédio das partículas recombinantes referidas antes, novos meios de prevenção contra a SIDA ou contra os sintomas precursores da SIDA especialmente dos síndromas linfadenopáticos (SLA).

A presente invenção diz mais particularmente respeito às partículas recombinantes deste tipo que têm a capacidade de induzir a formação de anticorpos neutralizantes em relação aos retrovírus HIV e à sua aplicação para a preparação de composições vacinantes para lutar contra uma infecção devida a um retrovírus HIV.

A presente invenção tem igualmente por objecto péptidos e polipeptidos adequados, tendo propriedades imunogénicas protectoras contra a SIDA, particularmente polipeptidos do invólucro de um retrovírus HIV ou SIV para a realização das partículas recombinantes referidas antes.

A presente invenção diz igualmente respeito aos ácidos nucleicos que codificam para estes péptidos e polipéptidos, assim como aos vectores que os contêm.

A presente invenção diz igualmente respeito à utilização dos meios acima referidos para realizar o diagnóstico in Vitro de uma infecção devida a HIV.

Sabe-se agora que agentes etiológicos responsáveis pelo desenvolvimento de síndromas de linfadenopatias (SLA) precedem muitas vezes o desenvolvimento do síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA).

Designou-se por HIV (abreviatura inglesa de "Human Immunodeficiency virus") vários retrovírus humanos susceptíveis em certas condições, de provocar um SLA, eventualmente substituído por um síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) no homem.

Assim, um primeiro vírus denominado LAV-1 ou HIV-1 foi isolado e descrito no pedido de patente de invenção inglesa Nº 83/24.800 e no pedido de patente de invenção europeia Nº: 84/401.834 de 14/09/84. Este vírus foi igualmente descrito por F. Darre Sinoussi e colab. em Science, 220, nº 45-99, 20, páginas 868-871.

Variantes deste vírus HIV-1 designadas por LAV ELI e LAV MAL, foram igualmente isoladas, caracterizadas e descritas no pedido de patente de invenção europeia nº 84/401.834.

O isolamento e a caracterização de retrovírus pertencentes a uma classe distinta e tendo apenas um parentesco imunológico reduzido com as anteriores foram descritos no pedido de patente de invenção europeia nº 87/400.151.4 publicada sob o nº 239.425. Estes retrovírus, que foram reagrupados sob a designa-

ção de HIV-2, foram isolados em vários doentes africanos apresentando sintomas de uma linfadenopatia ou de SIDA.

O estudo destes retrovírus HIV, o isolamento e a análise das suas sequências nucleotídicas, assim como a caracterização das suas proteínas antigénicas permitiu efectuar estudos comparativos entre as diferentes estirpes obtidas ao nível do seu parentesco ou, pelo contrário, das suas especificidades tanto estruturais como funcionais.

Estes retrovírus HIV-1 e HIV-2 foram igualmente estudados em comparação com um retrovírus de origem simiana (designado pela abreviatura SIV ou STLV-III), permitindo este estudo demonstrar um parentesco imunológico entre as proteínas e glicoproteínas do retrovírus HIV-2 e das suas variantes e das do retrovírus SIV. A glicoproteína do invólucro do retrovírus SIV reage imunologicamente com anticorpos dirigidos contra a glicoproteína do invólucro do retrovírus HIV-2 e vice-versa. Em contrapartida as glicoproteínas do invólucro do retrovírus SIV ou do retrovírus HIV-2 não dão lugar a reacções imunológicas cruzadas com as glicoproteínas do invólucro do retrovírus HIV-1.

Os estudos realizados sobre a estrutura dos antígenos de superfície destes retrovírus levaram os inventores a interessar-se mais especialmente pelas propriedades imunogénicas dos diferentes péptidos e polipéptidos pertencentes a estes antígenos, particularmente pelas glicoproteínas de invólucro, ou pelas glicoproteínas transmembranares destes retrovírus.

Diferentes péptidos e polipéptidos característicos

cuja s sequência s estão contidas nas estruturas peptídicas destas glicoproteínas, quer provenientes directamente destes retrovírus, quer sintetizadas por via química, apresentavam uma imunogenicidade relativamente fraca.

No âmbito da presente invenção os inventores pesquisaram e definiram meios susceptíveis reforçar a imunogenicidade desses péptidos ou polipéptidos derivados das glicoproteínas de envólucro ou das glicoproteínas membranares de HIVs ou elaboradas a partir do conhecimento das suas respectivas sequências, ou ainda de sequências funcionalmente próximas, em particular para os tornar aptos a induzir in vivo a formação de anticorpos neutralizantes em relação a um ou vários retrovírus do tipo HIV.

Mais precisamente, os inventores orientaram os seus trabalhos para a elaboração de uma estrutura biológica mista em que um dos elementos é constituído pelos referidos péptidos ou polipéptidos, o outro por partículas com propriedades imunogénicas e imunológicas essenciais do antigénio de superfície (frequentemente designado pela abreviatura HBsAg ou ainda mais simplesmente HBs) do vírus da hepatite B.

Partículas com as propriedades morfológicas e imunogénicas essenciais do antigénio HBsAg natural e produzidas pela expressão do gene S do vírus da hepatite B nas células eucariotas, foram descritas na patente de invenção europeia Nº0038765 depositada a 22 de Abril de 1981. Recorda-se brevemente que estas partículas HBs têm uma dimensão aproximada de 17 a 25, nomeadamente 22nm de diâmetro. Foram igualmente descritas no artigo científico correspondente de M.F. DUBOIS e colab. Proc. Natl. Acad. Sci.,

USA, 77, 1980, 4549-4553 /.

Partículas semelhantes foram obtidas em leveduras (P. VALENZUELA e colab., Nature, 298, 1982, 347-350) ou por intermédio de vírus recombinantes (G.L. SMITH E colab. Nature, 302, 1983, 490-495).

Um método para produzir estas partículas compreende a transformação de células eucariotas pelo vector apropriado contendo o gene S sob a dependência de um promotor eficaz nestas células eucariotas, a cultura das células transformadas e a recuperação das partículas produzidas, quer a partir das células previamente lisadas, quer a partir do meio de cultura, quando as partículas aí tiverem sido excretadas pelas linhas de células utilizadas (particularmente no caso da utilização de linhas de células de macaco, de hamster, de murganho etc.)

O polipéptido maior das partículas HBs, codificado pelo gene S tem um peso molecular (PM) de cerca de 25400 daltons. Este peso molecular é da ordem de 27000 daltons quando a proteína maior está sob a forma glicosilada.

No âmbito da presente invenção, os inventores interessaram-se igualmente pela preparação de proteínas de PM superior (da ordem de 34000 daltons), contendo não somente a sequência polipéptidica do referido polipéptido maior codificado para a região S, tendo a mesma extremidade C-terminal que o polipéptido maior e, além disso, uma sequência suplementar de 55 aminoácidos em posição N-terminal (STIBBE X. e GERLICH W.H., J. Virology, 46, 1983, 626-628) codificada pela região pré-S2 do genoma da hepatite B. Os inventores estudaram, igualmente, partículas resultantes

da transcrição das regiões S, pré-S1 e pré-S2 (o conjunto destes dois domínios chama-se região pré-S).

As proteínas recombinantes acima referidas juntam-se em partículas com um tamanho aproximado de 22nm.

A presente invenção resulta da conjugação em uma entidade comum de factores que concorrem para o resultado pretendido, a saber:

1) um suporte constituído por partículas HBsAg que comportam vários sítios epitópicos T e B, cuja imunogenicidade protectora é adquirida, quando eles não foram modificadas (e quando as suas proteínas de superfície compreendem a sequência de aminoácidos codificada pela região pré-S do genoma do vírus da hepatite B),

2) um epítipo T imunogénio derivado de uma glicoproteína de invólucro de HIV,

3) um epítipo B, pertencente igualmente a uma glicoproteína do invólucro de HIV e de acordo com o processo de preparação da presente invenção,

4) com vantagem um sítio de ligação ao receptor CD4 de linfócitos T4. Este sítio, em combinação com os factores anteriores, participará na indução in vivo dos anticorpos neutralizadores contra HIV e na indução de uma resposta celular, acompanhada de uma acção bloqueadora dos anticorpos formados, desde que eles sejam dirigidos contra um sítio de fixação do vírus.

O objectivo fixado pelos inventores foi atingido graças à preparação de partículas híbridas recombinantes com as características morfológicas essenciais das partículas de HBsAg e comportando, aflorando à superfície destas partículas, o essencial da sequência de aminoácidos (S) codificada pela região S e eventualmente, a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos codificada pela região pré-S do genoma do vírus da hepatite B, a montante da referida sequência de aminoácidos S, sendo estas partículas recombinantes caracterizadas pelo facto de comportarem também, uma sequência de aminoácidos imunogénica que induz anticorpos neutralizadores em relação a um retrovírus da família HIV, ou susceptível de ser reconhecida por esses anticorpos, comportando esta sequência pelo menos um epítopo susceptível de ser reconhecido pelos linfócitos B, pelo menos um epítopo susceptível de ser reconhecido pelos linfócitos T, sendo esta sequência imunogénica, quer inserida na sequência de aminoácidos pré-S, quer substituída toda ou parte da proteína pré-S.

De modo particularmente vantajoso, as partículas híbridas recombinantes acima referidas comportam, além disso, um sítio de ligação ao receptor CD4 de linfócitos T4 humanos.

A presente invenção diz igualmente respeito a um vector recombinante para a transformação ulterior de células competentes, quando aptas a produzir tais partículas.

O vector recombinante de acordo com a presente invenção comporta um fragmento de ácido nucleico que corresponde à região S e eventualmente à totalidade ou a parte da região pré-S do antigénio maior da superfície do vírus da hepatite B e que per-

mite, quando introduzido em um hospedeiro celular eucariota competente, induzir a produção de partículas com as características morfológicas essenciais do antigénio HBsAg, e que comporta uma sequência de aminoácidos característica da proteína S do antigénio HBsAg, na altura da cultura do hospedeiro celular assim transformado e, de preferência, a excreção destas partículas no meio de cultura, sendo este vector recombinante caracterizado pelo facto de:

- comportar também uma sequência nucleotídica exógena que codifica para uma sequência de aminoácidos imugénica que induz anticorpos neutralizadores em relação a um retrovírus da família de HIV ou susceptível de ser reconhecida por esses anticorpos, comportando, pelo menos, um epítipo susceptível de ser reconhecido pelos linfócitos B e, pelo menos, um epítipo susceptível de ser reconhecido pelos linfócitos T, e

- a referida sequência nucleotídica exógena ser quer inserida na dita região pré-S, quer substituir a totalidade ou parte da dita região pré-S.

A sequência nucleotídica exógena codifica, com vantagem, para uma sequência de aminoácidos imunogénica tal como se definiu antes e que comporta, além disso, um sítio de ligação ao receptor CD4.

Num modo de realização preferido do vector recombinante, o fragmento de ácido nucleico correspondente à região S e eventualmente a toda ou parte da região pré-S coloca-se sob o controlo de um promotor reconhecido pelas polimerases de um hospedeiro

celular eucariota.

A incorporação das sequências características de HIV na região pré-S (ou a substituição parcial ou total desta região pré-S pelas referidas sequências características) permite simultaneamente a expressão e a exposição das sequências resultantes de HIV à superfície das partículas que conservaram as características essenciais das partículas HBsAg e nestas uma conformação que permita a conservação da sua imunogenicidade natural e a sua amplificação, ao ponto de as tornar aptas a induzir in vivo a formação de anticorpos neutralizadores face a um retrovírus HIV.

Recorre-se, com vantagem, a vectores recombinantes comportando sequências nucleotídicas exógenas resultantes de HIV, escolhidas de entre as que apresentam um grande grau de conservação no seio de diferentes isolados de retrovírus HIV.

O comprimento das sequências nucleotídicas inseridas no encadeamento nucleotídico que comporta a região S e eventualmente a totalidade ou parte da região pré-S deve ser compatível com a manutenção das propriedades estruturais e conformacionais (morfológicas) essenciais das partículas HBs. Este comprimento depende numa certa medida da parte eliminada da região pré-S a título indicativo.... mas não limitativo.... este comprimento corresponde a uma sequência de 5 a 100 resíduos aminoácidos. O comprimento da sequência inserida pode em certas formas de realização da presente invenção exceder a da sequência eliminada.

Numm modo de realização preferido dos vectores recombinantes de acordo com a presente invenção, a sequência

nucleotídica exógena é inserida na fase de leitura apropriada na região pré-S (ou a montante do gene S) sob o controlo de um promotor resultante do SV40.

Num modo de realização particular da presente invenção, o ácido nucleico recombinante é caracterizado pelo facto de a sequência nucleotídica exógena (resultante de HIV) ser substituída na maior parte, se não a totalidade, da região pré-S2.

Em outros termos, a região pré-S2 que subsiste depois da inserção da referida sequência nucleotídica exógena está praticamente completamente eliminada, estando então a sequência nucleotídica exógena directamente intercalada entre a região S e a região pré-S1. Por sequência nucleotídica exógena, entende-se as sequências cujas definições foram dadas nas páginas anteriores assim como as que serão exemplificadas a seguir. Entram, contudo, no âmbito da presente invenção vectores transformados susceptíveis de favorecer a integração no fragmento de ácido nucleico HBs, das referidas sequências nucleotídicas exógenas.

Vectores recombinantes particularmente adaptados à expressão das sequências nucleotídicas exógenas no quadro das propriedades pretendidas resultam da combinação de um vector de expressão conhecido de HBsAg, designado por pSVS (ver para este assunto a referência 11) e de uma sequência exógena, resultante de HIV-2 transportada por um vector de clonagem M13tg130.

Um tal vector resulta da inserção da sequência exógena na região pré-S2 de HBsAg (vector pM25 que contém a sequência pré-S1) ou da substituição de uma parte da região pré-S pela se-

quência exógena (pSV25 na qual a região pré-S1 foi eliminada). Estes dois vectores, não limitativos das possibilidades de realização da presente invenção, contêm uma sequência nucleotídica exógena característica da glicoproteína externa do invólucro de HIV-1 obtida mediante clonagem e designada por "clone 8". Está representada na figura 6.

Outras construções podem ser obtidas substituindo a sequência de HIV-1 anteriormente referida pelas sequências nucleotídicas de HIV-2 ou de SIV correspondentes, ou ainda por sequências modificadas, imunologicamente equivalentes, capazes, contudo, de produzir in vivo anticorpos neutralizadores dirigidos contra um retrovírus HIV.

A título de exemplo, as sequências inseridas de modo preferido nos encadeamentos de nucleótidos anteriormente referidos são as sequências nucleotídicas que codificam para uma das seguintes sequências de aminoácidos:

X_1 CHIRQIINTWHKVGKNVYLPPREGDLTC Z_1

X_2 CHIKQIINTWHKVGRNVYLPPREGELSC Z_2

X_3 CRIKQFINMWQEVGKAMYAPPISGQIRC Z_3

em que os pares X_1, Z_1 ; X_2, Z_2 e X_3, Z_3 representam quer grupos COOH ou NH₂, quer sequências de aminoácidos normalmente respectivamente associados às partes centrais correspondentes das sequências referidas antes nas glicoproteínas dos retrovírus SIV, HIV-2, HIV-1 que normalmente os contêm: estas sequências comportam particularmente, no total, até 100 aminoácidos.

Outras sequências nucleotídicas igualmente preferidas são as que codificam para as sequências de aminoácidos seguintes:

RGEFLYCKMNWFLNWVEDRSLTTQKPKERHKRNYVPCHIRQIINTWHKVGKNVYLP
 PREGDLTCNSTVTSLIANINWTDG;
 RGEFLYCNMTWFLNWIENKTHRNYAPCHIKQIINTWHKVGRNVYLP
 PPREGELSCNS
 TVTSIIANIDWQNN;
 GGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNTEGSDTITLPCRIKQFINMWQEVGKAM
 YAPPISGQIRCSSNITGLLLTRDGGNN;

Num modo de realização particular das partículas anteriormente referidas, a sequência de aminoácidos exógena é inserida na sequência peptídica codificada pela região pré-S2 do genoma do vírus da hepatite B, ou substitui toda ou parte desta sequência peptídica.

De preferência, as partículas híbridas recombinantes contêm uma sequência de aminoácidos exógena escolhida entre as que foram já indicadas como exemplos preferidos:

X_1 CHIRQIINTWHKVGKNVYLP
 PPREGDLTC Z_1
 X_2 CHIKQIINTWHKVGRNVYLP
 PPREGELSC Z_2
 X_3 CRIKQFINMWQEVGKAMYAPPISGQIRC Z_3

Estas sequências particulares apresentam características funcionais interessantes, particularmente pelo facto de conterem em uma sequência comum resultante de HIV um sítio de ligação aos linfócitos T e receptores CD4 e um epítopo T muito próximos um do outro.

Uma extensão da aplicação da presente invenção consiste na preparação de um vector recombinante exógeno característico de uma glicoproteína do invólucro de HIV mas desprovida da sequência que codifica para o sítio de ligação ao receptor CD4. Uma tal sequência exógena inserida na região pré-S definida antes pode conduzir de modo interessante à formação de partículas híbridas recombinantes capazes de apresentar à sua superfície epítopos susceptíveis de ser reconhecidos pelos linfócitos B e pelos linfócitos T e capazes, respectivamente, de contribuir para a indução de anticorpos ou de uma resposta celular.

Sequências de aminoácidos exógenos preferidas da presente invenção, contêm sequências peptídicas, respectivamente, características dos vírus SIV, HIV-2, HIV-1 e têm as seguintes sequências

RGEFLYCKMNWFLNWVEDRSLTTQPKERHKRNYVPCHIRQIINTWHKVGKNVYLP
 PREGDLTCNSTVTSLIANINWTDG
 RGEFLYCNMTWFLNWIENKTHRNYAPCHIKQIINTWHKVGRNVYLP
 PPREGELSCNS
 TVTSIIANIDWQNN
 GGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNTEGSDTITLPCRQKFINMWQEVGKAM
 YAPPISGQIRCSSNITGLLLTRDGGNN

Outras sequências peptídicas exógenas podem estar abrangidas pelo âmbito da presente invenção desde que as propriedades pretendidas para as partículas recombinantes e que foram anteriormente definidas sejam respeitadas.

Os péptidos e polipéptidos imunogénicos característicos de HIV ou de SIV que estão compreendidos no âmbito da presen-

te invenção podem ser obtidos por síntese, de acordo com as técnicas descritas na patente de invenção norte-americana nº 4629783 concedida a 16 de Dezembro de 1986 à Firma GENETIC SYSTEMS.

Outros métodos cujos princípios estão resumidos a seguir poderão ser utilizados.

Um princípio de síntese é por exemplo fazer contactar uma fase sólida na qual se liga a sequência do péptido e uma fase líquida contendo dissolventes e reagentes. Em cada passo a separação entre o péptido em crescimento e os reagentes faz-se mediante simples filtrações e lavagens.

Inicialmente, o suporte sólido que transporta um grupo reactivo reage com o grupo carboxilo de um aminoácido introduzido com o seu grupo α -NH₂ bloqueado (protegido por exemplo pelo t-butiloxi-carbonilo), para formar uma ligação covalente. Após desprotecção da função aminada (por exemplo mediante lavagem com um ácido tal como o ácido trifluoroacético), introduz-se um segundo aminoácido protegido para se obter mediante acoplamento a primeira ligação peptídica. O segundo aminoácido, que fornece o segundo amino-acilo da sequência, é acoplado, a partir do resíduo amino-acilo C-terminal, à função amina desprotegida do primeiro aminoácido C-terminal da cadeia. De preferência, a função carboxilo deste segundo aminoácido é activada, por exemplo, pela diciclo-hexilcarbodiimida. Mediante uma sequência de reacções, desprotecções e acoplamentos, a síntese progride do resíduo C- em direcção ao resíduo N-terminal. Quando a sequência pretendida está completa, o péptido desliga-se da fase sólida, mediante uma reacção específica de corte da ligação péptido-resina inicialmente for-

mada.

De acordo com um outro modo de realização da presente invenção, recorrer-se-à à técnica de síntese em solução homogénea descrita por HOUBENWEYL na obra intitulada Méthode der Organischen Chemie (Método da Química Orgânica) editada por E. WUNSCR, vol. 15-I e II, THIEME, Stuttgart, 1974.

Este método de síntese consiste em se condensar sucessivamente dois a dois os aminoácidos sucessivos na ordem requerida, ou em se condensar aminoácidos e fragmentos previamente formados e contendo já vários aminoácidos na ordem apropriada ou ainda vários fragmentos previamente assim preparados, entendendo-se que se terá o cuidado de proteger previamente todas as funções reactivas transportadas por estes aminoácidos ou fragmentos, com excepção das funções amina de um e carboxilo de outro, ou vice-versa, que devem normalmente intervir na formação das ligações peptídicas, nomeadamente após activação da função carboxilo, de acordo com os métodos bem conhecidos na síntese dos péptidos. Como variante poder-se-à recorrer a reacções de acoplamento com recurso a reagentes de acoplamentos clássicos, do tipo carbodiimida, tais como, por exemplo, a 1-etil3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida. Quando o aminoácido utilizado tem uma função ácida suplementar (particularmente no caso do ácido glutâmico), estas funções serão, por exemplo, protegidos por grupos éster t-butílico.

A presente invenção refere-se igualmente a um hospedeiro celular transformado por um vector recombinante entre os que foram anteriormente descritos e competentes para assegurar a expressão da inserção contida neste vector recombinante.

A título de exemplo, a expressão da partícula híbrida recombinante HIV-HBs pode ser assegurada em diferentes tipos celulares por vectores plasmídicos ou virais, por exemplo os pox vírus (do tipo do vírus da vacina, os adenovírus, os baculo vírus). As técnicas de infecção ou de transferência, consoante se trate de vírus ou de plasmideo, são bem conhecidas dos especialistas na matéria. Poder-se-à para isso reportar-se à patente de invenção francesa nº 245.136 ou ao pedido de patente de invenção europeia publicada com o nº 265.785.

A título de exemplo de hospedeiros celulares adaptados para a realização da presente invenção, mencionar-se-à células eucariotas de mamíferos, por exemplo células CHO, ou ainda leveduras por exemplo Sacchoromyces cerevisiae.

Os processos de transformação utilizados para se obter a expressão da inserção do vector (e da evidência do produto da expressão) são clássicos, como se verifica dos Exemplos que se seguem.

Por outro lado, a presente invenção diz, respeito a uma composição vacinante contra infecções devidas a um retro-vírus HIV, caracterizada pelo facto de compreender como ingrediente activo, partículas recombinantes híbridas tais como as descritas nas páginas anteriores, em associação com um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

A administração destas composições a um paciente poder-se-à fazer utilizando doses contendo entre cerca de 5 e

cerca de 20 μ g de partículas recombinantes híbridas purificadas por dose. Estas doses serão, por exemplo, administradas três vezes com um mês de intervalo.

A presente invenção diz igualmente respeito a um processo para a preparação de um vector recombinante, caracterizado pelos seguintes passos;

- recombinação genética in vitro , eventualmente sob o controlo de um promotor reconhecido pelas polimerases de um hospedeiro celular eucariota apropriado, por um lado, de uma sequência nucleotídica exógena que codifica para uma sequência de aminoácidos imunogénica, induzindo anticorpos neutralizadores face a um retrovírus da família HIV ou susceptível de ser reconhecida por esses anticorpos, comportando esta sequência exógena pelo menos um epítopo susceptível de ser reconhecido pelos linfócitos B e pelo menos um epítopo susceptível de ser reconhecido pelos linfócitos T, e, por outro lado, um encadeamento de nucleótidos correspondente à região S e eventualmente a toda ou parte da região pré-S do genoma do vírus da hepatite B e

- recuperação do vector recombinante formado que comporta os elementos anteriormente definidos.

Um processo semelhante pode ser aplicado para se obter a formação de um vector recombinante anteriormente definido, no qual a sequência exógena inserida codifica para uma sequência de aminoácidos comportando, além disso, um sítio de ligação ao receptor CD4.

A recuperação do vector recombinante pode efectuar-se mediante processos conhecidos, particularmente por hibridação selectiva com, por um lado, sondas nucleotídicas características das sequências correspondentes do genoma de um retrovírus HIV, por outro lado, com sondas características da região S do genoma do vírus da hepatite B.

A presente invenção diz igualmente respeito a composições para o diagnóstico in vitro de uma infecção devida a HIV mediante detecção da presença de anticorpos neutralizadores em um meio biológico de um paciente. Tais composições compreendem partículas híbridas recombinantes que exprimem à sua superfície um ou vários dos polipéptidos ou péptidos de HIV-1 ou HIV-2 ou SIV, ou uma mistura destas partículas híbridas recombinantes.

A presente invenção diz igualmente respeito à utilização destas partículas híbridas recombinantes para realizar um teste de diagnóstico in vitro da presença de anticorpos resultantes de uma infecção causada por HIV, caracterizada pelo facto de:

- se fazer contactar um meio biológico de um paciente com partículas recombinantes híbridas,
- se fazer a detecção do produto da reacção eventualmente formado, a saber, um complexo antigénio-anticorpo.

Os meios para a detecção do complexo antigénio-anticorpo são os conhecidos dos especialistas na matéria, nomeadamente a marcação radioactiva. O teste poderá, de acordo com a composição das partículas híbridas recombinantes, ser aplicado para

o diagnóstico selectivo de HIV-1 ou HIV-2, ou para o diagnóstico não selectivo graças à utilização de composições contendo partículas que exprimem à sua superfície sequências de HIV-1 e de HIV-2 ou uma sequência característica dos dois vírus simultaneamente.

A presente invenção diz igualmente respeito a um processo para o diagnóstico in vitro de uma infecção devida a HIV, caracterizado pelo facto de compreender os seguintes passos;

- contacto entre uma composição definida antes e um meio biológico de um paciente susceptível de conter anticorpos neutralizadores contra HIV,

- detecção da formação de um eventual complexo antigénio-anticorpo.

Por meio biológico entende-se toda a amostra susceptível de conter anticorpos, tal como o soro de um paciente.

A presente invenção diz ainda respeito a um processo para a produção das partículas híbridas recombinantes definidas antes, caracterizado pelo facto de compreender os seguintes passos:

- transformação de um determinado hospedeiro celular com um vector recombinante tal como descrito antes, em que o promotor eventualmente presente no vector é reconhecido pelas polimerases do hospedeiro celular transformado,

- cultura do hospedeiro celular num meio apropriado e

recuperação das partículas formadas, mais particularmente as excretadas no meio de cultura. Estas partículas são, então, caracterizáveis não somente pelas suas características morfológicas e pela sua reactividade imunológica com anticorpos anti-HBs, mas igualmente pela sua aptidão para serem reconhecidas pelos anticorpos anti-HIV correspondentes ou para induzir esses anticorpos.

A presente invenção diz igualmente respeito à utilização dos fragmentos imunogénicos de aminoácidos descritos antes, sós ou em misturas, como antigénios de imuno-ensaios para a detecção in vitro de anticorpos, em particular de anticorpos neutralizadores, particularmente a seguir à vacinação.

A presente invenção diz, portanto, igualmente respeito a um método de doseamento in vitro da presença de anticorpos dirigidos contra um retrovírus do tipo HIV, em particular para o doseamento de anticorpos neutralizadores a seguir à vacinação, caracterizado pelo facto de compreender os seguintes passos:

- contacto dos fragmentos imunogénicos de aminoácidos descritos, marcados de modo a permitir o doseamento ulterior, com o meio biológico a testar, em condições apropriadas para permitir a reacção entre os ditos fragmentos e o meio,

- doseamento dos referidos fragmentos que reagiram com o meio.

A presente invenção diz igualmente respeito a um conjunto ("Kit") de diagnóstico in vitro de anticorpos anti-HIV, em um meio biológico, em particular de anticorpos neutraliza-

dores a seguir à vacinação, caracterizado pelo facto de compreender:

- fragmentos imunogénicos de aminoácidos tais como os descritos antes,
- meios adaptados para a revelação da reacção antigénio-anticorpo.

Os meios de revelação consistem, por exemplo, em anticorpos capazes de reconhecer o conjugado formado entre os antigénios e os anticorpos do meio biológico.

Outras características e vantagens particulares da presente invenção aparecerão nos exemplos que se seguem e que são ilustrados pelas figuras.

MATERIAIS E MÉTODOS

Construção de vector

M13tg130 é um vector de clonagem derivado do bacteriófago M13. De acordo com o descrito por KIENY e colab. (14), contém na sequência 5' do gene que codifica para a beta-galactosidase, 11 sítios únicos de restrição constituindo um poliadaptador ("polylinker") (ver figura 1). A inserção de fragmentos de ADN exógeno neste "polylinker" pode ser detectada pela ausência de colónias por X-gal. A selecção das placas azuis mediante hibridação in situ permite a detecção dos fragmentos de ADN inseridos em fase.

O vector de expressão de HBsAg, pSVS (11) foi

modificado para lhe inserir o segmento EcoRI - SalI do ADN de M13tg130 que contém 10 sítios de restrição entre os sítios EcoRI e XhoI da região pré-S2 do genoma do vírus da hepatite B também designado por HBV (abreviatura inglesa de Hepatitis B virus). A fusão entre os sítios de restrição SalI e XhoI restaura o quadro de leitura na região pré-S2. A região pré-S1 do vector resultante pM2S foi eliminada em seguida. O vector obtido foi designado por pSV2S. Nesta construção, a fusão entre o ADN clonado e o gene S adjacente à região pré-S2 é colocado sob o controlo directo do promotor precoce de SV40.

Utilizando meios análogos, obteve-se um vector designado por pSVS XL mediante recombinação entre pSVS e pM2S ao nível dos sítios XhoI e SmaI respectivamente.

Transferência das células animais

Células do ovário de hamster chinês dhfr⁻(CHO) do clone DXB11(15) foram mantidas sob a forma de monocamada em um meio Ham F12 completado com 10% de soro fetal de bovino. As células foram transferidas utilizando o método do fosfato de cálcio descrito na referência (16) com um choque de glicerol 6 horas mais tarde (Parker e colab., 1979). Uma co-transferência com o vector pSV2 dhfr de acordo com o princípio referido na referência (17) permite a selecção dos clones estáveis que exprimem as proteínas de fusão com HbsAg (também chamadas proteínas recombinantes). A amplificação das sequências transformadas foi obtida procedendo a uma cultura celular na presença de concentrações crescentes de metotrexato (MTX) (18).

Produção e purificação das partículas recombinantes
de HIV-HBsAg.

Clones estáveis exprimindo as partículas recombinantes de HBsAg foram cultivados até à confluência e foram alimentados de três em três ou de quatro em quatro dias com um meio de cultura que continha apenas 5% de soro fetal de bovino. Os sobrenadantes de culturas celulares foram recuperados, clarificados e as partículas de HBsAg foram concentradas mediante precipitação com sulfato de amónio e purificadas com duas tomas em um gradiente isopienico de CsCl seguido por um gradiente de velocidade em sacarose de 0 a 20%.

Imuno-manchas

Submeteu-se cerca de 1 μ g de partículas recombinantes purificadas à ebulição em um tampão de Laemmli, separou-se mediante electroforese em gel de poliacrilamida dodecil-sulfato de sódio a 12,5% (NaDodSO₄) e electrotransferiu-se sobre filtros de nitrocelulose (SCHLEICHER & SCHULL).

As proteínas imobilizadas sobre os filtros reagiram com os diferentes anti-soro seguintes:
a-p49a (19), anti-soro anti-péptido de coelho específico de HBsAg, 18/7 (20) anticorpos específicos da região pré-S1 de HBV e um anti-soro dirigido contra as regiões da GP160 de HIV-1 (figura 2) obtido a partir de coelhos utilizando péptidos sintetizados ligados com uma soro-albumina bovina (BSA : abreviatura inglesa de "bovine serum albumine") ou a hemocianina de "limpet Keyhole" (abreviatura inglesa: KLH).

As proteínas imunoreactivas finais foram eliminadas por anticorpos anti-coelho ou por imunoglobulinas de murganhos conjugados com a peroxidase (AMERSHAM) e foram reveladas com diaminobenzidina.

Imunizações e determinações da produção de anticorpos

Imunizou-se coelhos duas ou três vezes, com um mês de intervalo, mediante injeção intradérmica de cerca de 4 μ g de partículas recombinantes de HBsAg purificadas (quadro 1) no adjuvante completo de Freund. Os soros obtiveram-se 30 dias depois da última injeção.

Estes anti-soros foram testados para conhecer o seu nível de produção de anticorpos, pelo método ELISA ("Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay"), utilizando, em fase sólida, partículas HBsAg derivadas do plasma (Hevac B.Pasteur, produzido por Pasteur Vaccins France) ou péptidos sintéticos característicos de HIV (ver figura 2). Os péptidos sintéticos foram fornecidos pelo Dr. ROCHAM (UA. 553, CNRS MARSEILLE). Todos os antígenos foram utilizados a uma concentração de 1 μ g/ml sobre placas de microtitulação (FALCON "Probind") e os testes ELISA foram realizados de acordo com o descrito por CHARBIT e colab. (21).

Ensaio dos anticorpos neutralizadores

Para demonstrar a actividade neutralizadora dos anticorpos contidos nos soros, utilizou-se linfócitos estimulados do sangue periférico humano (PBL). Estas células foram utilizadas

pela sua sensibilidade à infecção com HIV. Foram utilizadas diferentes amostras de um isolado LAVBRU descrito por MONTAGNIER e colab. (22) como inóculo de vírus. Pré-incubou-se cada diluição de soro com um volume igual de inóculo viral durante 1 hora a 37°C. Em seguida, adicionou-se a mistura a uma quantidade de $4 \cdot 10^6$ PBL humanos em um meio RPMI 16-40 completado com 10% de soro fetal de bovino contendo 20 U./ml de interleucina, 2,2 μ g/ml de polibreno e 25 U./ml de soro anti-interferão.

Depois de 1 hora de incubação a 37°C, as células foram lavadas e cultivadas em meios RPMI completos. Os sobrenadantes foram retirados duas vezes por semana e as mesmas diluições dos soros testados foram adicionadas nos novos meios as duas primeiras vezes. Congelou-se os sobrenadantes a -70°C e ensaiaram-se para conhecer a sua actividade de transcriptase inversa (actividade RT) (23).

RESULTADOS

Clonagem dos fragmentos do gene do invólucro de HIV 1 em um vector de expressão eucariota de HBsAg

A clonagem realizou-se em dois passos:

Num primeiro passo, construiu-se um banco genómico de expressão, no bacteriófago M13tg130 e transferiu-se os fragmentos de ADN seleccionados no vector de expressão do HBsAg. O bacteriófago M13tg130 é um vector de clonagem e de sequenciação comportando ao nível do quinto codão do gene lacZ de E.coli, um

"polylinker" (poliadaptador) com 11 sítios de restrição únicos. Clonou-se fragmentos de ADN do genoma de HIV cortados ao acaso e comportando 50 a 1000 pares de bases nos sítios SmaI e EcorV do bacteriófago M13tgl30 (figura 1). A hibridação in situ e a sequenciação permitiram localizar precisamente o fragmento clonado na região que codifica para o invólucro de HIV 1.

Os fragmentos de HIV seleccionados foram transferidos no vector de expressão de HBsAg, pSV2S (figura 1). O pSV2S é obtido por modificação de um vector de expressão pSVS anteriormente descrito na parte "Materiais e métodos". O pSVS comporta a sequência de SV40 que contém a origem da replicação, os promotores tardio e precoce, o activador e os sítios de iniciação de ARNm. Encontram-se na vizinhança imediata do promotor precoce, sequências de HBV que contêm a região genómica pré-S2, o gene S, e uma sequência que permite a poliadenilação do ARN mensageiro do HBsAg. No vector pSV2S, a parte da região pré-S2 foi eliminada e substituída pelo poliadaptador M13tgl30. Nesta construção, o poliadaptador permite a inserção de um fragmento de ADN em fase com a região pré-S2 e o gene S. Assim, qualquer fragmento clonado no quadro de leitura correcto do gene LacZ no bacteriófago M13tgl30 pode ser facilmente transferido em fase com o gene S no vector de expressão pSV2S.

Um outro derivado de pSVS é o vector pSVS XL, no qual o adaptador M13tgl30 permite facilmente a inserção em fase de uma sequência exógena na região pré-S2. Nesta construção, os antigénios pré-S1 e pré-S2 são expressos de modo adjacente com o antigénio estranho.

Entre os fragmentos correspondentes ao invólucro de HIV e obtidos no banco, três foram estudados em pormenor,

O clone nº 2. contém uma inserção de HIV formada por 52 pares de bases (pb) (nucleótidos 6440 a 6491), situada na parte média na sequência que codifica para a GP 120 (figura 2). Cobre uma região conservada entre os diferentes isolados de HIV1 (3).

O clone nº 8. contém uma inserção de HIV de 252 pares de bases (nucleótidos 6915 a 7166), que corresponde à parte sub-carboxiterminal da proteína GP120 (figura 2). Esta região está relativamente bem conservada entre os diferentes isolados e apresenta uma homologia com a região constante da cadeia pesada da imunoglobulina (referência 24). Além disso, uma parte do fragmento de ADN codifica para um domínio implicado na ligação da proteína GP120 ao receptor do vírus, a molécula CD4 (referência 25).

O clone nº 6. contém uma inserção de HIV que comporta 55 pares de bases (nucleótidos 7306 a 7360) situado numa região que codifica para a parte amino-terminal da proteína transmembranar GP41. Esta região é conservada nos isolados de HIV e partilha uma homologia com a proteína de fusão de outros vírus (26).

Expressão das proteínas de fusão HIV-HBV nas células transferidas.

Os vectores de expressão de HBsAG que contêm

os fragmentos do gene do invólucro de HIV-1 foram utilizados para transferir células CHO. Os clones estáveis que exprimem HBsAg, detectados por um teste RIA específico para a proteína maior do invólucro de HBV foram separados para detectar a expressão do gene heterólogo. Foram em seguida caracterizados mediante análise de acordo com o método dito "Northern blot" e observou-se o ARN mensageiro híbrido. As partículas segregadas foram em seguida purificadas a partir do sobrenadante de cultura celular mediante um processo utilizado para as partículas de HBsAg (11). As partículas recombinantes HIV-HBsAg têm aproximadamente a mesma densidade em um gradiente Cscl que as partículas nativas. As proteínas das partículas recombinantes foram separadas mediante electroforese em gel de poliacrilamida NaDodSO₄, transferidas sobre filtros de nitrocelulose e testadas com anti-soros obtidos a partir de coelho e dirigidos contra o péptido sintético que corresponde quer à partícula HBsAg, quer aos determinantes do invólucro de HIV (figura 3).

Foram observados os seguintes resultados:

Partícula recombinante nº. 2: além da proteína maior HBsAg e da proteína correspondente sob a forma glicosilada GP26, o soro anti-p49a revelou 4 bandas no intervalo compreendido entre 27 000 e 32 000 daltons correspondente à proteína média (figura 3A, linha 1). As 4 bandas são igualmente fortemente reveladas por um soro dirigido contra o péptido de HIV1 homólogo (pep 5) (figura 3A, linha 1). Isto demonstrou que a partícula recombinante HBsAg nº 2 comporta um determinante estranho. As quantidades de proteínas média e maior são praticamente as mesmas. A proteína média fundida está presente sob quatro formas, em função da glico-

silacção das regiões de HBV (1 sítio de glicosilação) e de HIV (2 sítios possíveis de glicosilação).

Partícula recombinante nº 8: o soro anti-p49a revelou uma proteína maior de HBsAg sob duas formas (P22 e GP26) assim como bandas que correspondem a um peso molecular compreendido entre 37 000 e 46 000 (figura 3B, linha 1). Soros dirigidos contra dois péptidos homólogos nº.6 e nº7 revelaram a mesma repartição de proteínas pesadas (figura 3B, linhas 2 e 3) demonstrando a presença de um determinante de HIV nas partículas. A quantidade de proteína média fundida é menos importante que a quantidade de proteína maior. A proteína de 37 Kd corresponde à proteína de fusão não glicosilada e as proteínas de maior peso molecular correspondem às formas glicosiladas (5 sítios possíveis de glicosilação na parte HIV).

Os soros anti-péptidos revelaram igualmente uma proteína de 67 Kd que corresponde à sero-albumina co-purificada.

Partícula recombinante nº 6: o soro anti-p49a revelou uma proteína maior HBsAg e sua contraparte glicosilada mas não revelou proteína média (figura 3C, linha 1). Observou-se um triplete de bandas de elevados pesos moleculares; foi igualmente revelada por um anticorpo monoclonal contra o antigénio pré-S1 (figura 3C, linha 2). O tamanho destas proteínas é compatível com o da grande proteína HBsAg, que comporta o péptido estranho nas suas formas glicosilada e não glicosilada.

Resposta imunitária humoral às partículas recombinantes HBsAg.

Imunizou-se coelhos duas ou três vezes com um mês de intervalo, com cada uma das partículas recombinantes HBsAg anteriormente referidas, em um adjuvante de Freund completo (ver "Materiais e Métodos"). A especificidade da resposta imunitária foi determinada por um teste ELISA utilizando partículas derivadas do plasma e diferentes péptidos correspondentes de HIV-1. Testou-se igualmente anti-soros contra péptidos pré-S2 (sequência de aminoácidos da proteína do invólucro de HBV compreendida entre os números 120 e 145, inclusivé) (Quadro 1).

Todos os coelhos desenvolveram anticorpos contra partículas HBsAg nativas, a diferentes níveis. A resposta mais fraca foi obtida para o recombinante nº 8, o que se pode explicar pelo tamanho relativamente grande do antigénio estranho (84 aminoácidos) que pode entrar em competição com os determinantes HBsAg ou dissimulá-los. Pelo contrário, a melhor resposta dirigida contra o péptido estranho foi obtida com este recombinante nº 8, o que sugere, neste caso, uma apresentação predominante dos anti-génicos HIV em relação aos determinantes antigénicos de HBsAg.

Nos recombinantes nº 2 e nº 6, os antigénios exógenos pertencentes a HIV são menores e de tamanho comparável (18 aminoácidos e 20 aminoácidos). As respostas dirigidas contra os péptidos observados nos dois casos são mais fracas que as dirigidas contra as partículas HBsAg nativas. A proporção de proteína de fusão em relação à proteína maior nativa é elevada no recombinante nº 2 (ver figura 3). Estes resultados sugerem uma fraca imunogenicidade da sequência inserida neste recombinante. Uma resposta com os péptidos pré-S2 obtém-se unicamente para o

recombinante nº6 resultante da expressão no vector pSV XL (figura 1). Anti-soros de dois outros coelhos imunizados com partículas obtidas por expressão no vector pSV2S são negativos e servem de controlo.

Neutralização da infecção devida a HIV
in vitro pelos soros imuno-dirigidos contra as
partículas recombinantes nº8.

Imunizou-se coelhos com partículas recombinantes HIV-HBsAg e testou-se os soros para avaliar a sua capacidade para neutralizar o isolado LAV-1_{BRU} (24). Estudou-se a infecção viral nos linfócitos do sangue periférico graças à actividade de transcriptase inversa (RT) durante três a quinze dias. O ensaio realizado baseou-se na redução da actividade RT na presença de soro imune, sendo o resultado comparado com o resultado obtido na presença de soro pré-imune do mesmo coelho.

Neste teste, os anticorpos não podem neutralizar eficazmente o vírus se estiverem presentes quantidades saturantes de viriões infecciosos.

Por este motivo, os testes realizaram-se a partir dos diferentes anti-soros diluídos (1:50) para neutralizar as diferentes amostras de vírus (figura 4A, 4B, 4C). O soro do coelho imunizado com a partícula recombinante nº.8 neutralizou integralmente a infectividade viral do vírus menos infeccioso (figura 4) e observou-se uma diminuição da actividade RT de 95% a 63% e 35% quando se aumentou a infectividade da amostra viral (figura 4D). Isto mostra que a capacidade de neutralização dos

anti-soros é função da quantidade de vírus.

Anti-soros correspondentes às partículas re-combinantes nº.6 deram uma fraca neutralização com uma pequena concentração de vírus, mas não se pôde detectar uma redução da actividade RT com o anti-soro de coelho imunizado com o recombinante nº. 2, mesmo para uma baixa concentração de vírus.

Além disso, a neutralização de diferentes isolados de HIV1 foi examinada mediante utilização de uma concentração constante de vírus com uma diluição variável dos anti-soros dirigidos contra a partícula recombinante nº.8.

A figura 5 mostra uma redução de 50% da capacidade infecciosa do isolado LAV_{BRU} com uma diluição de 1:50 comparada com o soro pré-imune.

A actividade neutralizante deste anti-soro contra o isolado zairense de HIV 1 foi igualmente demonstrada: observou-se um efeito neutralizante de 50% para uma diluição de 1:25, sobre LAV_{ELI} (3) (figura 5).

DISCUSSÃO

A glicoproteína interna do invólucro de HIV1, GP120, à partida interessante pela sua capacidade para induzir uma resposta imunitária protectora em relação a HIV, contém regiões conservadas, e outras regiões variáveis entre os diferentes isolados de HIV. As sequências conservadas no interior dos domínios constantes poderiam corresponder a regiões de sequências com uma importância funcional potencial. Como o demonstram os re-

sultados apresentados adiante, estas diferentes regiões conservadas do invólucro de HIV1 foram escolhidas e expressas sob a forma de proteínas de fusão com a proteína média do antígeno de superfície da hepatite B.

A partícula HBsAg apresenta boas propriedades imunogénicas, de acordo com dois aspectos explorados pelos inventores:

- i) é um polímero de alto peso molecular que comporta à sua superfície numerosas cópias de determinantes antigénicos;
- ii) comporta igualmente epitopos T que podem ser úteis no reconhecimento de epitopos B estranhos pelo sistema imunitário (27).

Entre as três diferentes regiões conservadas de HIV estudadas antes, uma de entre elas (clone nº8) está ligada ao sítio de ligação CD4 (25), uma outra (clone nº6) poderá estar implicada no processo de fusão (26) e a terceira (clone nº2) não está ligada a nenhuma actividade biológica conhecida.

As partículas recombinantes HIV-HBsAg obtidas mediante fusão destes determinantes antigénicos com o produto do gene da região pré-S2 foram estudadas mediante utilização de anticorpos dirigidos contra péptidos homólogos sintéticos. Análises de marcha de Western permitiram demonstrar a presença de determinantes antigénicos HIV sobre as partículas e a provável glicosilação das proteínas de fusão. As proporções de proteína de fusão e de proteína nativa maior observadas nas diferentes partículas recombinantes são variáveis. Para o recombinante nº8, a proteína de fusão é aparentemente menos abundante, o que pode

estar ligado ao tamanho relativamente importante da sequência estranha inserida. O tamanho de origem do produto de tradução pré-S2 de HBV é de 55 aminoácidos enquanto a construção da proteína de fusão aumenta este tamanho até 111 aminoácidos. O tamanho da proteína a fundir poderia contrariar a sua inserção nas partículas de HBsAg.

Para os recombinantes nº6 e nº2, a proporção entre a proteína de fusão e a proteína maior é comparável à observada entre a proteína média e a proteína maior nas partículas obtidas mediante transferência do vector de expressão pSV5 das partículas HBsAg de origem (11).

A imunogenicidade das partículas recombinantes HIV-HBsAg foi anteriormente referida. A resposta humoral é dirigida contra duas regiões antigénicas e mostra que os epitopos estranhos estão presentes de modo eficaz à superfície das partículas.

A actividade biológica dos anticorpos foi testada quando do ensaio de neutralização in Vitro. Epitopos neutralizantes e não-neutralizantes foram postos em evidência nas proteínas do invólucro de HIV. Anticorpos dirigidos contra os recombinantes nº8 têm um efeito neutralizante potencial sobre o isolado HIV (LAV_{BRU}) utilizado na origem para fabricar proteínas de fusão. Um efeito menor foi observado quando os anticorpos reagiram com um isolado de HIV1 diferente (LAV_{ELI}). A inserção de HIV utilizada no recombinante nº8 cobre duas regiões relativamente bem conservadas entre os diferentes isolados de HIV1, estando estas duas regiões separadas por uma região hipervariável característica do isolado. Nesta região CEASE e colab. identificaram

um epítopo de célula T (30).

Além disso, experiências com recurso a anticorpos monoclonais dirigidos contra a GP120 assim como experiências de mutagénese in vitro permitiram identificar uma sequência importante para a interacção com o receptor CD4 (25). Sabe-se igualmente que uma proteína de fusão foi produzida em E. coli que comportava uma sequência sobreposta em parte à sequência anterior utilizada e era capaz de levar à formação de anticorpos neutralizadores e a uma resposta imunitária celular (31). No sistema HBsAg, as proteínas de fusão podem ser glicosiladas normalmente, o que pode ser um elemento importante para a produção de anticorpos tendo uma forte afinidade para epítopos e capazes de bloquear a interacção da proteína do invólucro de HIV e do receptor CD4. Além disso, o determinante antigénico de HIV parece melhor exposto à superfície das partículas que na proteína viral nativa GP. A menor eficácia da neutralização observada com o isolado zairese LAV_{ELI} pode ser atribuída à variação da sequência de aminoácidos de cerca de 30% numa região determinante para a interacção entre o vírus e o receptor CD4 (25).

Os anticorpos dirigidos contra os recombinantes nº.2 e nº.6 foram igualmente ensaiados em experiências de neutralização. As sequências de HIV que comportam o recombinante nº.2 não induziram anticorpos neutralizadores quando destas experiências. Uma resposta imunitária fraca dos animais utilizados ou uma fraca imunogenicidade da região implicada no recombinante nº. 2 poderia explicar este resultado. A parte amino-terminal da GP41 poderia estar implicada no processo de fusão e em consequência

na neutralização viral.

Testou-se igualmente o efeito potencial dos anticorpos obtidos mediante imunização com o recombinante nº.6 em relação à infectividade de HIV1. O efeito neutralizador é fraco e a inibição da formação das Sincítia não é completa. Este resultado poderia ser atribuído ao tamanho limitado da inserção de HIV.

Os inventores realizaram, portanto, um sistema potencialmente capaz de permitir a apresentação dos determinantes antigénicos estranhos do invólucro de HIV, permitindo este sistema, além disso, a produção de anticorpos neutralizadores dirigidos contra uma região da proteína do invólucro que apresentaria sob a forma nativa propriedades imunogénicas fracas ou não estaria presente à superfície nesta proteína nativa.

Por outro lado, a justaposição de determinantes antigénicos de HBV e de HIV à superfície da mesma partícula imunogénica pode permitir a realização de vacinas polivalentes.

IMUNIZAÇÃO DE MACACOS COM PARTÍCULAS HIV/HBsAg

As partículas obtidas de acordo com o processo anteriormente descrito mediante fusão com uma sequência de 84 aminoácidos (AA 384 a 472) da glicoproteína exterior do invólucro de HIV-1 no interior da parte pré-S2 da proteína central HBsAg foram utilizadas num teste em macacos para testar a produção de anticorpos neutralizadores.

Para demonstrar que estas partículas híbridas induzem uma resposta humoral assim como uma resposta imune mediada

pelas células T, em relação a HIV, em primatas, imunizou-se macacos quer com partículas híbridas, quer com partículas HBsAg nativas.

Imunizou-se dois macacos com partículas purificadas HIV/HBsAg, mediante 3 injeções sub-cutâneas com um mês de intervalo. Estes macacos receberam, em seguida, um reforço, ("rappel") por duas vezes, três meses mais tarde. Imunizou-se um macaco controlo com 4 doses de partículas HBsAg nativas, de acordo com o mesmo protocolo. Colheram-se amostras de sangue em cada animal, antes e depois de cada imunização. A resposta imune humoral é seguida por meio de um teste ELISA (figura 7) utilizando quer as partículas nativas HBsAg quer os péptidos sintéticos homólogos de HIV (Péptido 6:AA 373-398, péptido 7:AA 421-441, ver figura 3) sobre a fase sólida.

Os títulos anti-HBs apresentaram um pico 3 semanas depois da terceira dose de vacina e em seguida uma queda. Um segundo pico dos títulos observou-se depois da imunização de reforço ("rappel"), excepto no macaco Mac S cujo título de anticorpos permaneceu constante após a quarta injeção e aumentou lentamente depois da quinta injeção. Anticorpos anti-HIV foram detectados mediante um teste ELISA utilizando os dois péptidos. Os títulos atingiram um nível máximo três semanas depois da segunda injeção (Mac H) ou depois da segunda injeção (Mac S) e descaram, em seguida, lentamente. Contudo, a resposta anti-HIV parece atingir um patamar depois da segunda injeção.

Do mesmo modo que para os títulos anti-HBs, detectou-se um efeito de reforço ("rappel") da 4ª dose com o soro



de Mac H.

No macaco controlo Mac A imunizado com partículas nativas HBsAg, detectou-se um título de anticorpos anti-HBs elevado depois da 3ª injeção com um aumento depois da dose de reforço ("rappel"). Não se detectou nenhum anticorpo anti-HIV fazendo reagir os péptidos de HIV com um qualquer dos soros deste animal de controlo.

Estes estudos demonstram que a imunização com duas doses das partículas híbridas parece suficiente para estabelecer uma memória imunológica e que as doses de reforço ("rappel") são necessárias para manter o título elevado da resposta imune.

Para determinar se uma resposta imune por intermédio das células T em relação às duas partes da partícula híbrida podia ser detectada em macacos vacinados, testou-se linfócitos do sangue periférico (PBL) em relação à sua capacidade para proliferar e para incorporar timidina 3H em resposta a uma estimulação com partículas HBsAg nativas ou com partículas HIV/HBsAg assim como de HIV purificado inactivado por aquecimento. Como controlo interno da proliferação dos PBL, utilizou-se uma concanavalina A mitogénica. Os PBL de cada macaco foram isolados antes da imunização e 21 dias depois da segunda e da terceira injeção, assim como antes e depois do "rappel" com as partículas HBsAg. Cultivaram-se em um meio só ou em um meio estimulado durante 4 dias com HBsAg ou Con A e durante 5 dias com HIV-1.

As curvas de resposta características das doses, obtidas 21 dias depois da primeira dose de vacina, estão

representadas na figura 8. Os PBL de Mac H incorporam 8 vezes mais timidina ^3H em resposta à estimulação com uma concentração óptima de partículas HIV/HBsAg e 6 vezes mais em resposta à estimulação com partículas HBsAg nativas que PBL não estimulados. Logo que são estimulados com a concentração óptima de HIV, os PBL de Mac H incorporam 5 vezes mais timidina ^3H que os PBL estimulados com o meio só. O macaco Mac A de controlo foi testado em relação à sua resposta proliferativa em PBL 21 dias depois da 3ª. injeção com as partículas nativas HBsAg. Os PBL de Mac A proliferam em resposta à estimulação quer com as partículas HBsAg nativas, quer com as partículas HBsAg híbridas, mas não proliferam em resposta a uma estimulação com HIV, qualquer que seja a concentração utilizada.

Testou-se a resposta proliferativa dos PBL aos imunozomas obtidos com as glicoproteínas purificadas rgp160 ou gp 160 nativas. Os PBL de Mac H isolados 3 meses depois da última injeção são estimulados com HIV-1 purificado ou com imunozomas gp160 mediante utilização de diferentes doses (Quadro 1). Pelo contrário, as gp160 recombinantes produzidas em um sistema de vacina não induzem resposta proliferativa. Os PBL de Mac A colhidos 57 dias depois da última injeção não proliferam quando são estimulados com um antigénio qualquer. Estes resultados demonstram que a maturação do fragmento gp120 no antigénio particular da presente invenção está mais próximo da maturação da glicoproteína unida no virião ou nas formas imunozomas que sob a forma monomérica.

A proliferação específica do PBL em resposta



a HBsAg ou ao HIV foi igualmente seguida para cada animal durante o protocolo de imunização.

A figura 9 resume os resultados da proliferação linfocitária em resposta à estimulação com HIV/HBsAg, com HBsAg ou com HIV. Testou-se várias concentrações de cada antigénio e mediu-se as respostas nos 4º e 5º dias. Nos macacos, o pico de proliferação é obtido no 4º. dia mediante utilização de HBsAg a uma concentração óptima de 250 ng/ml e nos 5º. e 6º. dias com HIV utilizando uma concentração óptima de 500 ng/ml. A resposta proliferativa máxima às partículas híbridas HIV/HBsAg e às partículas HBsAg observou-se depois da segunda injeção e é sempre superior à resposta obtida depois da estimulação com partículas nativas HBsAg para os 2 macacos imunizados com as partículas híbridas.

A resposta de Mac H é melhor em relação a HBsAg que a resposta de Mac S quer ao nível B (ver figura 7) quer ao nível T. A resposta proliferativa depois da terceira imunização é mais fraca que depois da segunda injeção. Contudo, é encontrada uma boa proporção de células que reagem com o antigénio, 3 meses depois da terceira injeção (Mac H). A imunização de "rappel" induz um ligeiro crescimento da resposta proliferativa dos PBL. Observa-se uma diferença importante entre a resposta proliferativa a HIV dos PBL para os dois macacos. Os PBL de Mac S proliferam de modo significativo somente depois da terceira injeção e depois das doses de "rappel" enquanto os PBL de Mac H proliferam de modo significativo à estimulação HIV num momento qualquer depois da imunização.

Como se observou com HBsAg, a resposta proliferativa a HIV aumenta muito pouco com o "rappel" mas persiste ao mesmo nível 3 meses depois da última injeção (Mac H). Em consequência, o protocolo de imunização pode ser adaptado modificando a dose de reforço ("rappel").

A resposta dos PBL de Mac S a HIV e a HBsAg é menor e perde-se 3 meses depois da última injeção provavelmente devido à pequena quantidade de células que reagem aos antígenos induzida pela vacinação destes animais.

A comparação da resposta proliferativa em relação a todos os antígenos testados mostra que os PBL são estimulados da mesma forma por HIV ou por HBsAg nativa (Mac H). O índice de estimulação (SI) é comparável, excepto no 52º. dia, em que aparece um número significativamente mais elevado de células T específicas de HBsAg. Estes resultados demonstram que a resposta imune a HIV e a HBsAg mediada pelas células é induzida nos macacos depois da vacinação com partículas híbridas HIV/HBsAg e que a cinética desta resposta varia em função do animal.

Utilizando a partícula HBs que comporta um fragmento da glicoproteína de envoltório gp120 de HIV (AA384-472) que contém o sítio de ligação CD4, obtiveram-se anticorpos, assim como uma resposta das células T dirigida contra as duas partes da proteína de fusão (HBsAg e HIV).

As partículas HBsAg constituem um bom veículo para a apresentação dos epitopos de HIV e permitem a indução nos macacos imunizados de uma resposta humoral, assim como de uma

resposta imune mediada pelas células T, em relação a um domínio funcional da proteína de envólucro gp120.

Outras características e propriedades da presente invenção aparecerão nas figuras que se seguem cujas legendas são apresentadas a seguir:

LEGENDAS DAS FIGURAS

- Figura 1

Vector da expressão e de clonagem dos fragmentos do gene do envólucro de HIV. M13tg130 é um vector de clonagem dos fragmentos de ADN de HIV. A região sombreada representa a parte N-terminal do gene da β -galactosidase. Nesta região, encontra-se um adaptador que apresenta múltiplos sítios de clonagem. El: EcoRI, sm: Sma I, Ss: SstI; EV: EcoRV, Sp: SphI, K: Kpn I, Xb: Xba I, H: Hind III, B: BamHI; Sa: Sal I, P: Pst I. PSVS, pM25, pSV25 e pSVS XL são vectores de expressão.

XR: Xho I.

- Figura 2

Representação esquemática da sequência de aminoácidos dos fragmentos do envólucro de HIV fundidos com HBsAg. O sistema de numeração é o dado por ALIZON e colab. no artigo citado sob a referência (3). Os pontos e as setas correspondem, respectivamente, aos sítios potenciais de glicosilação e as cisteínas conservadas. As sequências dos 4 péptidos representam as regiões conservadas entre os isolados de HIV1 e de HIV2.

- Figura 3

Análise de mancha de Western das partículas recombinantes de HBsAg. As partículas recombinantes nº.2 (A), nº.8 (b), nº.6 (c), reagiram com: um soro anti-p49a diluído a 1:500 (linhas A1, B1,C1), um anti-soro anti-péptido 5 (linha A2), um anti-soro anti-péptido 6 (linha B2), um anti-soro anti-péptido 7 (linha B3) a uma diluição de 1:25 e a uma diluição de 1:200 de um anticorpo monoclonal 18/7 (linha C2). Os tamanhos são dados em kilodaltons.

- Figura 4

Ensaio de neutralização: a cinética da neutralização in vitro das diferentes amostras de vírus (A, B, C) por um anti-soro diluído a 1:50 obtido depois da imunização de um coelho com o recombinante nº.8 (0---0) ou com um soro pré-imune (0—0). A actividade da transcriptase inversa determinou-se mediante incorporação de ³H/ timidina trifosfato (em cpm). No gráfico D, cada ponto representa a percentagem de inibição RT para A, B, C calculada como se segue.

$$\frac{\text{Cpm} \quad \text{teste RT sobre cultura com soro imune}}{\text{cpm} \quad \text{teste RT sobre cultura com soro pré-imune}} \times 100$$

- Figura 5

Neutralização de HIV com um soro imune de coelho dirigido contra o recombinante nº.8. Soros pré-imune (linha contínua) e imune (linha a ponteados) foram testados para conhecer a neutralização do vírus em culturas celulares, utilizando

4.

dois isolados diferentes LAV_{BRU} (círculos) LAV_{ELI} (triângulos). A actividade da transcriptase inversa mediu-se após 7 a 10 dias nos sobrenadantes de culturas celulares.

- Figura 6

Sequências das proteínas do invólucro das proteínas do invólucro dos retrovírus SIV_{mac}, HIV-2, HIV-1.

Nesta figura os traços de união que aparecem nas sequências têm como único objectivo permitir o alinhamento das sequências. Estes traços de união não têm, portanto, significado científico.

- Figura 7: Doseamento dos anticorpos em macacos imunizados com partículas híbridas HbsAg (S-H) ou partículas nativas HBsAg (A).

Mac S e H receberam uma injeção com partículas purificadas HIV/HBsAg, numa dose de 10 μ g ou 15 μ g, respectivamente, aos 0, 24º, 70º, 167º e 203º dias. Mac A recebeu uma injeção de uma dose de 15 μ g de partículas HBsAg derivadas de um plasma purificado aos 0, 21º, 43º e 165º dias. A primeira dose foi dada com o adjuvante completo de Freund, as doses seguintes com o adjuvante incompleto de Freund. Mas S e H receberam a quarta dose sem adjuvante.

As amostras de soros obtidas em diferentes momentos depois da injeção foram diluídas em série e testadas para a presença de anticorpos específicos de HBsAg ou de HIV utilizando o método ELISA. Os títulos são expressos pelo inverso da

diluição do soro que dá um valor de absorção 3 vezes superior ao valor obtido com o soro pré-imune. Cada ponto é a média de 4 determinações.

- Figura 8 : Estimulação antigénica dos linfócitos.

Os PBL foram isolados mediante centrifugação com Ficoll Hypaque a partir de sangue heparinizado, de Mac H (imunizado 3 vezes com HIV/HBsAg) ou Mac A [imunizado 3 vezes com HBsAg (Controlo)].

Os PBL foram suspensos a $1,5 \times 10^6$ células/ml em um meio RPMI 16-40 completado com 10% de soro AB humano inativado pelo calor. Depositou-se 0,1 ml em triplicado em cavidades de fundo redondo de placas com 96 cavidades. Os PBL foram estimulados com 0,1 ml de HIV-1 purificado em um gradiente de sacarose, com partículas HBsAg purificadas em 2 gradientes sucessivos de cloreto de cézio. Cada antígeno foi testado para diferentes concentrações. Quatro e cinco dias depois da estimulação, cada cavidade de PBL foi marcada com timidina ^3H -T $1 \mu\text{Ci}$ durante 6 horas, as células foram colhidas e determinou-se a timidina ^3H incorporada, mediante contagem de cintilação.

- Figura 9 : Seguimento da resposta proliferativa dos PBL dos macacos.

Os linfócitos foram colhidos antes da imunização e depois da segunda e da terceira imunização, antes e depois do "rappel" no dia indicado na figura. As setas indicam os dias de imunização dos animais. Seguiu-se a capacidade dos linfócitos para incorporar a timidina ^3H em resposta a um antígeno

exógeno como se indica na figura 8 e calculou-se o índice de estimulação (S.I.) dividindo o número de cpm da timidina ^3H incorporada pelas células estimuladas pelo número de cpm incorporado pelas células não estimuladas. Nestes ensaios o ruído de fundo (cpm) está compreendido entre 100 e 2450 cpm. A resposta Blastogénica à Con A dá um S.I. compreendido entre 5 e 129.

A imunogenicidade das partículas preferidas da presente invenção pode igualmente ser atribuída verosimilmente à glicosilação dos péptidos resultantes de HIV na ocasião da expressão dos vectores recombinantes referidos antes.

No descrito antes, a região que contém a sequência de aminoácidos imunogénica de HIV e o seu sítio de ligação aos receptores CD4 dos linfócitos T4 provinha quase sempre de uma sequência comum pertencente a uma glicoproteína da superfície ou transmembranar de HIV. Evidentemente que cada uma destas sequências pode provir de regiões afastadas uma da outra nas proteínas naturais de HIV. Neste último caso, elas consistirão de preferência em uma sequência recombinante ou em um polipéptido recombinante resultante da expressão de duas sequências que codificam para as regiões correspondentes do genoma de HIV ou até mesmo de HIV pertencente a isolados diferentes.

No descrito antes deve igualmente notar-se que, de preferência, se recorreu a sequências resultantes de HIV melhor conservadas nos diversos isolados disponíveis de HIV. Evidentemente que se pode, contudo, recorrer às sequências menos bem conservadas de um ou outro isolado. Numa tal hipótese, a pre-

sente invenção diz igualmente respeito às composições de partículas que correspondam à definição dada antes, distinguindo-se, contudo, estas partículas umas das outras pelo facto de conterem sequências de aminoácidos comuns a regiões das glicoproteínas correspondentes a isolados diferentes.

A presente invenção diz finalmente respeito às sequências de aminoácidos preferidas resultantes de HIV, que estão identificadas no quadro da presente descrição e, por consequência também às sequências de ADN que codificam para elas (como, aliás, os polipéptidos produzidos por síntese química e que apresentam propriedades imunológicas semelhantes, assim como todas as sequências de ácidos nucleicos que codificam para estes polipéptidos, quer se trate de sequências naturais quer produzidas mediante síntese nucleotídica).

Em particular, as sequências de aminoácidos anteriormente referidas podem ser utilizadas para a produção de ingredientes activos de vacinas que comportem como suporte uma bactéria E. coli e, aflorando à superfície desta bactéria, as sequências peptídicas de HIV referidas antes. Para a produção de tais vacinas pode-se recorrer à técnica descrita no pedido de patente europeia depositado em 6 de Março de 1987 e publicado com o número 0242.243.

QUADRO I

Antisoro de coelho dirigido contra as partí- culas recombinantes HIV/HBsAg	Antígeno imobilizado	HBsAg derivado do plasma	Pré-S2 Péptido (120-145)	Péptido 5	Péptido 6	Péptido 7	Péptido F
nº 2 (2 x 3,5 µg)*		10 ⁻⁴	0	4.10 ⁻²	-	-	-
nº 8 (2 x 3,5 µg)*		10 ⁻³	0	-	2.10 ⁻³	5.10 ⁻²	-
nº 6 (3 x 5 µg)*		5.10 ⁻⁵	1,6.10 ⁻³	-	-	-	10 ⁻³

Quadro I : Títulos e especificidades dos anti-soros de coelho dirigidos contra as partículas recombinantes.

Os títulos são expressos pelo inverso da diluição do soro que dá o triplo da densidade obtida com um soro pré-imune à mesma diluição (=soro testemunho no dia 0).

* : Os números entre parênteses referem-se às doses de injeção.

REFERENCIAS

1. Allan, J.S. et al., Science, 228, 1985, 1091-1093.
2. Robey, W.G. et al., Science, 228, 1985, 593-595.
3. Alizon, M. et al., Cell, 46, 1986, 63-74.
4. Starcich, B.R. et al., Cell, 45, 1986, 637-648.
5. McDougal, J.S. et al., Science, 231, 1986, 382-385.
6. Robey, W.G. et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1986, 7023-7027.
7. Lasky, L.A. et al., Science, 233, 1986, 209-212.
8. Putney, S.D. et al., Science, 234, 1986, 1392-1395.
9. Chanh, T.C. et al., EMBO J., 5, 1986, 3065-3071.
10. Tiollais, P. et al., Nature, 317, 1985, 489-495.
11. Michel, M.L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 81, 1984, 7708-7712.
12. Neurath, A.R. et al., Science, 224, 1984, 392-394.
13. Machida, A. et al., Gastroenterology, 86, 1984, 910-918.
14. Kieny, M.P. et al., Gene, 26, 1983, 91-99.
15. Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 77, 1980, 4216-4220.
16. Parker, B.A. et al., J.Virol., 31, 1979, 360-369.
17. Subramani, S., Molecular and Cellular Biology, 1, 1981, 854-864.
18. Michel, M.L. et al., Biotechnology, 3, 1985, 561-566.
19. Gerin, J.L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80, 1983, 2365-2369.
20. Heermann, K.H. et al., J. Virol., 52, 1984, 396-402.
21. Charbit, A. et al., J. Immunology, 139, 1987, 1658-1664.
22. Montagnier, L. et al., In Human T-Cell Leukemia/Lymphoma Virus, ed. Gallo, R.C., Essex, M. & Gross, L. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New-York), 1984, pp. 363-370.
23. Rey, M.A. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 121, 1984, 126-133.
24. Maddon, P.J. et al., Cell, 47, 1986, 333-348.

25. Lasky, L.A. et al., Cell, 50, 1987, 975-985.
26. Gallaher, W.R. et al., Cell, 50, 1987, 327-328.
27. Milich, D.R. et al., J.Exp. Med., 164, 1986, 532-547.
28. Valenzuela, P. et al., Biotechnology, 3, 1985, 323-326.
29. delpeyroux, F. et al., Science, 233, 1986, 472-475.
30. Cease, K.B. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 84, 1987, 4249-4253.
31. Krohn, K.D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 84, 1987, 4994-4998.
32. Kowalski, M. et al, Science, 237, 1987, 1351-1355.

117

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1.- Processo para a preparação de um vector recombinante, que compreende as seguintes etapas:

- recombinação "in vitro" e, eventualmente, sob o controlo de um promotor reconhecido pelas polimerases de um hospedeiro celular eucariota, de uma parte de uma sequência nucleotídica exógena que codifica para uma sequência de aminoácidos imunogénica, que induz anticorpos neutralizantes face a um retrovirus da família HIV ou susceptível de ser reconhecida por tais anticorpos, e comportando um fragmento de ácido nucleico correspondente à região S e, eventualmente, a toda ou parte da região pré-S do antigénio principal da superfície do vírus da hepatite B, e permitindo, quando introduzido em um hospedeiro celular eucariota competente, e na ocasião da cultura do hospedeiro celular assim transformado, induzir a produção de partículas apresentando as características morfológicas essenciais do antigénio HBsAg e, de preferência, a excreção destas partículas no meio de cultura,

- e recuperação do vector recombinante formado compreendendo os elementos, tais como foram definidos antes,

- caracterizado pelo facto de a referida sequência nucleotídica exógena do vector recuperado codificar para uma sequência de aminoácidos imunogénica que induz anticorpos neutralizantes face a um retrovirus da família HIV ou susceptível de ser reconhecida por tais anticorpos, comportando

11
7

pelo menos um epitopo susceptível de ser reconhecido por linfócitos B, e pelo menos um epitopo susceptível de ser reconhecido pelos linfócitos T e

- de se inserir a referida sequência nucleotídica exógena quer na dita região pré-S, ou de se substituir toda ou parte da dita região pré-S.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a referida sequência nucleotídica exógena do vector recombinante recuperado codificar para uma sequência de aminoácidos imunogénica compreendendo além disso pelo menos um sítio de ligação ao receptor CD4.

3.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo facto de se colocar o fragmento de ácido nucleico do vector recombinante recuperado sob o controlo de um promotor reconhecido pelas polimerases de um hospedeiro celular eucariota.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de o promotor contido no vector recombinante ser um promotor resultante de SV40.

5.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo facto de se substituir a sequência nucleotídica inserida pela totalidade da região pré-S.

11
7

6.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo facto de se inserir a sequência nucleotídica exógena do vector recuperado na parte pré-S2 da região pré-S.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de se eliminar essencialmente a região pré-S2 de um lado e do outro da sequência inserida.

8.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo facto de o vector recuperado ser tal que a sequência nucleotídica exógena que ele contém compreende uma sequência que codifica para uma das sequências de aminoácidos seguintes:

X₁ CHIRQIINTWHKVGKNVYLPPREGDLTC Z₁

X₂ CHIKQIINTWHKVGRNVYLPPREGELSC Z₂

X₃ CRIKQFINMWQEVGKAMYAPPISGQIRC Z₃

em que os pares X₁, Z₁, X₂, Z₂ e X₃, Z₃ representam quer grupos COOH ou NH₂ quer sequências de aminoácidos compreendendo normalmente respectivamente associadas às partes centrais correspondentes sequências indicadas anteriormente nas glicoproteínas dos retrovírus SIV, HIV-2, HIV-2 que normalmente os contêm.

117

9.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo facto de o vector recuperado ser tal que a sequência nucleotídica exógena que ele contém codifica para toda ou parte de uma das seguintes sequências:

RGEFLYCKMNWFLNWVEDRSLTTQPKERHKRNYVPCHIRQIINTWHKVGKNVYLP
PREGDLTCNSTVTSLIANINWTDG
RGEFLYCNMTWFLNWIENKTHRNYAPCHIKQIINTWHKVGRNVYLPPREGELSCNS
TVTSIIANIDWQNN
GGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNNTGSDTITLPCRIKQFINMWQEVGKAM
YAPPISGQIRCSSNITGLLLTRDGGNN

10.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de o vector ser derivado do vector pM2S.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de o vector ser derivado do vector pSV2S.

12.- Processo para a produção de partículas recombinantes, caracterizado pelo facto:

17

- de se transformar um hospedeiro celular determinado com um vector recombinante obtido por um processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 11,

- de se cultivar o hospedeiro celular transformado em um meio apropriado e

- de se recuperar as partículas recombinantes formadas, apresentando partículas recombinantes recuperadas as características morfológicas essenciais das partículas HBsAg e compreendendo, aflorando à superfície destas partículas, o essencial da sequência de aminoácidos (S) correspondendo à região S e, eventualmente, a toda ou parte da sequência de aminoácidos correspondendo à região pré-S do genoma do vírus da hepatite B, a montante da referida sequência de aminoácidos (S), compreendendo ainda estas partículas uma sequência de aminoácidos imunogénica que induz anticorpos neutralizantes face a um retrovírus da família HIV ou susceptível de ser reconhecida por tais anticorpos, comportando esta sequência pelo menos um epitopo susceptível de ser reconhecido pelos linfócitos B, ou pelo menos um epitopo susceptível de ser reconhecido pelos linfócitos T, sendo esta sequência imunogénica, quer inserida na sequência de aminoácidos pré-S, quer substituída em toda ou parte da proteína pré-S.

13.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácidos imunogénica de partículas imunogénicas recuperadas compreender

119

além disso um sítio de ligação ao receptor CD4 de linfócitos T4 humanos.

14.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 12 ou 13, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácidos imunogénica das partículas recombinantes recuperadas ser quer inserida na sequência de aminoácidos codificada pela região pré-S do genoma do vírus da hepatite B, quer substituindo toda ou parte da sequência de aminoácidos pré-S2.

15.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 12 ou 13, caracterizado pelo facto de, no essencial, se ter submetido a sequência de aminoácidos pré-S2 das partículas recuperadas a uma selecção.

16.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 12 a 15, caracterizado por as partículas recuperadas possuírem uma actividade imunogénica que lhes permite induzir "in vivo" a produção de anticorpos protectores contra um retrovírus da classe dos retrovírus HIV patogénicos para o homem.

17.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 12 a 16, caracterizado pelo facto de no

117

essencial as partículas recuperadas terem perdido a faculdade de induzir "in vivo" a produção de anticorpos neutralizantes face ao vírus da hepatite B.

18.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 12 a 17, caracterizado pelo facto de se escolher a sequência de aminoácidos imunogénica inserida das partículas recuperadas entre as sequências indicadas a seguir:

X₁ CHIRQIINTWHKVGKNVYLPPREGDLTC Z₁

X₂ CHIKQIINTWHKVGRNVYLPPREGELSC Z₂

X₃ CRIKQFINMWQEVGKAMYAPPISGQIRC Z₃

em que os pares X₁, Z₁, X₂, Z₂ e X₃, Z₃ representam quer grupos COOH ou NH₂ quer sequências de aminoácidos compreendendo normalmente, respectivamente associadas às partes centrais correspondentes sequências indicadas antes nas glicoproteínas dos retrovírus SIV, HIV-2, HIV-1 que normalmente as contêm.

19.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 12 a 18, caracterizado pelo facto de se escolher a sequência de aminoácidos imunogénica das partículas recuperadas entre as sequências indicadas a seguir:

117

RGEFLYCKMNWFLNWVEDRSLTTQKPKERHKNRYVPCHIRQIINTWHKVGKNVYLP
PREGDLTCNSTVTSLIANINWTDG
RGEFLYCNMTWFLNWIENKTHRNYAPCHIKQIINTWHKVGRNVYLP
TVTSIIANIDWQNN
GGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNNTGSDTITLPCRIKQFINMWQEVGKAM
YAPPISGQIRCSSNITGLLLTRDGGNN

20.- Processo para a obtenção de um hospedeiro celular recombinante de origem eucariota, caracterizado pelo facto de se transformar um hospedeiro celular com um vector recombinante obtido por um processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 11, sendo o hospedeiro celular transformado apto, quando em cultura, para excretar partículas obtidas por um processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 12 a 19.

21.- Processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo facto de o hospedeiro transformado ser uma célula de mamífero.

22.- Processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo facto de o hospedeiro transformado ser uma levedura.

23.- Processo para a preparação de fragmentos imunogénicos que podem estar contidos em partículas

49

recombinantes obtidas pelo processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo facto:

- de se condensar, dois-a-dois, aminoácidos sucessivos na ordem requerida, ou de se condensar aminoácidos e fragmentos formados previamente e contendo já diversos aminoácidos na ordem apropriada, ou ainda diversos fragmentos previamente preparados deste modo, tendo todas as funções reactivas suportadas por estes aminoácidos ou fragmentos sido previamente protegidas, com excepção das funções aminas de um e carboxilos do outro, ou vice-versa, que devem normalmente intervir na formação de ligações peptídicas designadamente depois da activação da função carboxilo;

- de se recuperar fragmentos imunogénicos de aminoácidos escolhidos entre os fragmentos indicados a seguir:

X₁ CHIRQIINTWHKVGKNVYLPPREGDLTC Z₁

X₂ CHIKQIINTWHKVGRNVYLPPREGELSC Z₂

X₃ CRIKQFINMWQEVGKAMYAPPISGQIRC Z₃

em que os pares X₁, Z₁, X₂, Z₂ e X₃, Z₃ representam quer grupos COOH ou NH₂ quer sequências de aminoácidos compreendendo normalmente, respectivamente associadas às partes centrais correspondentes, sequências indicadas antes nas glicoproteínas dos retrovírus SIV, HIV-2, HIV-1 que normalmente as contêm.

24.- Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo facto de os fragmentos recuperados

7

compreenderem toda ou parte de um dos encadeamentos indicados a seguir:

RGEFLYCKMWNWFLNWVEDRSLTTQKPKERHKRNYVPCHIRQIINTWHKVGKNVYLP
PREGDLTCNSTVTSLIANINWTDG
RGEFLYCNMTWFLNWIENKTHRNYAPCHIKQIINTWHKVGRNVYLPPREGELSCNS
TVTSIIANIDWQNN
GGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNNTGSDTITLPCRIKQFINMWQEVGKAM
YAPPISGQIRCSSNITGLLLTRDGGNN

25.- Processo para a preparação de uma composição de vacina destinada à protecção contra uma infecção causada por um retrovírus da família HIV, caracterizado pelo facto de se associar como ingrediente activo, partículas recombinantes obtidas por um processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 12 a 19 com um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

26.- Processo para a preparação de uma composição para o diagnóstico de uma infecção devida ao retrovírus HIV para a detecção da presença de anticorpos neutralizantes em um meio biológico colhido em um paciente, caracterizado pelo facto de se misturar partículas recombinantes obtidas por um processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 18 ou 19 com um fragmento imunogénico obtido por um processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 23 ou 24.

47

27.- Processo para o diagnóstico "in vitro" de uma infecção devida a HIV pela detecção da presença de anticorpos neutralizantes em um meio biológico colhido em um paciente, caracterizado por:

- se fazer contactar, em condições apropriadas partículas recombinantes obtidas por um processo de acordo com uma das reivindicações 12 a 19 ou uma composição obtida pelo processo de acordo com a reivindicação 26 com o meio biológico testado,
- se detectar a formação de um complexo antígeno-anticorpo.

28.- Método de doseamento "in vitro" da presença de anticorpos dirigidos contra um retrovírus HIV num meio biológico, em particular para o doseamento de anticorpos neutralizantes no seguimento de uma vacinação, caracterizado pelo facto:

- de se fazer contactar fragmentos imunogénicos de aminoácidos obtidos pelo processo de acordo com uma das reivindicações 23 ou 24, marcados de maneira a permitirem o doseamento ulterior, com o meio biológico a ensaiar, em condições apropriadas para permitir a reacção,
- o doseamento dos referidos fragmentos que reagiram com o meio.

29.- Método de diagnóstico "in vitro" de anticorpos anti-HIV em um meio biológico e em particular de anticorpos

117

neutralizantes no seguimento de uma vacinação, caracterizado pelo facto:

- de se fazer contactar fragmentos imunogénicos de aminoácidos obtidos pelo processo de acordo com uma das reivindicações 23 ou 24 com o meio biológico ensaiado,
- de se revelar a formação de um complexo de tipo antigénio-anticorpos entre os anticorpos do meio biológico ensaiado e os fragmentos imunogénicos.

Lisboa, 3 de Março de 1995

fs.

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

António H. Sousa

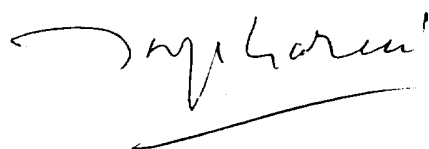
R E S U M O

"Processo para a preparação de vectores recombinantes e de partículas HBsAg recombinantes híbridas tendo as características morfológicas do antigénio HBsAg contendo uma sequência imunogénica que induz anticorpos neutralizantes dirigidos contra HIV ou susceptível de ser reconhecida por tais anticorpos"

A presente invenção diz respeito a um ingrediente activo para uma vacina contra HIV. Este ingrediente activo é constituído por partículas recombinantes apresentando as características morfológicas essenciais das partículas de HBsAg e comportando, aflo-
rando à superfície destas partículas, o essencial da sequência de aminoácidos (S) que codifica para a região S e, eventualmente, toda ou parte da sequência de aminoácidos codificada pela região pré-S do genoma do vírus da hepatite B, a montante da referida sequência de aminoácidos (S), sendo estas partículas recombinantes caracterizadas pelo facto de compreenderem, além disso, uma sequência de aminoácidos imunogénica que induz anticorpos neutralizantes face a um retrovírus da família HIV ou susceptível de ser reconhecida por tais anticorpos, comportando esta sequência pelo menos um epitopo susceptível de ser reconhecido pelos linfócitos B, e pelo menos um epitopo susceptível de ser reconhecido pelos linfócitos T e, eventualmente, pelo menos um sítio de ligação ao

receptor CD4 de linfócitos T4 humanos, sendo esta sequência imuno-
gênica, quer inserida na sequência de aminoácidos pré-S, quer
substituindo toda ou parte da proteína pré-S.

Lisboa, 08 de Janeiro de 1990
O Agente Oficial da Propriedade Industrial



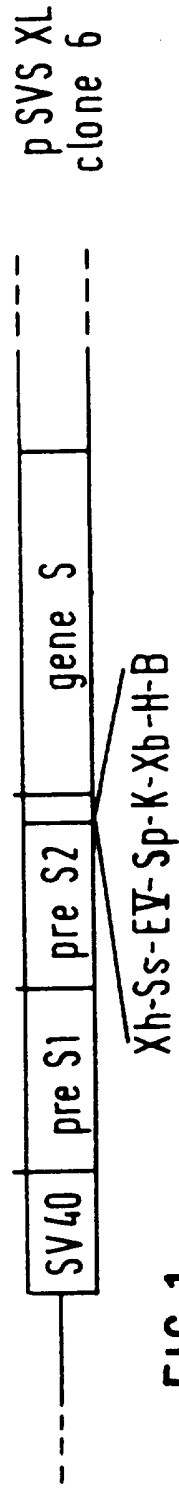
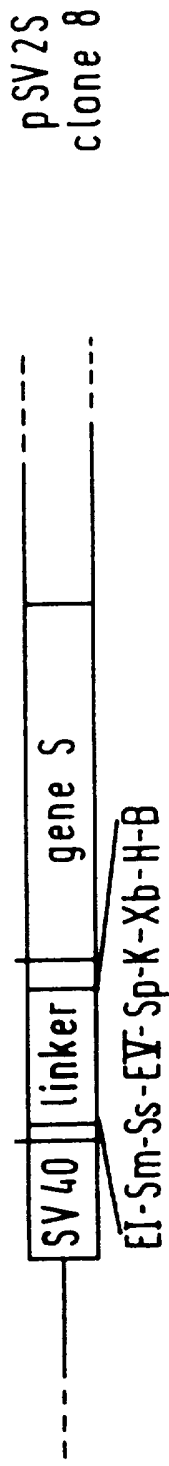
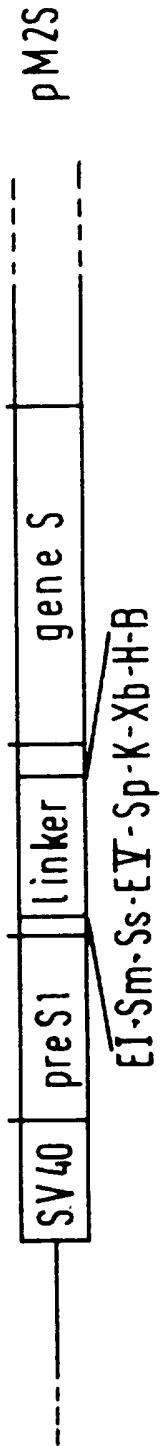
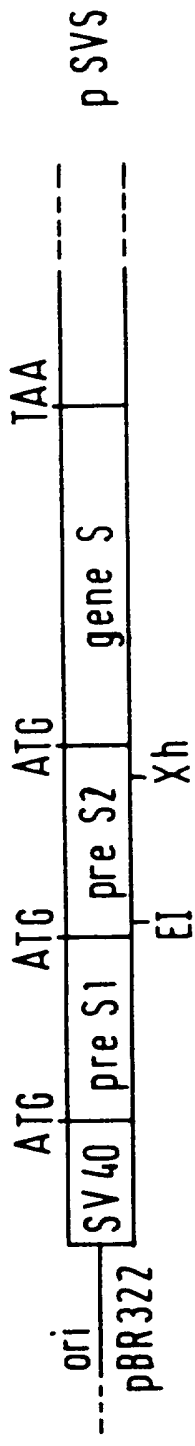
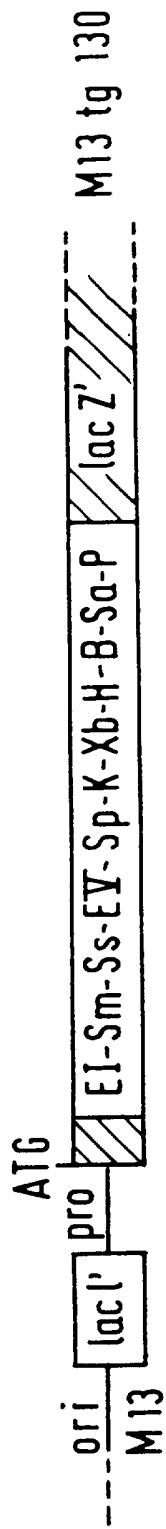
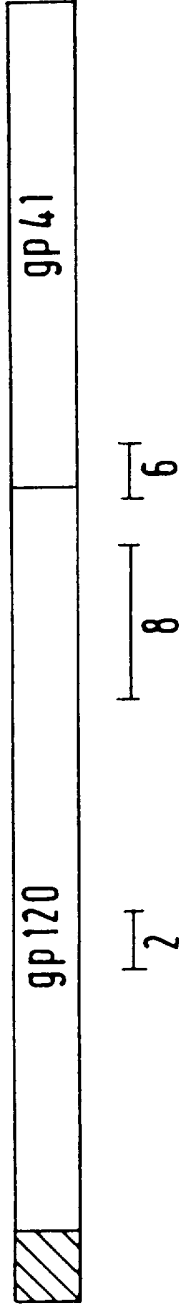


FIG.1

5



clone 2 224 242
 PAGFAILKCNKTFNGTG
 HVCAPAGFAJLKC
 pep 5

clone 8 384 472
 GGEFFVCN[•]STQLFN[•]STWFNSTWSTEGSN[•]TEGSDTITLPC[•]RIKQFINMWQEVGKAMYAPPISGOIRCSNITGLLLTRDGGNN
 DPEIVTHSFNCGGGEFFVCNSTQLFNS
 LPCRIKQFINMWQEVGKAMYA
 pep 6 pep 7

clone 6 514 533
 EKRAVGIGALFLGFLGAAGS
 FLGFLGAAGST
 pep F

FIG. 2

2

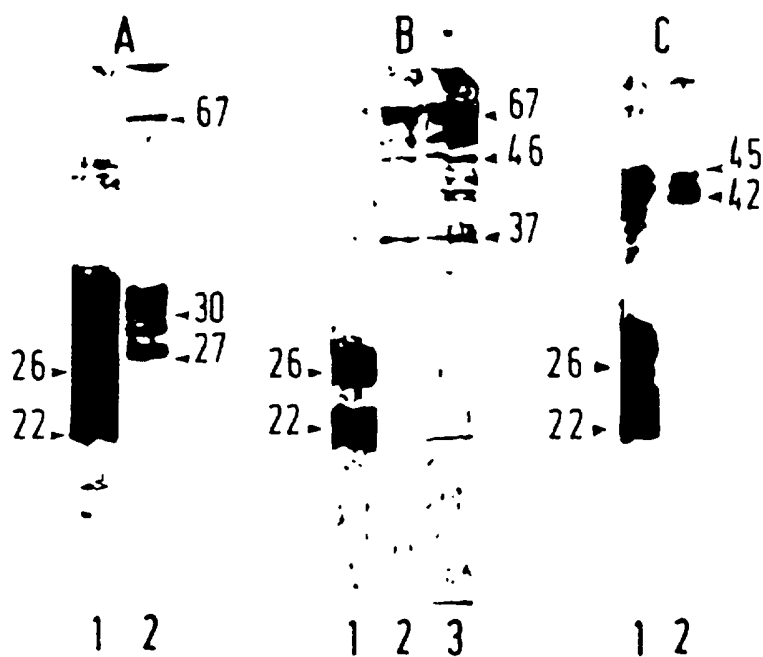


FIG. 3

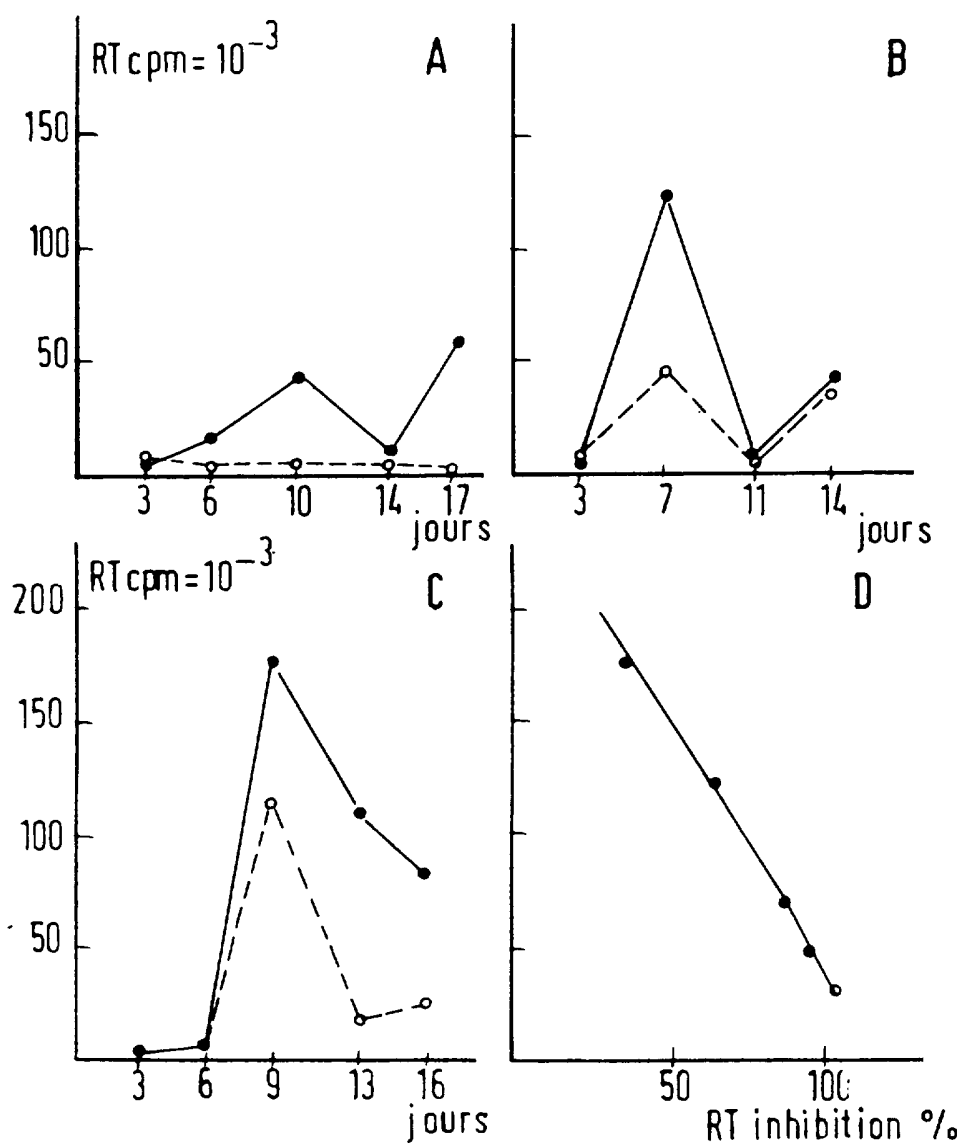


FIG. 4

4.

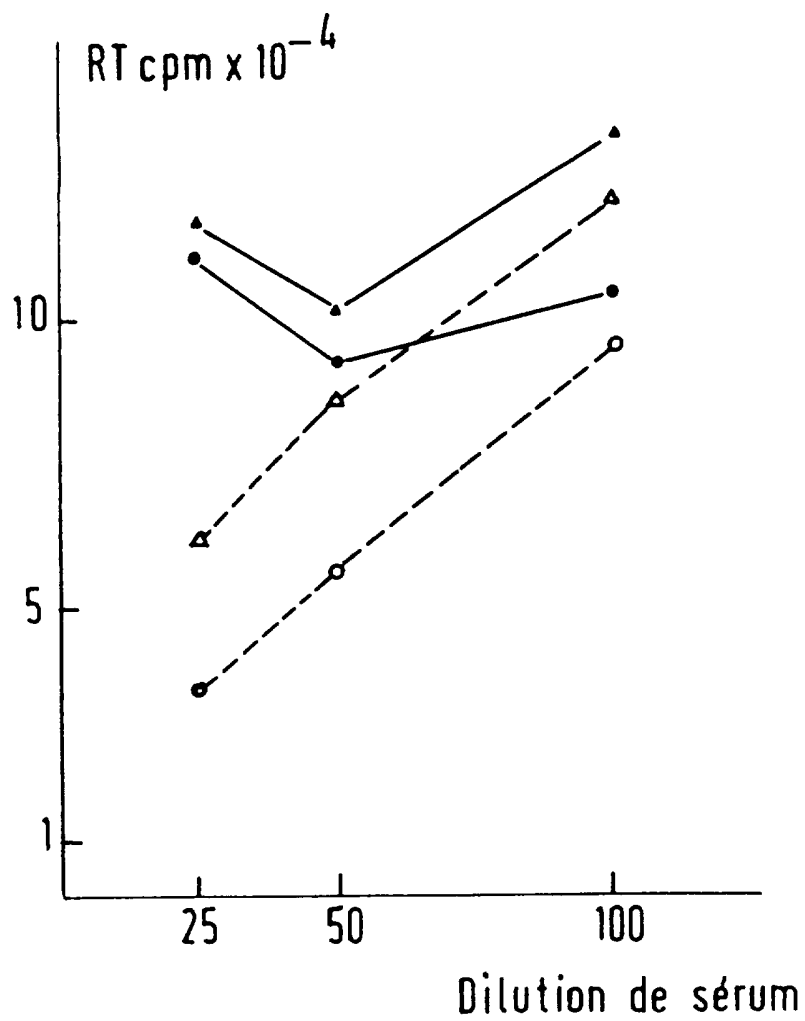


FIG.5

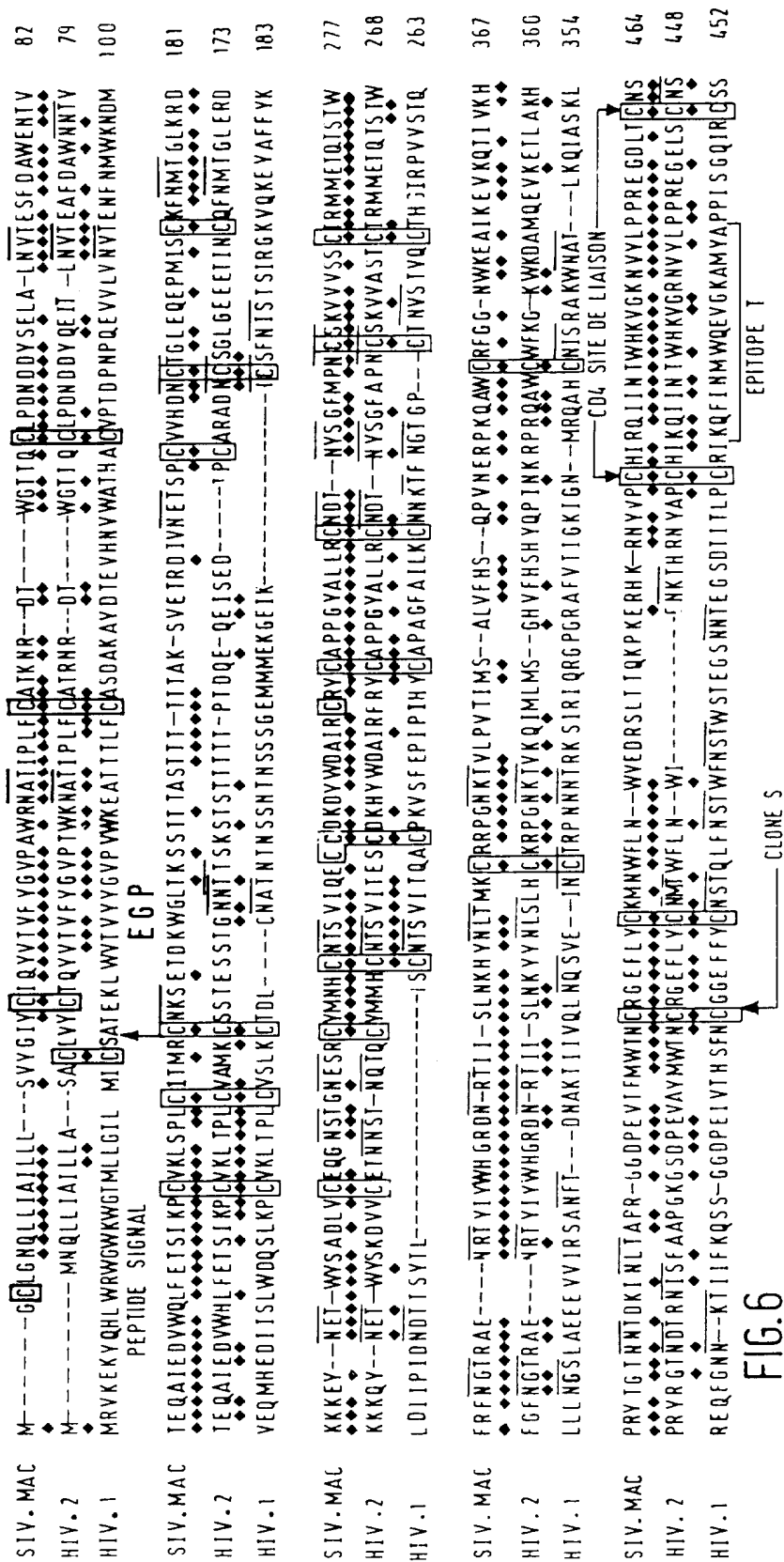
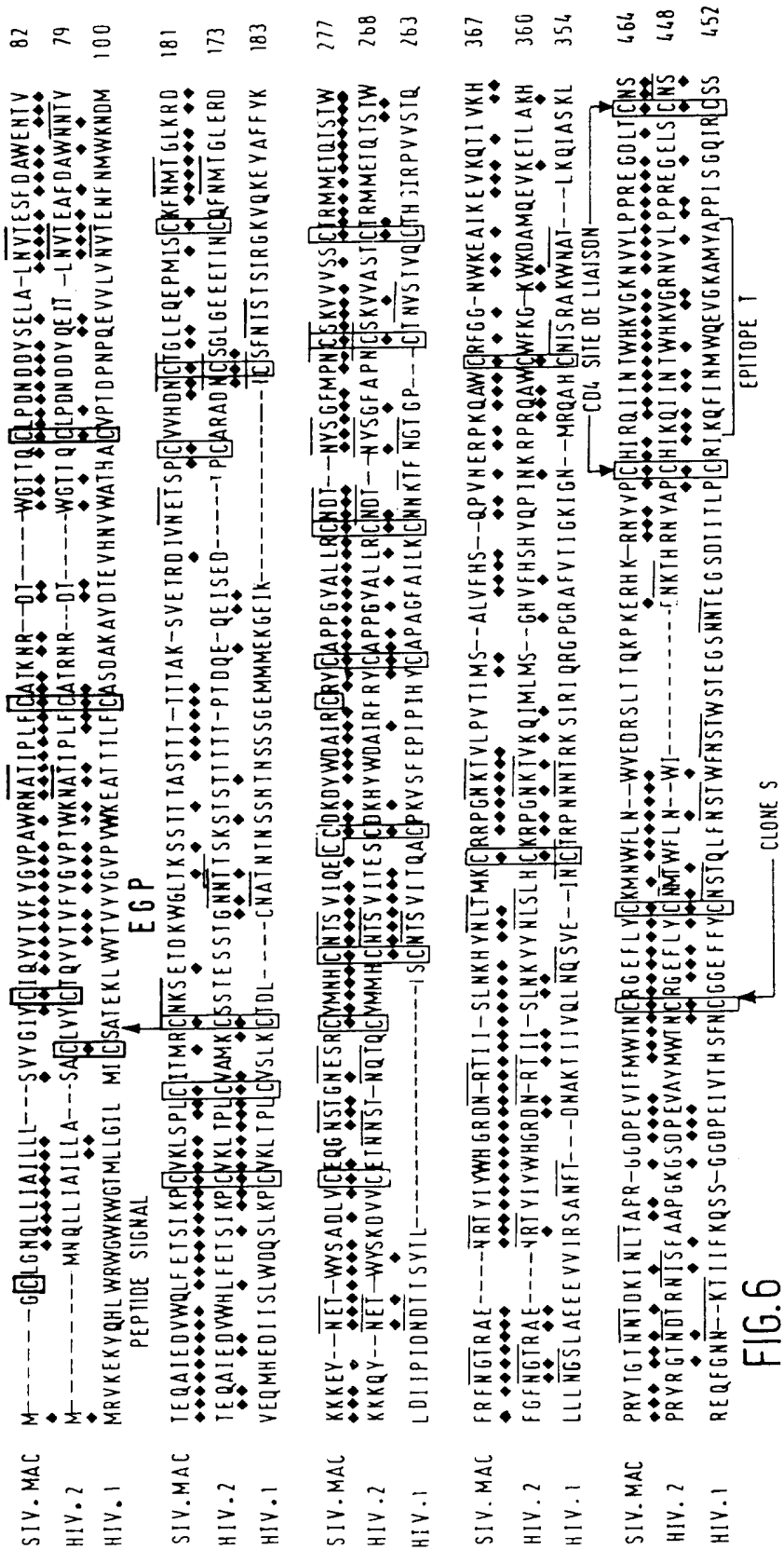


FIG.6



4.

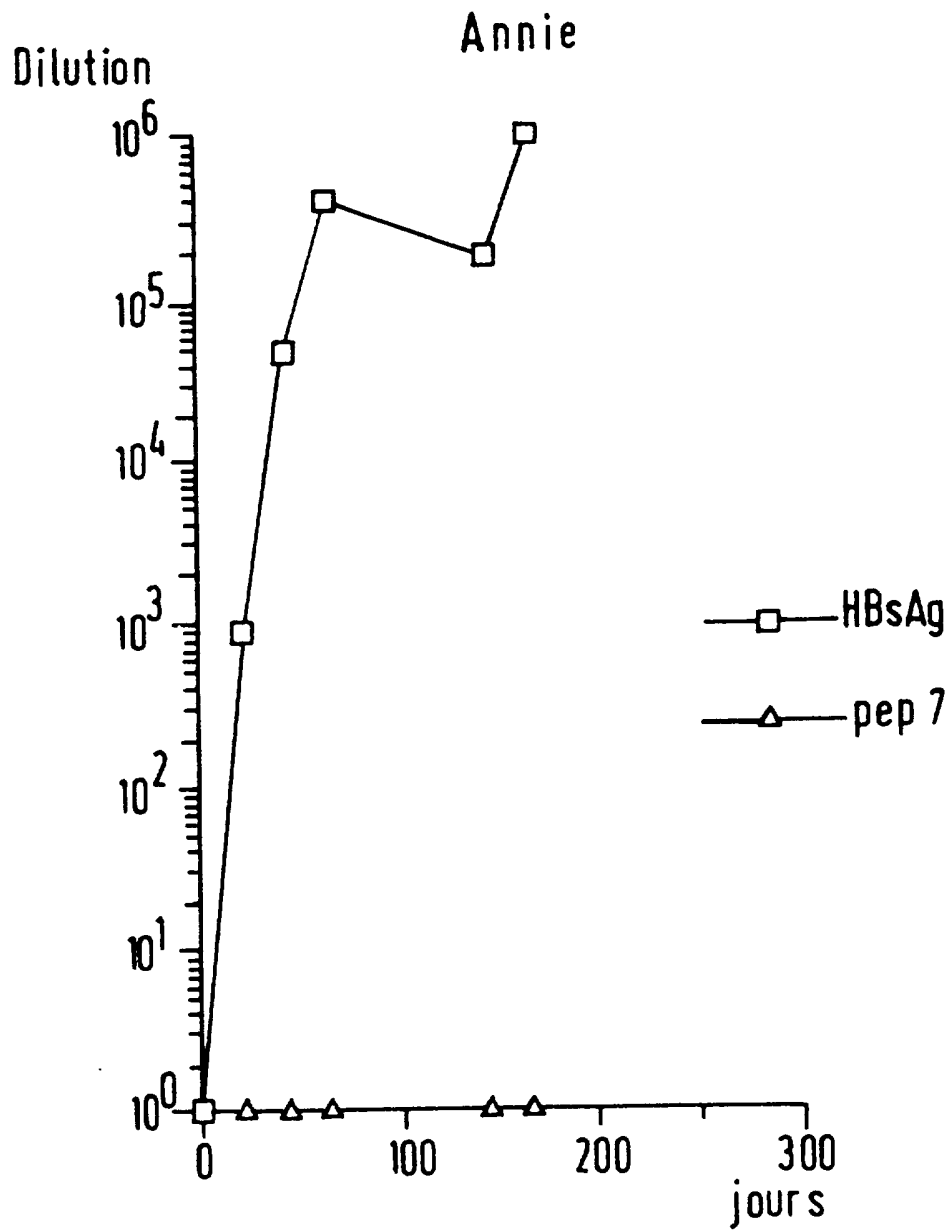


FIG.7

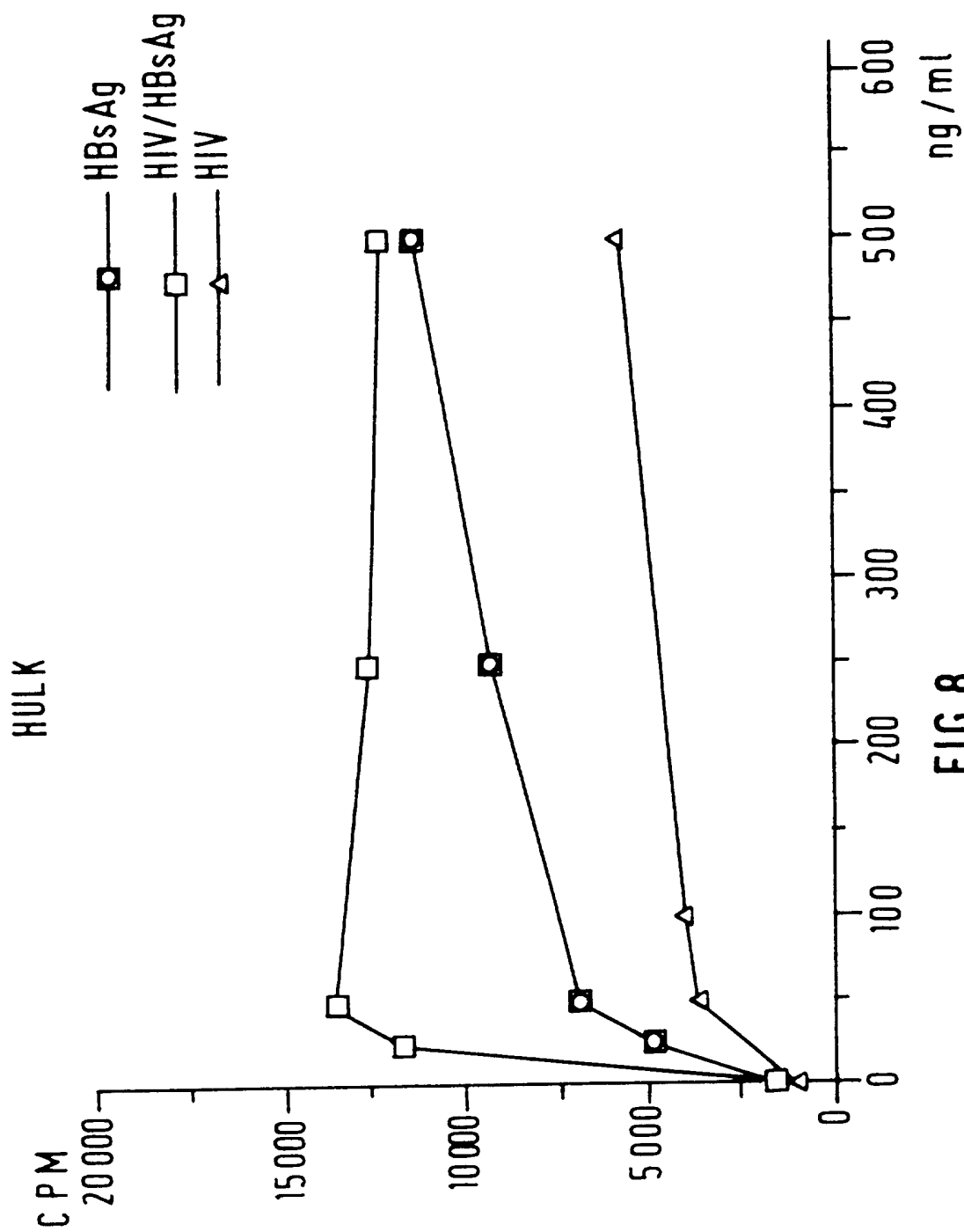


FIG.8

5

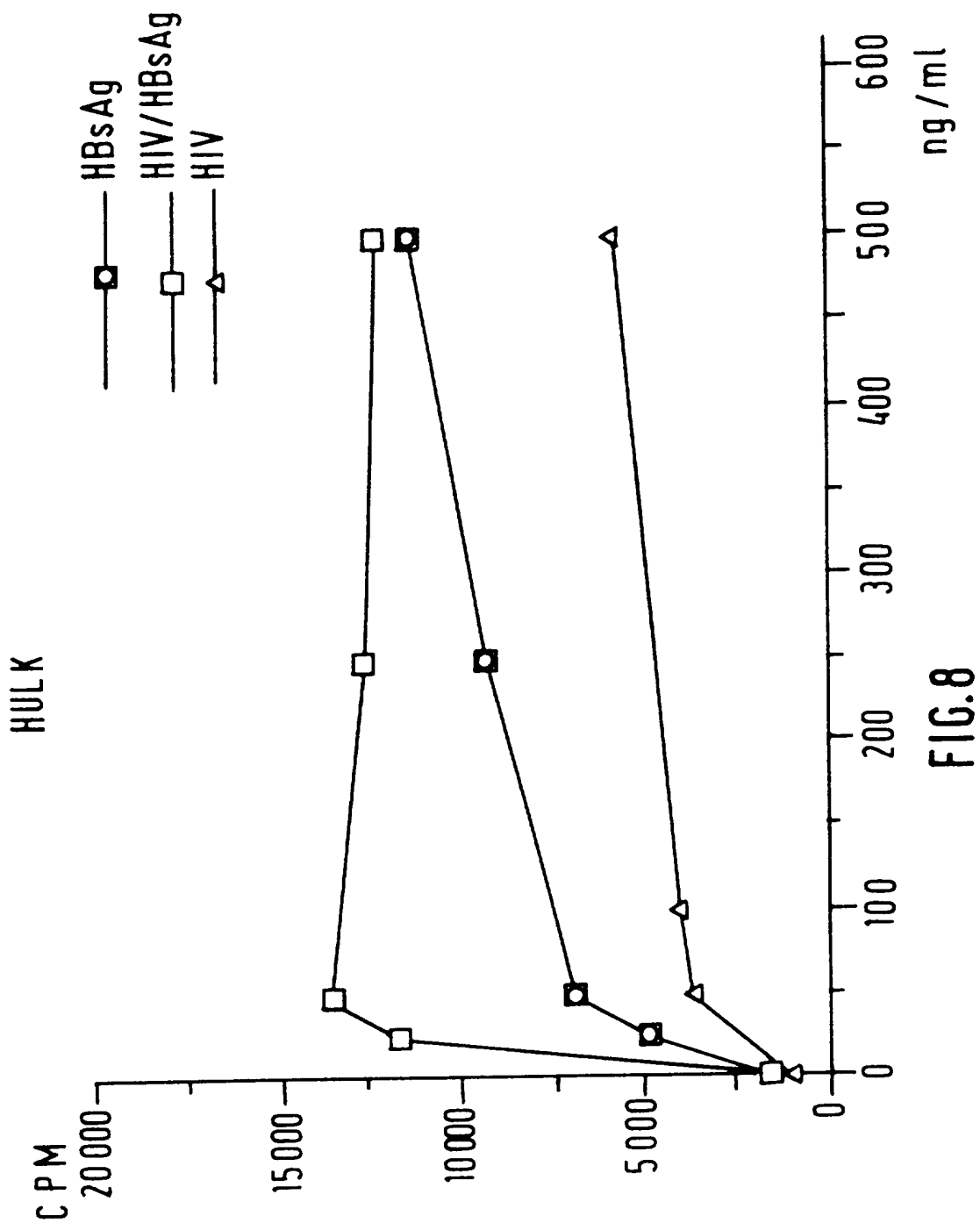


FIG.8

4.

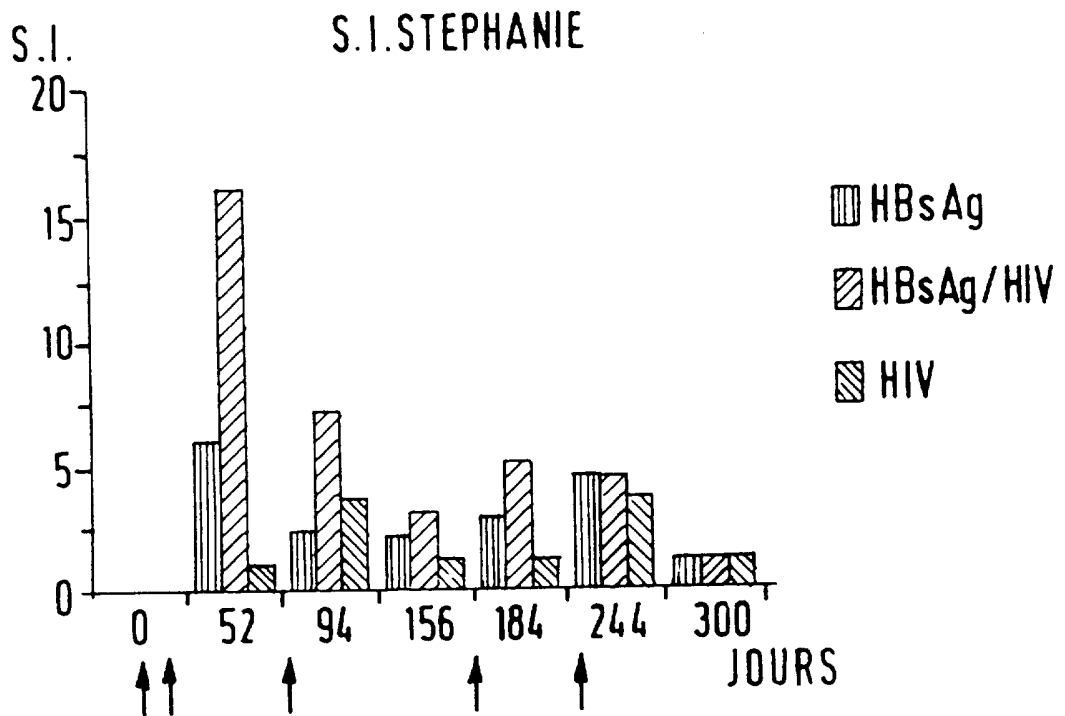
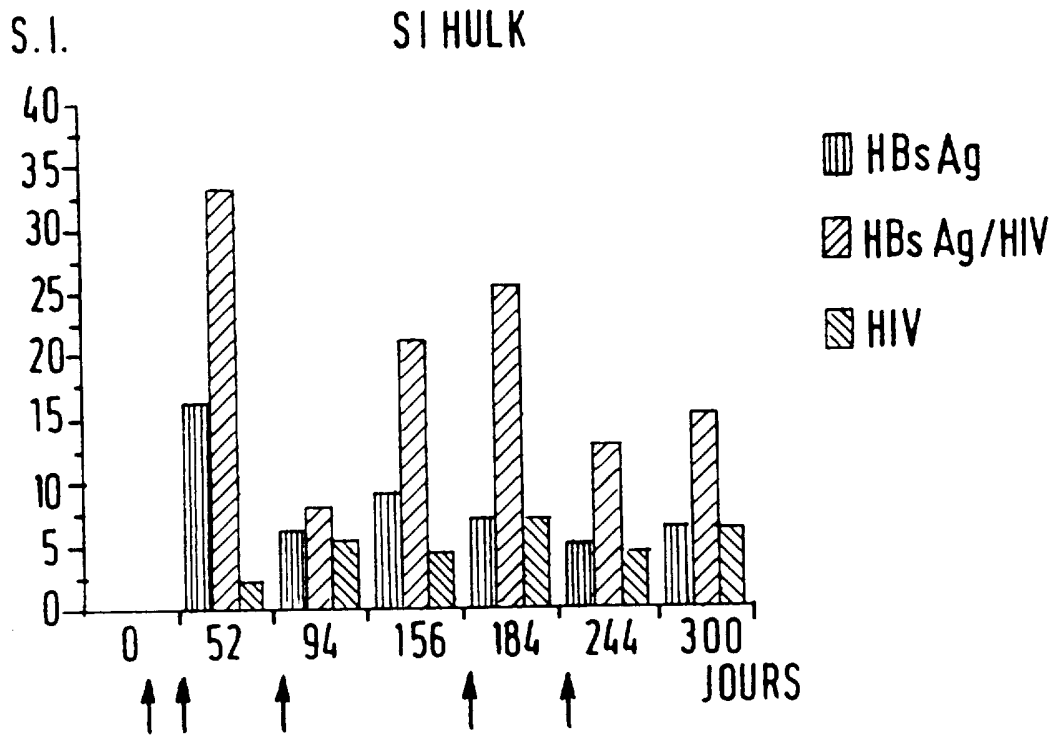


FIG.9

4.



FIG.9(suite)