(19) INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 652758 E**

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

C12N015/54	A	C12N001/21	B
C12N005/10	B	C12N009/10	B
C12N015/31	B	C07K014/34	B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1993.05.17

(30) *Prioridade:* 1992.06.18 US 901712

(43) *Data de publicação do pedido:* 1995.05.17

(45) *Data e BPI da concessão:* 2000.01.05

(73) *Titular(es):*
THE PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE
HARVARD UNIVERSITY 124 MT. AUBURN STREET CAMBRIDGE, MA 02138 US

(72) *Inventor(es):*
R. JOHN COLLIER US
KEVIN KILLEEN US
JOHN MEKALANOS US

(74) *Mandatário(s):*
JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* VACINAS DE TOXINA DA DIFTERIA

(57) *Resumo:*

Campo das Cebolas - 1149 - 035 LISBOA
Telefs.: 01 888 51 51 / 2 / 3
Linha azul: 01 888 10 78 • Fax: 01 887 53 08 - 886 00 66
E-mail: inpi @ mail. telepac. pt

Ref.: ACR/PEB/91713 (39141)

INPI
INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

FOLHA DO RESUMO

PAT. INV.	MOD. UTI.	MOD. IND.	DES. IND.	TOP. SEMIC.
[X]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]

N.º Objectos ___ N.º Desenhos ___

N.º 652.758 (11) DATA DO PEDIDO ___/___/___ (22)

CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)

REQUERENTE (71)
(NOME E MORADA)

THE PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE, norte-americana, industrial, com sede em 17 Quincy Street, Cambridge, MA 02114, Estados Unidos da América

CÓDIGO POSTAL ____ ____

INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72)

COLLIER, R., John, KILLEEN, Kevin e MEKALANOS, John

REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)

DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO

FIGURA (para interpretação do resumo)

COLAR FIGURA

EPÍGRAFE (54)

"VACINAS DE TOXINA DA DIFTERIA"

RESUMO (max. 150 palavras) (57)

ADN que codifica uma forma imunologicamente interreactiva do fragmento A da toxina da difteria, em que os codões correspondentes a Val-147 e Glu-148 da toxina da difteria que ocorre naturalmente foram suprimidos nesse ADN.

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

SOCIEDADE TIPOGRÁFICA, S.A.

Descrição

"Vacinas de toxina da difteria"

A presente invenção refere-se a vacinas que protegem contra a toxina da difteria.

A toxina da difteria (TD) é uma exotoxina proteíca produzida pela bactéria *Corynebacteria diphtheria*. A molécula da TD é produzida sob a forma de um único polipeptido que é facilmente interrompido numa das cadeias para dar origem a duas subunidades ligadas por uma ponte dissulfureto, o fragmento A (~21 K no terminal N) e o fragmento B (~37 K no terminal C), como consequência da clivagem no resíduo 190, 192 ou 193 (Moskaug, *et al.*, *Biol Chem* 264:15709-15713, 1989; Collier *et al.*, *Biol Chem*, 246:1496-1503, 1971). O fragmento A é a parcela da TD cataliticamente activa. Trata-se de uma ADP-ribosiltransferase dependente do NAD, a qual subordina de forma específica um factor da síntese de proteínas designado por factor 2 de alongamento (F2E, o mesmo que EF-2), inactivando assim o F2E e interrompendo a síntese de proteínas na célula intoxicada. O fragmento B da TD possui um domínio de ligação ao receptor que reconhece e liga a molécula da toxina a uma estrutura particular do receptor existente sobre as superfícies de muitos tipos de células de mamíferos. Assim que a TD se encontra ligada à célula através desta estrutura do receptor, o complexo receptor/TD é incorporado pela célula por endocitose mediada pelo receptor. Há uma segunda região funcional no fragmento B que actua de modo a transladar a TD através da membrana da vesícula endocítica, libertando o fragmento A cataliticamente activo para dentro do citossol da célula. Uma única molécula do fragmento A é suficiente para inactivar o maquinismo da síntese proteica numa determinada célula.

A imunidade contra uma toxina bacteriana, tal como a TD, pode ser adquirida naturalmente no decurso de uma infecção ou então adquirida artificialmente por injecção de uma forma da toxina com toxicidade atenuada (um toxóide) (Germanier, ed., Bacterial Vaccines, Academic Press, Orlando, Fl., 1984). De forma convencional, os toxóides têm sido preparados por modificação química das toxinas naturais (*v.g.* com formalina ou formaldeído (Lingood *et al.*, *Brit. J. Exp. Path.* 44:177, 1963)), fazendo com que deixem de ser tóxicas, ao mesmo tempo que mantêm uma antigenicidade que protege o animal vacinado contra os ataques subsequentes de uma toxina natural: como exemplo de uma TD inactivada quimicamente refere-se a que foi descrita por Michel e Dirkx (*Biochem. Biophys. Acta* 491: 286-295, 1977), na qual o resíduo Trp-153 do fragmento A é o resíduo modificado. No entanto, tal toxina modificada quimicamente pode perder ocasionalmente o grupo ou os grupos químicos que lhe foram acrescentados e reassumir a sua forma tóxica activa, pelo que a sua utilização como vacina constitui um risco possível para a pessoa que a recebe.

Outro caminho para a produção de toxóides consiste na utilização de técnicas genéticas. Criou-se um mutante de *Corynebacterium diphtheriae*, designado por CRM-197 (Uchida, *et al.*, *Nature* 233:8-11, 1971) (CRM elegível como "material interreactivo") por mutagenese aleatória e comprovou-se que continha uma proteína TD enzimaticamente inactiva e suficientemente correspondente à toxina natural, de modo a produzir uma resposta imunitária anti-TD. Collier *et al.* (patente de invenção norte-americana nº 4 709 017) descrevem um mutante da toxina da difteria concebido por técnicas da engenharia genética que suporta uma mutação por supressão no resíduo Glu-148 da toxina da difteria. O resíduo Glu-148 foi identificado originariamente como sendo um resíduo do local activo, por marcação de fotoafinidade (Carroll *et al. Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 82:7237, 1985; Carroll *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262:8707, 1987).

A substituição dos resíduos Asp, Gln ou Ser neste local diminui as actividades enzimáticas e citotóxicas segundo duas a três ordens de grandeza, comprovando que a localização espacial e a natureza química da cadeia lateral do resíduo Glu-148 afecta imenso estas actividades (Carroll *et al.*. *J. Biol. Chem.* 262:8707, 1987; Tweten *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:10392, 1985; Douglas *et al.*, *J. Bacteriol.* 169:4967, 1987). De igual modo, Greenfield *et al.* (patente de invenção norte-americana nº 4 950 740) descrevem formas mutantes da TD, obtidas por técnicas da engenharia genética, em que o resíduo Glu-148 é suprimido ou substituído por um resíduo Asn e o resíduo Ala-158 é substituído por um resíduo Gli. A figura 1 (SEQ ID NO: 1) ilustra a sequência de ADN e a correspondente sequência de aminoácidos do ADN da toxina da difteria de tipo natural.

Uma solução recente para resolver o problema da vacinação utiliza microrganismos vivos, obtidos por técnicas da engenharia genética (células ou vírus) que expressam os genes mutantes da toxina. Uma vez que as vacinas vivas proliferam no ser vacinado, os seus genes, incluindo os que codificam um toxóide obtido por técnicas da engenharia genética, podem teoricamente mutacionar ao longo do tempo nesse ser vacinado. Se uma tal mutação espontânea fizer com que um toxóide obtido por técnicas da engenharia genética retome o estado de toxicidade, pode daí resultar uma situação de doença e/ou a morte do ser vacinado. Os inventores da presente invenção descobriram que o mutante de TD por supressão do resíduo Glu-148, descrito por Collier *et al.*, na patente de invenção norte-americana nº 4 709 017, que é um forte candidato para a preparação de um toxóide da difteria obtido por técnicas da engenharia genética, representa apenas um risco pequeno mas possivelmente significativo de reassunção de toxicidade parcial. Além disso, descobriram também formas para reduzir este risco sem comprometer excessivamente a antigenicidade ou estabilidade do polipeptido resultante.

Os toxóides da presente invenção e o ADN que os codifica constituem um risco significativamente menor de reassunção da toxicidade do que o risco associado ao mutante obtido por supressão do resíduo Glu-148 de Collier *et al.* e por tal motivo são candidatos bastante melhores para serem utilizados numa célula de uma vacina viva, obtida por técnicas da engenharia genética, capaz de proliferar no ser vacinado.

A presente invenção particulariza um ADN que codifica uma forma de um fragmento A da toxina da difteria imunologicamente interreactiva, ou que codifica simultaneamente o fragmento A e o fragmento B, em que os codões correspondentes a Val-147 e Glu-148 (Fig. 1; SEQ ID NO: 1) da toxina da difteria que ocorre naturalmente estão ausentes desse ADN. Além disso, é possível suprimir ou alterar um códão, correspondente a um terceiro resíduo aminoácido da toxina que ocorre naturalmente, para codificar um resíduo aminoácido diferente daquele da toxina que ocorre naturalmente, sendo a presença do terceiro resíduo aminoácido da toxina que ocorre naturalmente essencial para a actividade tóxica plena da toxina que ocorre naturalmente. O terceiro resíduo aminoácido pode estar na parcela do fragmento A da toxina da difteria, caso em que o terceiro resíduo aminoácido da toxina que ocorre naturalmente pode ser, por exemplo, um resíduo Gli-52, Gli-79, Gli-128, Ala-158 ou Glu-162. Em vez disso, o terceiro resíduo aminoácido pode estar na parcela do fragmento B da toxina da difteria, sendo o terceiro resíduo aminoácido da toxina que ocorre naturalmente, por exemplo, Glu-349, Asp-352 ou Ile-364. De preferência, o códão correspondente a Glu-142 até Glu-148 está ausente ou é alterado para codificar um resíduo aminoácido diferente de Glu, ou então estão ausentes todos os codões desde Glu-142 até Glu-148 inclusive. A expressão "que ocorre naturalmente" designa a toxina da difteria de tipo natural que possui a sequência de aminoácidos ilustrada na figura 1 (SEQ ID NO: 1). A expressão "actividade tóxica plena" da

toxina que ocorre naturalmente designa 100% da capacidade que a toxina da difteria de tipo natural tem para atacar, penetrar e aniquilar as células, tal como medida num ensaio convencional de aniquilação de células, adiante descrito.

A presente invenção também diz respeito a vectores (isto é, plasmídeos, bacteriófagos e vírus) que contenham sequências de ADN que codifiquem as variantes do fragmento A aqui descritas. A expressão de um polipeptido do toxóide da difteria, de acordo com a presente invenção, está sob o controlo de um promotor heterólogo e/ou os aminoácidos expressos estão ligados a uma sequência de sinal. A expressão " promotor heterólogo" designa uma região promotora que não é idêntica à região promotora num gene da toxina da difteria que ocorre naturalmente. A região promotora é um segmento de ADN em 5' para o local do início da transcrição de um gene, ao qual se liga a polimerase do ARN antes de ter início a transcrição do gene. Uma preparação praticamente pura de ácido nucleico é uma preparação que contém o acido nucleico da invenção e que está praticamente isenta de outras moléculas de ácido nucleico com as quais um ácido nucleico que codifica a toxina da difteria se encontra naturalmente associado no microrganismo *Corynebacterium*. Um ADN que codifica um toxóide da difteria da presente invenção pode estar contido numa célula, ou numa população de células homogéneas, de preferência numa célula de *B. subtilis, Bacillus Calmette-Guerin (BCG), Salmonella sp., Vibrio cholerae, Corynebacterium diphtheria, Listeriae, Yersiniae, Streptococci* ou *E. coli*. De preferência, a célula é capaz de exprimir o polipeptido do toxóide da difteria de acordo com a presente invenção.

Os toxóides da difteria que são "imunologicamente interreactivos", com a significação aqui atribuída a esta expressão, possuem pelo menos um determinante antigénico em comum com a toxina da difteria que ocorre naturalmente, pelo que cada um deles está ligado pelo

menos por um anticorpo com especificidade para a toxina da difteria que ocorre naturalmente. A expressão "toxóide da difteria de acordo com a invenção", tal como aqui definida, designa um toxóide da difteria que é imunologicamente interreactivo com a toxina da difteria que ocorre naturalmente e que possui uma das modificações aqui exemplificadas ou reivindicadas.

Uma "forma imunologicamente interreactiva de fragmento A da toxina da difteria" compreende um polipeptido do toxóide da difteria que é imunologicamente interreactivo e conserva pelo menos 40% de homologia com o fragmento A que ocorre naturalmente.

Uma vacina da presente invenção pode conter qualquer dos diversos ADN que codificam um toxóide da difteria de acordo com a invenção, ou uma célula ou um vírus que contenha um ADN da invenção, de preferência uma célula de vacina viva, mais preferencialmente uma célula de *B. subtilis, BCG, Salmonella sp., Vibrio cholerae, Listerae, Yersiniae, Streptococci, Corynebacterium diphtheriae* ou *E. coli*. Uma "célula de vacina viva", de acordo com o significado que aqui lhe é atribuído, é um microrganismo vivo naturalmente avirulento ou então é um microrganismo vivo com virulência fraca ou atenuada que exprime um imunogénio.

Um método para fabricar uma vacina da invenção consiste em criar em cultura uma célula que contenha um ADN que codifique um toxóide da difteria, de acordo com a invenção, em condições que permitam a proliferação da célula, sendo tal célula adequada para ser introduzida num animal sob a forma de uma vacina constituída por uma célula viva. A vacina pode ser utilizada num método para imunizar um mamífero contra a difteria, de preferência um ser humano, compreendendo tal método a introdução de uma quantidade imunizante de uma vacina da invenção num mamífero. Um método não exclusivo de administração de uma vacina acelular que contenha um ADN que codifique um toxóide da difteria de acordo com a invenção é o método da transferência biobalística, que é um método de administração que implica o

revestimento de um microprojéctil com ADN que codifique um imunogénio relevante, injectando-se depois o microprojéctil assim recoberto directamente dentro das células do mamífero a que se destina (Tang, *et al.*, *Nature* 356:152-154, 1992). O toxóide da difteria da invenção é depois expresso a partir do ADN para estimular uma resposta imunitária no mamífero a que se destina. Devido ao facto de incorporarem imunogénios, ou os ADN que codificam os imunogénios que induzem uma resposta imunitária contra a toxina da difteria, as vacinas da presente invenção imunizam contra a progressão da difteria e também contra a infecção provocada pela bactéria *Corynebacterium diphtheriae*.

De acordo com outro dos seus aspectos, a presente invenção particulariza um polipeptido que é uma forma imunologicamente interreactiva de fragmento A da toxina da difteria, ou preferencialmente de fragmento A e de fragmento B, em que os aminoácidos correspondentes a Val-147 e Glu-148 (SEQ ID NO: 1) da toxina da difteria que ocorre naturalmente estão ausentes do polipeptido. De preferência, o toxóide conserva o resíduo Tir-149. De preferência, há um terceiro resíduo aminoácido na toxina que ocorre naturalmente que é suprimido ou é alterado para codificar um resíduo aminoácido diferente do terceiro resíduo aminoácido existente na toxina que ocorre naturalmente, sendo a presença do terceiro resíduo aminoácido na toxina que ocorre naturalmente essencial para a actividade tóxica plena da toxina que ocorre naturalmente. O terceiro resíduo aminoácido pode estar na parcela do fragmento A da toxina da difteria, de preferência os aminoácidos His-21, Gli-22, Lis-39, Gli-52, Gli-79, Gli-128, Ala-158 ou Glu-162, ou na parcela do fragmento B da toxina da difteria, de preferência os aminoácidos Glu-349, Asp-352 ou Ile-364. Além disso, o resíduo aminoácido Glu-142 do polipeptido pode estar ausente ou ter sido alterado, dando origem a um resíduo aminoácido diferente de Glu. Em alternativa, todos os resíduos aminoácidos desde Glu-142 até Glu-148

podem estar ausentes. O polipeptido pode ser obtido por qualquer método conveniente, de preferência criando em cultura qualquer uma das diversas células que contenham um ADN que codifique um toxóide da difteria de acordo com a invenção, em condições que permitam a expressão do ADN. A presente invenção compreende também uma preparação praticamente pura de um polipeptido da invenção. A expressão "praticamente pura" significa que pelo menos 50% (em peso) da proteína presente na preparação é o polipeptido do toxóide da difteria de acordo com a invenção. De acordo com variantes preferidas, pelo menos 75%, mais preferencialmente pelo menos 90% e muito mais preferencialmente pelo menos 99% (em peso) da proteína presente na preparação é o polipeptido do toxóide da difteria de acordo com a invenção.

Uma vacina contra a toxina da difteria pode ser uma composição que contenha um polipeptido do toxóide da difteria de acordo com a invenção e um adjuvante. Como exemplos de adjuvantes refere-se, sem que isso constitua qualquer limitação, aqueles que actualmente são conhecidos como espécies de adjuvantes, tais como os sais de alumínio, as endotoxinas bacterianas, o bacilo de Calmette-Guerin (BCG), os lipossomas, as microesferas (isto é, os polímeros de microencapsulação utilizados nas vacinas administradas por via oral) e o adjuvante de Freund completo ou incompleto. O termo "adjuvante" aqui utilizado designa uma substância que é capaz de aumentar a imunogenicidade de um antigénio.

O polipeptido do toxóide da difteria da presente invenção pode ser ligado de forma covalente a um radical, *v.g.* um polissacarídeo ou um segundo polipeptido. Esse radical pode servir de substância portadora para o polipeptido; ou então, em alternativa, o polipeptido do toxóide da difteria da presente invenção pode servir de substância portadora para o radical, aumentando preferencialmente a imunogenicidade do radical. A expressão "substância portadora"

designa uma substância que confere estabilidade a uma molécula associada e/ou ajuda ou melhora o transporte ou a imunogenicidade dessa molécula associada.

Um toxóide da difteria, de acordo com a presente invenção, também pode fazer parte de um polipeptido de fusão constituído pelo polipeptido do toxóide da difteria da presente invenção unido por uma ligação peptídica a um outro polipeptido. De preferência, o polipeptido de fusão está incluído numa vacina que pode ser utilizada para imunizar um paciente humano contra a toxina da difteria. O polipeptido do toxóide da difteria da presente invenção pode funcionar como substância veicular para esse outro polipeptido, aumentando preferencialmente a imunogenicidade desse outro polipeptido. O ADN que codifica o polipeptido de fusão pode ser utilizado directamente como vacina ou pode ser incorporado numa célula e de preferência essa célula (*v.g.* uma célula de uma vacina viva) capaz de expressar o polipeptido de fusão, é utilizada como vacina contra a toxina da difteria. A expressão "polipeptido de fusão", tal como aqui utilizada, designa uma molécula proteica produzida pela expressão de um ADN híbrido em que um ADN que codifica o toxóide da difteria da invenção é ligado, por meios típicos da engenharia genética, a um segundo ADN que codifica uma segunda sequência polipeptídica.

O termo "homologia" aqui utilizado designa a identidade de sequências entre duas moléculas polipeptídicas ou entre duas moléculas de ácido nucleico. Quando uma determinada posição, existente simultaneamente nas duas sequências comparadas, se encontra ocupada pela mesma subunidade monomérica de aminoácidos, *v.g.*, se uma posição em cada uma das duas moléculas polipeptídicas estiver ocupada pelo radical aspartato, então as moléculas são homólogas nessa posição. A homologia entre duas sequências é uma função do número de posições coincidentes partilhadas pelas duas sequências. Por exemplo, se 6 de 10 posições em duas sequências coincidirem ou forem homólogas, então as duas sequências são

homólogas a 60%. A título de exemplo, as sequências de aminoácidos LTVSFR e LPVSAT partilham uma homologia de 50%. Como variante preferencial da invenção, uma forma imunologicamente interreactiva de fragmento A ou de fragmento B da toxina da difteria é pelo menos 40%, de preferência pelo menos 50%, mais preferencialmente pelo menos 60% e muito mais preferencialmente pelo menos 80% homóloga respectivamente com os fragmentos A ou B que ocorrem naturalmente.

Os inventores da presente invenção demonstraram um modo de construir uma forma mutante de fragmento A da toxina da difteria que é segura para administração a um paciente humano, sob a forma de uma estirpe de vacina viva atenuada que expressa o toxóide da invenção. A utilização de uma estirpe de vacina viva tem muitas vantagens no que diz respeito à imunização com um toxóide da difteria por si só. Um organismo vivo prolifera no ser onde está alojado e exprime o antigénio proteico protector clonado. Uma vacina viva atenuada permanece no ser vacinado durante mais tempo do que um polipeptido injectado e produz continuamente *in situ* a proteína concebida por técnicas da engenharia genética. Para uma tal vacina viva pode ser eventualmente necessário um menor número de injecções ou de estímulos de reforço para a imunização eficaz, frequentemente pode ser administrada por via oral e também pode ser utilizada para administrar de uma só vez vários antigénios.

Para tal, os inventores da presente invenção recorreram à via experimental para a suprimir ou para substituir aminoácidos na vizinhança do local activo para a actividade da ADP--ribosiltransferase, isto é, os aminoácidos do lado do radical Glu-148 do terminal NH_2 da figura 1 (SEQ ID NO: 1). Para a realização de tal experiência, os inventores da presente invenção determinara quais seriam as posições dos aminoácidos, se mutacionados para um resíduo Glu, que iriam restituir a actividade tóxica a um toxóide da TD em que faltasse o resíduo crítico

Glu-148. Na posse deste conhecimento, esses resíduos podem ser suprimidos ou alterados de modo a reduzir a probabilidade de ocorrer *in vivo* tal reversão fenotípica. Assim sendo, os inventores da presente invenção conceberam mutações da toxina da difteria que fizeram com que esta fosse enzimaticamente disfuncional e praticamente isenta de qualquer risco de reversão, mesmo num hospedeiro microbiano continuamente proliferante.

O toxóide resultante, combinado com um veículo farmaceuticamente aceitável para formar uma composição de vacina que é depois inoculada no mamífero, gera uma protecção imunitária contra a toxina da difteria. O toxóide é produzido criando em cultura uma célula que contenha um ADN veicular que compreenda o ADN que codifica o toxóide e o ADN regulativo capaz de efectuar a sua expressão.

Outras particularidades e vantagens ressaltam da descrição minuciosa subsequente.

Em primeiro lugar efectuar-se-á a descrição abreviada dos desenhos.

Descrição dos desenhos

A figura 1 é uma representação da sequência nucleotídica e da correspondente sequência de aminoácidos do ADN (SEQ ID NO: 1) que codifica a toxina da difteria de tipo natural.

A figura 2 é uma representação esquemática da estrutura secundária onde se encontra o resíduo Glu-148. Este desenho baseia-se no modelo cristalográfico obtido por raios X, descrito antes, do dímero da TD (Collier *et al.*, WO-A-932176; Choe *et al.*, *Nature* 357:216--222, 1992). O resíduo Glu-148 (E148) está situado numa hélice β, havendo um resíduo removido de um elo que liga esta hélice à hélice β adjacente mais próxima de NH_2. Estão indicadas as pontes hidrogénio entre os átomos N (---) da estrutura e os átomos O (—) do carbonilo existentes nestas duas hélices.

Realizou-se um estudo sobre possíveis mutações num segundo local num arquétipo mutante por supressão de Glu-148 (designado por delta-148 TD) que eventualmente podem provocar a reversão para a situação de toxicidade. Verificou-se que a actividade pode ser parcialmente reconstituída por qualquer uma de duas mutações: a troca da valina-147 pelo ácido glutâmico (uma dupla mudança de base) ou a supressão de 5 resíduos no sentido do terminal amino (uma supressão de quinze nucleótidos), assim se colocando o resíduo Glu-142 na posição adjacente ao resíduo Tir-149. Posto isto, a simples supressão de um resíduo crucial, tal como o Glu-148, não garante que uma mutação num segundo local não venha a restituir a actividade parcial a um toxóide recombinante.

Isto serviu de estímulo para que os inventores da presente invenção construíssem outras aberrações genéticas na TD que pudessem fazer com que fossem necessárias mutações mais intensas para a restituição da toxicidade e consequentemente seria menos provável que ocorressem naturalmente. Em primeiro lugar, realizou-se uma supressão de dois aminoácidos (os resíduos 147 e 148) no local activo da TD. Esta mutação, por si só, faz com que a toxicidade do toxóide da TD seja menos de 10^{-4} a correspondente à da TD de tipo natural no que diz respeito aos níveis de inibição da síntese de proteínas. Além do mais, teria de ocorrer uma modificação adequada de três bases para que houvesse uma mutação do resíduo 146 para um ácido glutâmico e para que fosse restituida qualquer actividade detectável. Em segundo ligar, o resíduo isoleucina na posição 364 foi trocado por um resíduo lisina. Este resíduo está localizado no domínio de translocação e desempenha um papel importante na translocação da TD da vesícula endocítica para o citossol. De forma independente, esta mutação produz um toxóide para o qual se verifica uma deficiência 500 vezes superior na inibição de síntese de proteínas, comparativamente com a TD de tipo natural. Teria de ocorrer a troca adequada de

duas bases para que houvesse uma mutação do resíduo lisina 364 para o resíduo isoleucina e ocorresse uma restituição da toxicidade.

Informação experimental

Métodos

Preparação e Análise dos toxóides da difteria mutantes

As supressões e as substituições podem ser geradas por mutagenese, dirigida por oligo-nucleótidos, do gene do fragmento A da toxina da difteria (ATD, o mesmo que DTA), conforme adiante descrito. Os genes mutantes podem ser depois expressos em *E. coli* ou em qualquer outro sistema de expressão convencional por meio de métodos típicos e os extractos obtidos podem ser analisados para pesquisar a actividade de ADP-ribosiltransferase de NAD:EF-2 e para pesquisar uma proteína especifica da TD, pelo processo analítico das autorradiografias de Western, conforme a seguir se descreve.

Exemplo

Construiu-se um plasmídeo que codifica o fragmento F2 da TD, designado por pBRptac*Bam*HIATGF2, em conformidade com o método de Greenfield *et al.*, (Greenfield *et al.*, *PNAS.* 80:6853-6857, 1983). O fragmento F2 da TD contém a sequência líder da TD que ocorre naturalmente, todo o fragmento A e ainda os 189 resíduos aminoácidos do terminal N do fragmento B, pelo que o arquétipo final contém os aminoácidos 1-382 da SEQ ID NO: 1.

Fez-se digerir o plasmídeo F2 com *Bal*HI e *Cla*I. O fragmento resultante de 949 pares de bases foi depois ligado ao M13mp19 restringido por *Bam*HI e *Acc*I, originando o produto M13mp19-F2. Criou-se então um local de restrição *Nde*I abrangendo o códão de F2 de início

da tradução e um códão de paragem da tradução em Arg-192 do fragmento F2 pelo procedimento de mutagenese dirigida ao local, descrito por Sayers *et al.* (*Nucleic Acids Res.* 16:791, 1988), originando o produto M13mp19-ATD (o mesmo que M13mp19-DTA). O fragmento de *Nde*I-*Hind*III de 968 pares de bases do produto M13mp19-ATD foi então ligado ao pT7-7 restringido por *Nde*I e *Hind*III (Tabor, em Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.*, eds.; Greene, Wiley-Interscience, Nova Iorque, 1991, páginas 16.2.1-16.2.11), tendo o plasmídeo resultante pT7-ATD (o mesmo que pT7-DTA) sido utilizado como vector de clonagem para a preparação de cada um dos arquétipos de ATD obtidos por mutagenese dirigida ao local, enumerados no quadro I. Todos os mutantes obtidos por mutagenese dirigida ao local foram construídos com ADN da matriz do produto M13mp19-ATD e com o oligonucleótido adequado. O fragmento de 539 pares de bases, restringido por *Apa*I-*Bal*I, do produto M13mp19--ATD, que continha a mutação adequada do local activo, foi ligado ao pT7-ATD restringido por *Apa*I e *Bal*I e foi utilizado para transformar a BL21 (DE3) qualificada de *E. coli* (Studier *et al.*, *J. Mol. Biol.* 189:113, 1986). Deixou-se os transformantes crescer de um dia para o outro em caldo de Luria (ampicilina na concentração de 100 μg/mL), diluiu-se à razão de 1/50 em meio incompleto (meio minimal) M9 (ampicilina na concentração de 100 μg/mL), deixou-se crescer até ao valor de DO igual a 1,0, estimulou-se durante 3 horas com IPTG 1mM e colheu-se por centrifugação (3000 x g, 5 min). Com a massa celular preparou-se nova suspensão à razão de 1/30 em volume em meio constituído por Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0 (TE) + $CaCl_2$ 5 mM, $MgCl_2$ 5 mM; submeteu-se a suspensão a três ciclos de congelamento/ /descongelamento; efectuou-se a incubação durante 15 minutos com lisozima na concentração de 1 mg/mL e com 'DNAseI' na concentração de 1 μg/mL; purificou-se por centrifugação (10 000 x g, 10 minutos) e dessalinizou-se sobre 'GH-25 Sephadex', conforme descrito noutro

local (Douglas *et al. J. Bacteriol.* 169:4967, 1987). Mediu-se então a proteína ATD pelo método analítico das autorradiografias de Western e pesquisou-se a actividade de ADP-ribosil-transferase conforme descrito na literatura (Tweten *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:10392, 1985).

Construção da toxina da difteria de comprimento completo delta147, 148;364I>K e delta146--148;364I>K

Fez-se digerir PT7-ATD delta147, 148 e PT7-ATD delta146-148 com ApaI e MscI. Isolou-se o fragmento de ApaI-MscI de 539 pb, abrangendo cada uma das supressões do local activo, a partir de gel de agarose a 1% e ligou-se a 'ptac DT Ser148;364I>K' digerido com ApaI e MscI, para proporcionar os produtos ptacDTdelta147, 148;364I>K e ptacDTdelta146--148;364I>K. Utilizou-se cada um dos plasmídeos para transformar a TG-1 qualificada de *E. coli*. Deixou-se os transformantes crescer durante a noite em caldo de Luria contendo ampicilina na concentração de 100 μg/mL (L-amp), diluiu-se à razão de 1/50 em L-amp, tendo crescido até se obter um valor de DO igual a 1,0, estimulou-se durante 3 horas com IPTG e efectuou-se a colheita por centrifugação (3000 x g, 5 minutos). Com as massas celulares preparou-se nova suspensão à razão de 1/30 em volume em Tris 10 mM, EDTA 1 mM a pH 8,0, (TE) + $CaCl_2$ 5mM, $MgCl_2$ 5mM; depois foram realizados três ciclos de congelamento e descongelamento; incubou-se durante 15 minutos com lisozima na concentração de 0,1 mg/mL e DNAseI na concentração de 1 μg/mL; purificou-se por centrifugação (10 000 x g; 10 minutos) e dessalinizou-se sobre 'G-50 Sephadex' em conformidade com o mesmo método utilizado para a dessalinização com 'G-25 Sephadex', conforme descrito antes.

Resultados

Após a supressão do resíduo Glu-148 (quadro 1, mutação 1), era indetectável a actividade específica de ADP-ribosiltransferase de NAD:EF-2 da forma resultante de ATD mutante (menos de 10^{-4} comparativamente com o valor do ATD de tipo natural). No entanto, esta supressão, quando combinada com a substituição de um resíduo Val-147 por um resíduo Glu, originou um produto com 6% da actividade do tipo natural (quadro 1, mutação 7). Pelo contrário, a supressão do resíduo Glu-148 associada a uma mutação por troca de Tir-149 por Glu (quadro 1, mutação 12) deu origem a um produto inactivo.

Supressões mais extensa, que vão desde o resíduo Glu-148 do terminal NH_2 até à região do resíduo 144 (quadro 1, mutações 2 a 5) deram origem a produtos sem nenhuma actividade detectável de ADP-ribosilação. No entanto, o arquétipo subsequente desta série (quadro 1, mutação 6), envolvendo a supressão dos resíduos 143 a 148 inclusive, deu origem a uma proteína com actividade detectável (0,6% da actividade de tipo natural). Na mutação 6, ao contrário das mutações 1 a 5, o resíduo mais próximo de NH_2 que flanqueia a supressão é um ácido glutâmico (Glu-142). Observou-se uma actividade variando entre 0,6% e 9% do valor correspondente ao do ATD de tipo natural quando cada supressão (mutações 1 a 5) foi combinada com a substituição do resíduo de flanqueamento mais próximo de NH_2 com um resíduo Glu (quadro 1, mutações 7 a 11).

Os arquétipos de comprimento completo da toxina da difteria, que possuem as supressões específicas do local activo mais a adição de uma modificação do domínio de translocação membranar, foram ainda submetidos a uma avaliação para determinação da estabilidade geral da proteína. A análise pelo método das autorradiografias de Western, efectuada sobre os dois arquétipos de comprimento completo da toxina da difteria (delta147, 148;364I>K e

delta146-148;364I>K), revelou uma banda proteica singular de comprimento completo com poucos produtos de degradação, sugerindo talo facto que a integridade da proteína foi conservada.

Estes resultados de mutação do local activo são consistentes com um modelo em que o polipeptido local no flanco do Glu-148 mais próximo de NH_2 é mais flexível e está fixado menos firmemente do que o péptido local no flanco mais próximo de COOH. A estrutura cristalográfica do dímero da TD, observada aos raios X (Collier *et al.*, U.S.S.N. 07/881, 394) confirma a consistência deste modelo. O resíduo Glu-148 está situado dentro de uma folha β antiparalela que liga a fissura do local activo e constitui o único resíduo retirado de um elo grande de 10 resíduos (os resíduos 137 a 146) que une a hélice β de Glu-148 à hélice β adjacente mais próxima de NH_2 (figura 2). A estrutura polipeptídica dos 4 resíduos imediatamente a seguir ao Glu--148 (resíduos 149-152) está implicada na ligação por uma ponte hidrogénio típica da folha β antiparalela e tal ligação, em conjunto com outras interacções de acondicionamento, pode fixar firmemente esta região do polipeptido dentro da proteína.

Estes resultados ilustram duas alterações genéticas discretas, uma referente a uma substituição e a outra referente a mais uma supressão, cada uma delas capaz de provocar a reversão de um mutante por supressão do local activo de uma toxina da difteria enzimaticamente inactiva, levando-o para um estado parcialmente tóxico. Em todos os casos os níveis de actividade restituída são inferiores a 10% dos valores observados no tipo natural, mas são nitidamente preocupantes se a proteína se destinar a ser expressa *in vivo* por uma vacina viva. A troca de Val-147 por Glu poderia ocorrer através de qualquer de duas possíveis transversões de dois pares de bases do códão Val (GTT) num códão Glu (GAA ou GAG). Pelo contrário, a supressão simultânea do códão Val-147 e do códão Glu-148 deixa ficar o resíduo Ser-146 em posição imediatamente adjacente ao Tir-149; uma vez que o códão Ser AGC não pode ser convertido

num códão Glu sem que haja uma modificação na totalidade dos três nucleótidos, o risco de reversão deste mutante particular, por supressão de seis nucleótidos para originar o mutante com uma certa actividade restituída, é bastante menor (uma probabilidade inferior a 10^{-10}/ /célula/geração) do que o risco de reversão do mutante a que apenas falta o códão Glu-148.

Além disso, a construção de um toxóide da difteria, por meios da engenharia genética, que possua simultaneamente uma supressão do local activo e uma outra aberração independente (disfunção de translocação membranar) reduz ainda mais o risco de reversão para um estado de toxicidade. Qualquer dos TD delta147, 148 ou delta146-148 acoplado a 364I>K necessitaria de cinco modificações de bases adequadas (três nos resíduos 146 ou 145 e duas no resíduo 364) para que houvesse uma restituição de uma toxicidade detectável.

Este toxóide recombinante, TD delta147,148;364I>K, foi clonado, expresso em *E. coli* e sujeito a uma avaliação para investigar a estabilidade global da proteína e a actividade da ADP-ribosiltransferase. A análise pelo método das autorradiografias de Western revelou a existência de uma única proteína de comprimento completo com poucos produtos de degradação, sugerindo tal facto que a estabilidade e integridade estrutural geral da proteína foram mantidas. Conforme havia sido previsto, o toxóide recombinante não tinha actividade ($<10^{-4}$ comparativamente com o valor observado para a toxina de tipo natural).

Imunogenicidade

Depois de se confirmar que à proteína mutante assim produzida lhe falta actividade enzimática detectável, é possível então analisar os mutantes para investigar a sua imunogenicidade, conforme a seguir se descreve.

Procedeu-se à imunização de cobaias (ou de outras espécies naturalmente sensíveis aos efeitos de aniquilação celular da toxina da difteria com o toxóide recombinante da presente

invenção, de acordo com o protocolo a seguir indicado. Colocou-se em suspensão entre 1 μg e 50μg de toxóide recombinante, numa quantidade compreendida entre 50 μL e 100 μL de adjuvante completo de Freund, e depois injectou-se numa cobaia nos dias 1, 12 e 24 da experiência. A seguir efectuou-se uma análise de amostras de sangue para pesquisar a existência de anticorpos antitoxina, tendo para tal sido testadas diluições em série para determinação da reactividade à toxina da difteria que ocorre naturalmente. Os animais que receberam doses suficientemente elevadas de toxóide para induzir a formação de antitoxóides podem ser estimulados com a toxina da difteria de tipo natural para se pesquisar se os anticorpos são protectores. Os toxóides da invenção que induzem uma resposta positiva na experiência agora descrita são provavelmente produtos elegíveis para incorporação em vacinas vivas.

E possível testar microrganismos adequados de vacinas vivas (células ou vírus), obtidos por técnicas da engenharia genética para exprimirem um toxóide da invenção, injectando a vacina elegível num animal sensível à TD e depois, decorridos 2 a 3 meses de um período de incubação, o animal em causa pode ser estimulado alternativamente com a) uma dose letal de TD do tipo que ocorre naturalmente ou b) doses múltiplas administradas sequencialmente de TD do tipo que ocorre naturalmente, por forma a calibrar o domínio de imunidade adquirida.

Preparação e utilização de um ADN codificante de um toxóide da difteria

Uma sequência de ADN codificante de um toxóide da difteria, da presente invenção, pode ser expresso por métodos convencionais numa célula hospedeira procariótica. O ADN codificante do toxóide da difteria da presente invenção, é transportado num vector funcionalmente ligado para regular os sinais capazes de efectuarem a expressão no hospedeiro procariótico. Se desejado, a sequência codificante pode conter, na sua extremidade 5', uma sequência codificante de

qualquer uma das sequências de sinal conhecidas, capazes de efectuarem a secreção da proteína expressa dentro do espaço periplásmico da célula hospedeira, facilitando assim a recuperação a proteína. A título de exemplo, um vector que expresse o toxóide da difteria da presente invenção, ou uma proteína de fusão que contenha o polipeptido da invenção, pode ser constituído por (i) uma origem de replicação funcional em *E. coli* obtida a partir do plasmídeo pBR322; (ii) um gene seleccionável da resistência à tetraciclina, também ele obtido a partir do plasmídeo pBR322; (iii) uma região de terminação da transcrição, *v.g.* a terminação do operão trp de *E. coli* (colocado na extremidade do gene da resistência à tetraciclina para impedir a transcrição incorrecta ou defeituosa (em excesso) dentro da região do promotor trp); (iv) um promotor de transcrição, *v.g.* o promotor do operão trp, ou o promotor da toxina da difteria; (v) a sequência da invenção que codifica a proteína; e (vi) um terminador da transcrição, *v.g.* a sequência T1T2 do local do ARN ribossómico (rrnB) de *E. coli*. As sequências das moléculas portadoras, os métodos utilizados na síntese das sequências de ADN, a construção dos genes de fusão e os vectores e os sistemas de expressão adequados são bem conhecidos pelos especialistas na matéria. É possível conceber sistemas de expressão semelhantes para os polipeptidos de fusão ou de não fusão, isto é, para a expressão do polipeptido da invenção por si só. Estes procedimentos são um exemplo dos métodos da invenção, mas sem que isso constitua qualquer limitação.

Os hospedeiros procarióticos mais frequentemente utilizados são seleccionados entre as diversas estirpes de *E. coli;* no entanto também é possível utilizar outras estirpes microbianas, *v.g. C. diptheriae*. São utilizados vectores plasmídicos que contêm origens de replicação, marcadores seleccionáveis e sequências de controlo obtidas a partir de espécies compatíveis com o hospedeiro microbiano. Por exemplo é possível transformar *E. coli* utilizando derivados de

pBR322, que é um plasmídeo construído por Bolivar *et al.* (*Gene* 2:95, 1977), utilizando fragmentos obtidos a partir de três plasmídeos que ocorrem naturalmente, dois isolados a partir de espécies de *Salmonella* e um isolado a partir de *E. coli*. O plasmídeo pBR322 contém genes para a resistência à ampicilina e à tetraciclina e por tal motivo proporciona marcadores seleccionáveis múltiplos que podem ser conservados ou destruídos na construção do desejado vector de expressão. As sequências de controlo de expressão procariótica vulgarmente utilizadas (também designadas por "elementos reguladores") são aqui definidas de modo a conterem os promotores para o início da transcrição, facultativamente com um operador, conjuntamente as sequências dos locais de ligações ribossómicas. Os promotores vulgarmente utilizados para dirigirem a expressão proteica compreendem os sistemas promotores da β-lactamase (penicilinase), da lactose (lac) (Chang *et al.*, *Nature* 198:1056, 1977) e do triptofano (trp) (Goeddel *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 8:4057, 1980) e também o promotor P_L derivado de lambda e o local de ligação ribossómica do gene N (Shimatake *et al.*, *Nature* 292:128, 1981). Para ilustrar a invenção apresenta-se, sem que isso constitua qualquer limitação, uma listagem de estirpes microbianas, vectores e sequências reguladoras associadas.

Preparação e utilização de uma vacina polipeptídica

O toxóide da difteria mutante de acordo com a invenção pode ser expresso num sistema de expressão proteico conhecido e purificado depois por meios convencionais. Por exemplo, é possível sintetizar os toxóides da difteria, de acordo com a presente invenção, por métodos de síntese da química orgânica, ou então podem ser produzidos como polipeptidos biossintetizados. A síntese por métodos da química orgânica pode ser realizada por quaisquer métodos convencionais de síntese automática de péptidos, ou então por meio de técnicas clássicas da

química orgânica. Uma pessoa habilitada neste domínio pode purificar o polipeptido do toxóide da difteria de acordo com a invenção recorrendo a métodos convencionais de isolamento de proteínas, *v.g.* métodos que compreendem, sem que isso constitua qualquer limitação, as técnicas de precipitação, cromatografia, imunoadsorção ou por afinidade.

O polipeptido pode ser purificado a partir das células, ou a partir do meio que contém as células, de uma estirpe microbiana concebida por meio de técnicas da engenharia genética para exprimir o toxóide da difteria de acordo com a invenção.

O polipeptido purificado pode ser combinado com um veículo adequado (por exemplo, uma solução salina fisiológica); com um adjuvante que aumente a imunogenicidade do toxóide (por exemplo, sais de alumínio, endotoxinas bacterianas ou estirpes bacterianas atenuadas (*v.g.* BCG ou *Bordetella pertussis*), vírus atenuados, lipossomas, microesferas, adjuvante de Freund completo ou incompleto); e/ou com toxóides complementares ou organismos de vacinas exterminados ou atenuados (para formar uma vacina plurivalente). Tal vacina pode ser administrada depois a um ser humano por meio de um qualquer método aceitável, por exemplo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, pelas vias oral, parentérica, trans-dermal e transmucosal. A administração pode ser realizada numa formulação de libertação prolongada, servindo para tal um polímero biocompatível e biodegradável, por exemplo, uma microesfera, por administração localizada, utilizando micelas, geles ou lipossomas, ou por modos transgénicos (*v.g.* por administração biobalística do ADN da invenção directamente dentro das células do paciente, conforme descrito por Tang *et al.*, *Nature* 356:152-154, 1992.

Preparação e utilização de vacinas recombinantes vivas

Os organismos vivos adequados que servem de veículos são os microrganismos atenuados, tais como BCG, *Salmonella sp.*, *Vibrio cholerae, Streptococci, Listeriae* e *Yersiniae.*

O ADN da invenção pode ser transfectado de forma estável para dentro de uma tal estirpe microbiana, por métodos convencionais (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. Press, Nova Iorque, 1989), que depois poderá ser introduzida num paciente, por exemplo, por administração oral ou parentérica. Uma vez introduzida no paciente, a bactéria multiplicar-se-á e irá exprimir a forma mutante da toxina da difteria dentro do paciente, fazendo com que este mantenha um nível protector de anticorpos contra a toxina mutante. De igual modo, também é possível utilizar como organismo veicular um vírus atenuado de um animal, por exemplo, seleccionado entre adenovirus, vírus do herpes, vírus da varíola, da poliomielite, avipoxvirus ou ainda parasitas eucarióticos atenuados, tais como *Leishmania.* O ADN mutante da invenção pode ser incorporado por meio de técnicas da engenharia genética no genoma de qualquer vírus adequado que é por sua vez introduzido então num ser humano vacinado, por métodos convencionais. Uma vacina viva da presente invenção pode ser administrada, por exemplo, à razão de cerca de 10^4-10^8 organismos/dose, ou segundo uma dose que seja suficiente para induzir de forma estável níveis protectores de antitoxina. As does reais de uma tal vacina podem ser determinadas facilmente por qualquer especialista no domínio da tecnologia das vacinas.

Ensaio de Exterminação Celular

Os métodos convencionais para estudar a toxicidade dos mutantes da toxina da difteria compreendem a utilização de uma linhagem celular, criada em cultura, de tecidos sensíveis à toxina da difteria, que é uma linhagem de células portadoras do receptor da toxina da difteria, *v.g.* células virais ou células BSC1. As células são tratadas com uma quantidade conhecida do mutante elegível da toxina da difteria, conjuntamente com a toxina da difteria que ocorre

naturalmente (como contraprova positiva), ou com albumina de soro de bovino (que constitui a contraprova negativa). A seguir à incubação realiza-se um ensaio de sobrevivência contando as colónias viáveis (Yamaizumi, M. *et al.*, Cell 15:245-250, 1978). Em alternativa, é possível determinar a aniquilação celular medindo a intensidade da inibição de síntese de proteínas. Após a incubação com uma das amostras da toxina da difteria descritas antes, acrescenta-se o aminoácido radiomarcado (*v.g.* [^{14}C]leu) ao meio de crescimento da cultura celular e mede-se o declínio na síntese proteica *de novo*, contando o número de cintilações da proteína precipitável pelo ATC (o mesmo que TCA). Tais métodos são vulgares e conhecidos pelos especialistas na matéria.

Outras variantes

Seguidamente são enumeradas outras variantes possíveis no âmbito da invenção. Por exemplo, é possível gerar uma forma mutante do fragmento A da toxina da difteria a que falte Glu-142 e também Val-147 e Glu-148, ou a que faltem todos os resíduos desde Glu-142 até Glu-148 inclusive. Tais mutantes por supressão podem ser gerados por mutagenese dirigida ao local (Sayers *et al.*, *supra*) e sujeitos a análise para estudo da actividade enzimática e da imunogenicidade, conforme descrito antes. Entre os outros resíduos aminoácidos para os quais se comprovou que eram essenciais para a actividade biológica da toxina da difteria refere-se os resíduos seleccionados entre His-21, Gli-22, Lis-39, Gli-52, Gli-79, Gli-128, Ala-158 e Gli-162 da parcela do fragmento A da toxina da difteria e os resíduos Glu-349, Asp-352 e Ile-364 da parcela do fragmento B. Os mutantes aos quais falte um ou vários destes resíduos, para além de lhes faltar simultaneamente os resíduos Val-147 e Glu-148 podem ser gerados por métodos convencionais de mutagenese dirigida ao local, conhecidos pelos especialistas na matéria.

Quadro 1. Actividades da ADP-ribosiltransferase do fragmento A da toxina da difteria com mutações no local activo

Resíduo #:	141	142	143	144	145	146	147	148	149	
Aminoácido:	Ala	Glu	Gli	Ser	Ser	Ser	Val	Glu	Tir	
Mutação										Actividade
Nenhuma										100%
1								____*		ND**
2							____	____		ND
3						____	____	____		ND
4					____	____	____	____		ND
5				____	____	____	____	____		ND
6			____	____	____	____	____	____		0,6%
7							Glu	____		6%
8						Glu	____	____		9%
9					Glu	____	____	____		6%
10				Glu	____	____	____	____		0,6%
11			Glu	____	____	____	____	____		4%
12								____	Glu	ND

*____ indica um resíduo suprimido

**ND indica um valor de actividade de tipo natural inferior a 10^{-4}

ENUMERAÇÃO DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: R. John Collier
Kevin P. Killeen
John J. Mekalanos

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Vacinas de toxina da difteria

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 1

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) ENDEREÇO: Fish & Richardson

(B) RUA: 225 Franklin Street

(C) CIDADE: Boston

(D) ESTADO: Massachusetts

(E) PAÍS: E.U.A.

(F) CÓDIGO POSTAL: 02110-2804

(v) FORMA LEGÍVEL POR COMPUTADOR:

(A) SUPORTE: disquete 3,5", 1,44 Mb

(B) COMPUTADOR: IBM de modelo PS/2 50Z ou 55SX

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS IBM (versão 3.30)

(D) PROGRAMA INFORMÁTICO: Word Perfect (versão 5.0)

(vi) DADOS ACTUAIS DO PEDIDO:

(A) NÚMERO DO PEDIDO:

(B) DATA DE DEPÓSITO:

(C) CLASSIFICAÇÃO:

(vi) DADOS ANTERIORES **DO PEDIDO**:

(A) NÚMERO DO PEDIDO:

(B) DATA DE DEPÓSITO:

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE O REPRESENTANTE/AGENTE:

(A) NOME: Janis K. Fraser

(B) NÚMERO DO PEDIDO: 34 819

(C) REFERÊNCIA/NÚMERO DO PROCESSO: 00246/137001

(ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:

(A) TELEFONE: (617) 542-5070

(B) TELEFAX: (617) 542-8906

(C) TELEX: 200154

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA COM O NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 1942

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: dupla

(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

```
CCGGCGTTGC GTATCCAGTG GCTACACTCA GGTTGTAATG ATTGGGATGA TGTACCTGAT   60
CTGAGAGCGA TTAAAAACTC ATTGAGGAGT AGGTCCCGAT TGGTTTTTGC TAGTGAAGCT  120
TAGCTAGCTT TCCCCATGTA ACCAATCTAT CAAAAAAGGG CATTGATTTC AGAGCACCCT  180
TATAATTAGG ATAGCTTTAC CTAATTATTT TATGAGTCCT GGTAAGGGGA TACGTTGTGA  240
GCAGAAAACT GTTTGCGTCA ATCTTAATAG GGGCGCTACT GGGGATAGGG GCCCCACCTT  300
CAGCCCATGC A                                                       311
```

GGC	GCT	GAT	GAT	GTT	GTT	GAT	TCT	TCT	AAA	TCT	TTT	GTG	ATG	GAA	AAC	359
Gli	Ala	Asp	Asp	Val	Val	Asp	Ser	Ser	Lis	Ser	Phe	Val	Met	Glu	Asn	
1				5					10					15		
TTT	TCT	TCG	TAC	CAC	GGG	ACT	AAA	CCT	GGT	TAT	GTA	GAT	TCC	ATT	CAA	407
Phe	Ser	Ser	Tir	His	Gli	Thr	Lis	Pro	Gli	Tir	Val	Asp	Ser	Ile	Gln	
			20					25					30			
AAA	GGT	ATA	CAA	AAG	CCA	AAA	TCT	GGT	ACA	CAA	GGA	AAT	TAT	GAC	GAT	455
Lis	Gli	Ile	Gln	Lis	Pro	Lis	Ser	Gli	Thr	Gln	Gli	Asn	Tir	Asp	Asp	
		35					40					45				
GAT	TGG	AAA	GGG	TTT	TAT	AGT	ACC	GAC	AAT	AAA	TAC	GAC	GCT	GCG	GGA	503
Asp	Trp	Lis	Gli	Phe	Tir	Ser	Thr	Asp	Asn	Lis	Tir	Asp	Ala	Ala	Gli	
	50					55					60					
TAC	TCT	GTA	GAT	AAT	GAA	AAC	CCG	CTC	TCT	GGA	AAA	GCT	GGA	GGC	GTG	551
Tir	Ser	Val	Asp	Asn	Glu	Asn	Pro	Leu	Ser	Gli	Lis	Ala	Gli	Gli	Val	
65					70					75					80	

GTC Val	AAA Lis	GTG Val	ACG Thr	TAT Tir 85	CCA Pro	GGA Gli	CTG Leu	ACG Thr	AAG Lis 90	GTT Val	CTC Leu	GCA Ala	CTA Leu	AAA Lis 95	GTG Val	599
GAT Asp	AAT Asn	GCC Ala	GAA Glu 100	ACT Thr	ATT Ile	AAG Lis	AAA Lis	GAG Glu 105	TTA Leu	GGT Gli	TTA Leu	AGT Ser	CTC Leu 110	ACT Thr	GAA Glu	647
CCG Pro	TTG Leu	ATG Met 115	GAG Glu	CAA Gln	GTC Val	GGA Gli	ACG Thr 120	GAA Glu	GAG Glu	TTT Phe	ATC Ile	AAA Lis 125	AGG Arg	TTC Phe	GGT Gli	695
GAT Asp	GGT Gli 130	GCT Ala	TCG Ser	CGT Arg	GTA Val	GTG Val 135	CTC Leu	AGC Ser	CTT Leu	CCC Pro	TTC Phe 140	GCT Ala	GAG Glu	GGG Gli	AGT Ser	743
TCT Ser 145	AGC Ser	GTT Val	GAA Glu	TAT Tir	ATT Ile 150	AAT Asn	AAC Asn	TGG Trp	GAA Glu	CAG Gln 155	GCG Ala	AAA Lis	GCG Ala	TTA Leu	AGC Ser 160	791
GTA Val	GAA Glu	CTT Leu	GAG Glu	ATT Ile 165	AAT Asn	TTT Phe	GAA Glu	ACC Thr	CGT Arg 170	GGA Gli	AAA Lis	CGT Arg	GGC Gli	CAA Gln 175	GAT Asp	839
GCG Ala	ATG Met	TAT Tir	GAG Glu 180	TAT Tir	ATG Met	GCT Ala	CAA Gln	GCC Ala 185	TGT Cis	GCA Ala	GGA Gli	AAT Asn	CGT Arg 190	GTC Val	AGG Arg	887
CGA Arg	TCA Ser	GTA Val 195	GGT Gli	AGC Ser	TCA Ser	TGG Leu	TCA Ser 200	TGC Cis	ATA Ile	AAT Asn	CTT Leu	GAT Asp 205	TGG Trp	GAT Asp	GTG Val	935
ATA Ile	AGG Arg 210	GAT Asp	AAA Lis	ACT Thr	AAG Lis	ACA Thr 215	AAG Lis	ATA Ile	GAG Glu	TCT Ser	TTG Leu 220	AAA Lis	GAG Glu	CAT His	GGC Gli	983
CCT Pro 225	ATC Ile	AAA Lis	AAT Asn	AAA Lis	ATG Met 230	AGC Ser	GAA Glu	AGT Ser	CCC Pro	AAT Asn 235	AAA Lis	ACA Thr	GTA Val	TCT Ser	GAG Glu 240	1031
GAA Glu	AAA Lis	CGT Ala	AAA Lis	CAA Gln 245	TAC Tir	CTA Leu	GAA Glu	GAA Glu	TTT Phe 250	CAT His	CAA Gln	ACG Thr	GCA Ala	TTA Leu 255	GAG Glu	1079
CAT His	CCT Pro	GAA Glu	TTG Leu 260	TCA Ser	GAA Glu	CTT Leu	AAA Lis	ACC Thr 265	GTT Val	ACT Thr	GGG Gli	ACC Thr	AAT Asn 270	CCT Pro	GTA Val	1127
TTC Phe	GCT Ala	GGG Gli 275	GCT Ala	AAC Asn	TAT Tir	GCG Ala	GCG Ala 280	TGG Trp	GCA Ala	GTA Val	AC Asn	GTT Val 285	GCG Ala	CAA Gln	GTT Val	1175
ATC Ile	GAT Asp 290	AGC Ser	GAA Glu	ACA Thr	GCT Ala	GAT Asp 295	AAT Asn	TTG Leu	GAA Glu	AAG Lis	ACA Thr 300	ACT Thr	GCT Ala	GCT Ala	CTT Leu	1223

TCG Ser 305	ATA Ile	CTT Leu	CCT Pro	GGT Gli	ATC Ile 310	GGT Gli	AGC Ser	GTA Val	ATG Met	GGC Gli 315	ATT Ile	GCA Ala	GAC Asp	GGT Gli	GCC Ala 320	1271
GTT Val	CAC His	CAC His	AAT Asn	ACA Thr 325	GAA Glu	GAG Glu	ATA Ile	GTG Val	GCA Ala 330	CAA Gln	TCA Ser	ATA Ile	GCT Ala	TTA Leu 335	TCG Ser	1319
TCT Ser	TTA Leu	ATG Met	GTT Val 340	GCT Ala	CAA Gln	GCT Ala	ATT Ile	CCA Pro 345	TTG Leu	GTA Val	GGA Gli	GAG Glu	CTA Leu 350	GTT Val	GAT Asp	1367
ATT Ile	GGT Gli	TTC Phe 355	GCT Ala	GCA Ala	TAT Tir	AAT Asn	TTT Phe 360	GTA Val	GAG Glu	AGT Ser	ATT Ile	ATC Ile 365	AAT Asn	TTA Leu	TTT Phe	1415
CAA Gln	GTA Val 370	GTT Val	CAT His	AAT Asn	TCG Ser	TAT Tir 375	AAT Asn	CGT Arg	CCC Pro	GCG Ala	TAT Tir 380	TCT Ser	CCG Pro	GGG Gli	CAT His	1463
AAA Lis 385	ACG Thr	CAA Gln	CCA Pro	TTT Phe	CTT Leu 390	CAT His	GAC Asp	GGG Gli	TAT Tir	GCT Ala 395	GTC Val	AGT Ser	TGG Trp	AAC Asn	ACT Thr 400	1511
GTT Val	GAA Glu	GAT Asp	TCG Ser	ATA Ile 405	ATC Ile	CGA Arg	ACT Thr	GGT Gli	TTT Phe 410	CAA Gln	GGG Gli	GAG Glu	AGT Ser	GGG Gli 415	CAC His	1559
GAC Asp	ATA Ile	AAA Lis	ATT Ile 420	ACT Thr	GCT Ala	GAA Glu	AAT Asn	ACC Thr 425	CCG Pro	CTT Leu	CCA Pro	ATC Ile	GCG Ala 430	GGT Gli	GTC Val	1607
CTA Leu	CTA Leu	CCG Pro 435	ACT Thr	ATT Ile	CCT Pro	GGA Gli	AAG Lis 440	CTG Leu	GAC Asp	GTT Val	AAT Asn	AAG Lis 445	TCC Ser	AAG Lis	ACT Thr	1655
CAT His	ATT Ile 450	TCC Ser	GTA Val	AAT Asn	GGT Gli	CGG Arg 455	AAA Lis	ATA Ile	AGG Arg	ATG Met	CGT Arg 460	TGC Cis	AGA Arg	GCT Ala	ATA Ile	1703
GAC Asp 465	GGT Gli	GAT Asp	GTA Val	ACT Thr	TTT Phe 470	TGT Cis	CGC Arg	CCT Pro	AAA Lis	TCT Ser 475	CCT Pro	GTT Val	TAT Tir	GTT Val	GGT Gli 480	1751
AAT Asn	GGT Gli	GTG Val	CAT His	GCG Ala 485	AAT Asn	CTT Leu	CAC His	GTG Val	GCA Ala 490	TTT Phe	CAC His	AGA Arg	AGC Ser	AGC Ser 495	TCG Ser	1799
GAG Glu	AAA Lis	ATT Ile	CAT His 500	TCT Ser	AAT Asn	GAA Glu	ATT Ile	TCG Ser 505	TCG Ser	GAT Asp	TCC Ser	ATA Ile	GGC Gli 510	GTT Val	CTT Leu	1847
GGG Gli	TAC Tir	CAG Gln 515	AAA Lis	ACA Thr	GTA Val	GAT Asp	CAC His 520	ACC Thr	AAG Lis	GTT Val	AAT Asn	TCT Ser 525	AAG Lis	CTA Leu	TCG Ser	1895

CTA	TTT	TTT	GAA	ATC	AAA	AGC	TGAAAGGTAG	TGGGGTCGTG	TGCCGG	1942
Leu	Phe	Phe	Glu	Ile	Lis	Ser				
	530					535				

Lisboa, 14 de Janeiro de 2000

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.
1250 LISBOA

Reivindicações

1. ADN que codifica uma forma imunologicamente interreactiva de fragmento A da toxina da difteria, em que os codões correspondentes a Val-147 e Glu-148 da toxina da difteria que ocorre naturalmente (fig. 1; SEQ ID NO: 1) estão ausentes do referido ADN.

2. ADN de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda o referido ADN uma sequência de ácido nucleico que codifica uma parte ou a totalidade do fragmento B da toxina da difteria.

3. ADN de acordo com a reivindicação 1, em que o códão correspondente a Glu-142 (Fig. 1; SEQ ID NO: 1) está ausente ou foi alterado para codificar um aminoácido diferente de Glu.

4. ADN de acordo com a reivindicação 3, em que todos os codões desde Glu-148 (Fig. 1; SEQ ID NO: 1) estão ausentes.

5. ADN de acordo com a reivindicação 1, em que o códão corresponde a um terceiro resíduo aminoácido da referida toxina que ocorre naturalmente foi suprimido ou alterado para codificar um resíduo aminoácido diferente do referido terceiro resíduo aminoácido da referida toxina que ocorre naturalmente, sendo a presença do referido terceiro resíduo aminoácido da referida toxina que ocorre naturalmente essencial para a actividade tóxica completa da referida toxina que ocorre naturalmente.

6. ADN de acordo com a reivindicação 5, em que o referido terceiro resíduo aminoácido está na parcela do fragmento A da toxina da difteria.

7. ADN de acordo com a reivindicação 6, em que o referido terceiro resíduo aminoácido da referida toxina que ocorre naturalmente é seleccionado entre His-21, Gli-22, Lis-39, Gli-52, Gli-79, Gli-128 ou Glu-162 (Fig. 1; SEQ ID NO: 1).

8. ADN de acordo com a reivindicação 5, em que o referido terceiro resíduo aminoácido está na parcela do fragmento B da toxina da difteria.

9. ADN de acordo com a reivindicação 8, em que o referido terceiro resíduo aminoácido da referida toxina que ocorre naturalmente é seleccionado entre Glu-349, Asp-352 ou Ile-364.

10. ADN de acordo com a reivindicação 1, compreendendo o referido ADN um códão que codifica Tir-149 da toxina da difteria que ocorre naturalmente.

11. Polipeptido codificado pelo ADN da reivindicações 1.

12. Preparação praticamente pura do polipeptido da reivindicação 11.

13. Célula que compreende o ADN da reivindicação 1.

14. Célula da reivindicação 13, sendo seleccionada entre as células de *B. subtilis, BCG, Salmonella sp., Vibrio Cholerae, Listeriae, Yersiniae, Streptococci, Corynebacterium diphtheriae* ou *E. coli*.

15. Vacina que compreende o ADN da reivindicação 1.

16. Vacina que compreende a célula da reivindicação 13.

17. Composição que compreende o polipeptido da reivindicação 11 e um adjuvante.

18. Método para produzir um polipeptido, consistindo tal método em criar em cultura a célula da reivindicação 13 em condições que permitam a expressão do referido ADN.

19. Método para a produção de uma vacina, consistindo tal método em criar em cultura a célula da reivindicação 13 em condições que permitam a proliferação da referida célula, sendo tal célula adequada para introdução num mamífero, sob a forma de uma vacina de células vivas.

20. Polipeptido de acordo com a reivindicação 11, estando o referido polipeptido ligado de forma covalente a uma radical que compreende um polissacarídeo ou um segundo polipeptido.

21. Polipeptido de acordo com a reivindicação 20, em que o referido radical compreende uma substância portadora.

22. Polipeptido de fusão constituído pelo polipeptido da reivindicação 11 ligado por uma ponte peptídica a um segundo polipeptido.

23. Vacina que compreende o polipeptido de fusão da reivindicação 2 ou um ADN que codifique o referido polipeptido de fusão.

24. ADN que codifica o polipeptido de fusão da reivindicação 22.

25. Célula que compreende o ADN da reivindicação 24.

26. Polipeptido de acordo com a reivindicação 20, servindo o referido polipeptido de substância veicular para o referido radical.

27. Polipeptido de acordo com a reivindicação 22, servindo o referido polipeptido de substância portadora para o referido segundo polipeptido.

28. Polipeptido de acordo com a reivindicação 26, em que a referida substância portadora aumenta a imunogenicidade do referido radical.

29. Polipeptido de acordo com a reivindicação 27, em que a referida substância portadora aumenta a imunogenicidade do referido segundo polipeptido.

Lisboa, 14 de Janeiro de 2000

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.
1250 LISBOA

Resumo

"Vacinas de toxina da difteria"

ADN que codifica uma forma imunologicamente interreactiva do fragmento A da toxina da difteria, em que os codões correspondentes a Val-147 e Glu-148 da toxina da difteria que ocorre naturalmente foram suprimidos nesse ADN.

Lisboa, 14 de Janeiro de 2000

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.
1250 LISBOA

CCGGCGTTGC GTATCCAGTG GCTACACTCA GGTTGTAATG ATTGGGATGA TGTACCTGAT 60
CTGAGAGCGA TTAAAAACTC ATTGAGGAGT AGGTCCCGAT TGGTTTTTGC TAGTGAAGCT 120
TAGCTAGCTT TCCCCATGTA ACCAATCTAT CAAAAAAGGG CATTGATTTC AGAGCACCCT 180
TATAATTAGG ATAGCTTTAC CTAATTATTT TATGAGTCCT GGTAAGGGGA TACGTTGTGA 240
GCAGAAAACT GTTTGCGTCA ATCTTAATAG GGGCGCTACT GGGGATAGGG GCCCCACCTT 300
CAGCCCATGC A 311

GGC Gli 1	GCT Ala	GAT Asp	GAT Asp	GTT Val 5	GTT Val	GAT Asp	TCT Ser	TCT Ser	AAA Lis 10	TCT Ser	TTT Phe	GTG Val	ATG Met	GAA Glu 15	AAC Asn	359
TTT Phe	TCT Ser	TCG Ser	TAC Tir 20	CAC His	GGG Gli	ACT Thr	AAA Lis	CCT Pro 25	GGT Gli	TAT Tir	GTA Val	GAT Asp	TCC Ser 30	ATT Ile	CAA Gln	407
AAA Lis	GGT Gli	ATA Ile 35	CAA Gln	AAG Lis	CCA Pro	AAA Lis	TCT Ser 40	GGT Gli	ACA Thr	CAA Gln	GGA Gli	AAT Asn 45	TAT Tir	GAC Asp	GAT Asp	455
GAT Asp	TGG Trp 50	AAA Lis	GGG Gli	TTT Phe	TAT Tir	AGT Ser 55	ACC Thr	GAC Asp	AAT Asn	AAA Lis	TAC Tir 60	GAC Asp	GCT Ala	GCG Ala	GGA Gli	503

FIG. 1-1

TAC	TCT	GTA	GAT	AAT	GAA	AAC	CCG	CTC	TCT	GGA	AAA	GCT	GGA	GGC	GTG	551
Tir 65	Ser	Val	Asp	Asn	Glu 70	Asn	Pro	Leu	Ser	Gli 75	Lis	Ala	Gli	Gli	Val 80	
GTC	AAA	GTG	ACG	TAT	CCA	GGA	CTG	ACG	AAG	GTT	CTC	GCA	CTA	AAA	GTG	599
Val	Lis	Val	Thr	Tir 85	Pro	Gli	Leu	Thr	Lis 90	Val	Leu	Ala	Leu	Lis 95	Val	
GAT	AAT	GCC	GAA	ACT	ATT	AAG	AAA	GAG	TTA	GGT	TTA	AGT	CTC	ACT	GAA	647
Asp	Asn	Ala	Glu 100	Thr	Ile	Lis	Lis	Glu 105	Leu	Gli	Leu	Ser	Leu 110	Thr	Glu	
CCG	TTG	ATG	GAG	CAA	GTC	GGA	ACG	GAA	GAG	TTT	ATC	AAA	AGG	TTC	GGT	695
Pro	Leu	Met 115	Glu	Gln	Val	Gli	Thr 120	Glu	Glu	Phe	Ile	Lis 125	Arg	Phe	Gli	
GAT	GGT	GCT	TCG	CGT	GTA	GTG	CTC	AGC	CTT	CCC	TTC	GCT	GAG	GGG	AGT	743
Asp	Gli 130	Ala	Ser	Arg	Val	Val 135	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe 140	Ala	Glu	Gli	Ser	
TCT	AGC	GTT	GAA	TAT	ATT	AAT	AAC	TGG	GAA	CAG	GCG	AAA	GCG	TTA	AGC	791
Ser 145	Ser	Val	Glu	Tir	Ile 150	Asn	Asn	Trp	Glu	Gln 155	Ala	Lis	Ala	Leu	Ser 160	

FIG. 1-2

GTA	GAA	CTT	GAG	ATT	AAT	TTT	GAA	ACC	CGT	GGA	AAA	CGT	GGC	CAA	GAT	839
Val	Glu	Leu	Glu	Ile 165	Asn	Phe	Glu	Thr	Arg 170	Gli	Lis	Arg	Gli	Gln 175	Asp	
GCG	ATG	TAT	GAG	TAT	ATG	GCT	CAA	GCC	TGT	GCA	GGA	AAT	CGT	GTC	AGG	887
Ala	Met	Tir	Glu 180	Tir	Met	Ala	Gln	Ala 185	Cis	Ala	Gli	Asn	Arg 190	Val	Arg	
CGA	TCA	GTA	GGT	AGC	TCA	TGG	TCA	TGC	ATA	AAT	CTT	GAT	TGG	GAT	GTG	935
Arg	Ser	Val 195	Gli	Ser	Ser	Leu	Ser 200	Cis	Ile	Asn	Leu	Asp 205	Trp	Asp	Val	
ATA	AGG	GAT	AAA	ACT	AAG	ACA	AAG	ATA	GAG	TCT	TTG	AAA	GAG	CAT	GGC	983
Ile	Arg 210	Asp	Lis	Thr	Lis	Thr 215	Lis	Ile	Glu	Ser	Leu 220	Lis	Glu	His	Gli	
CCT	ATC	AAA	AAT	AAA	ATG	AGC	GAA	AGT	CCC	AAT	AAA	ACA	GTA	TCT	GAG	1031
Pro 225	Ile	Lis	Asn	Lis	Met 230	Ser	Glu	Ser	Pro	Asn 235	Lis	Thr	Val	Ser	Glu 240	
GAA	AAA	CGT	AAA	CAA	TAC	CTA	GAA	GAA	TTT	CAT	CAA	ACG	GCA	TTA	GAG	1079
Glu	Lis	Ala	Lis	Gln 245	Tir	Leu	Glu	Glu	Phe 250	His	Gln	Thr	Ala	Leu 255	Glu	
CAT	CCT	GAA	TTG	TCA	GAA	CTT	AAA	ACC	GTT	ACT	GGG	ACC	AAT	CCT	GTA	1127
His	Pro	Glu	Leu 260	Ser	Glu	Leu	Lis	Thr 265	Val	Thr	Gli	Thr	Asn 270	Pro	Val	
TTC	GCT	GGG	GCT	AAC	TAT	GCG	GCG	TGG	GCA	GTA	AC	GTT	GCG	CAA	GTT	1175
Phe	Ala	Gli 275	Ala	Asn	Tir	Ala	Ala 280	Trp	Ala	Val	Asn	Val 285	Ala	Gln	Val	

FIG. 1-3

ATC Ile	GAT Asp 290	AGC Ser	GAA Glu	ACA Thr	GCT Ala	GAT Asp 295	AAT Asn	TTG Leu	GAA Glu	AAG Lis	ACA Thr 300	ACT Thr	GCT Ala	GCT Ala	CTT Leu	1223
TCG Ser 305	ATA Ile	CTT Leu	CCT Pro	GGT Gli	ATC Ile 310	GGT Gli	AGC Ser	GTA Val	ATG Met	GGC Gli 315	ATT Ile	GCA Ala	GAC Asp	GGT Gli	GCC Ala 320	1271
GTT Val	CAC His	CAC His	AAT Asn	ACA Thr 325	GAA Glu	GAG Glu	ATA Ile	GTG Val	GCA Ala 330	CAA Gln	TCA Ser	ATA Ile	GCT Ala	TTA Leu 335	TCG Ser	1319
TCT Ser	TTA Leu	ATG Met	GTT Val 340	GCT Ala	CAA Gln	GCT Ala	ATT Ile	CCA Pro 345	TTG Leu	GTA Val	GGA Gli	GAG Glu	CTA Leu 350	GTT Val	GAT Asp	1367
ATT Ile	GGT Gli	TTC Phe 355	GCT Ala	GCA Ala	TAT Tir	AAT Asn	TTT Phe 360	GTA Val	GAG Glu	AGT Ser	ATT Ile	ATC Ile 365	AAT Asn	TTA Leu	TTT Phe	1415
CAA Gln	GTA Val 370	GTT Val	CAT His	AAT Asn	TCG Ser	TAT Tir 375	AAT Asn	CGT Arg	CCC Pro	GCG Ala	TAT Tir 380	TCT Ser	CCG Pro	GGG Gli	CAT His	1463
AAA Lis 385	ACG Thr	CAA Gln	CCA Pro	TTT Phe	CTT Leu 390	CAT His	GAC Asp	GGG Gli	TAT Tir	GCT Ala 395	GTC Val	AGT Ser	TGG Trp	AAC Asn	ACT Thr 400	1511
GTT Val	GAA Glu	GAT Asp	TCG Ser	ATA Ile 405	ATC Ile	CGA Arg	ACT Thr	GGT Gli	TTT Phe 410	CAA Gln	GGG Gli	GAG Glu	AGT Ser	GGG Gli 415	CAC His	1559

FIG. 1-4

GAC Asp	ATA Ile	AAA Lis	ATT Ile 420	ACT Thr	GCT Ala	GAA Glu	AAT Asn	ACC Thr 425	CCG Pro	CTT Leu	CCA Pro	ATC Ile	GCG Ala 430	GGT Gli	GTC Val	1607
CTA Leu	CTA Leu	CCG Pro 435	ACT Thr	ATT Ile	CCT Pro	GGA Gli	AAG Lis 440	CTG Leu	GAC Asp	GTT Val	AAT Asn	AAG Lis 445	TCC Ser	AAG Lis	ACT Thr	1655
CAT His	ATT Ile 450	TCC Ser	GTA Val	AAT Asn	GGT Gli	CGG Arg 455	AAA Lis	ATA Ile	AGG Arg	ATG Met	CGT Arg 460	TGC Cis	AGA Arg	GCT Ala	ATA Ile	1703
GAC Asp 465	GGT Gli	GAT Asp	GTA Val	ACT Thr	TTT Phe 470	TGT Cis	CGC Arg	CCT Pro	AAA Lis	TCT Ser 475	CCT Pro	GTT Val	TAT Tir	GTT Val	GGT Gli 480	1751
AAT Asn	GGT Gli	GTG Val	CAT His	GCG Ala 485	AAT Asn	CTT Leu	CAC His	GTG Val	GCA Ala 490	TTT Phe	CAC His	AGA Arg	AGC Ser	AGC Ser 495	TCG Ser	1799
GAG Glu	AAA Lis	ATT Ile	CAT His 500	TCT Ser	AAT Asn	GAA Glu	ATT Ile	TCG Ser 505	TCG Ser	GAT Asp	TCC Ser	ATA Ile	GGC Gli 510	GTT Val	CTT Leu	1847
GGG Gli	TAC Tir	CAG Gln 515	AAA Lis	ACA Thr	GTA Val	GAT Asp	CAC His 520	ACC Thr	AAG Lis	GTT Val	AAT Asn	TCT Ser 525	AAG Lis	CTA Leu	TCG Ser	1895
CTA Leu	TTT Phe 530	TTT Phe	GAA Glu	ATC Ile	AAA Lis	AGC Ser 535	TGAAAGGTAG			TGGGGTCGTG			TGCCGG			1942

FIG. 1-5

258

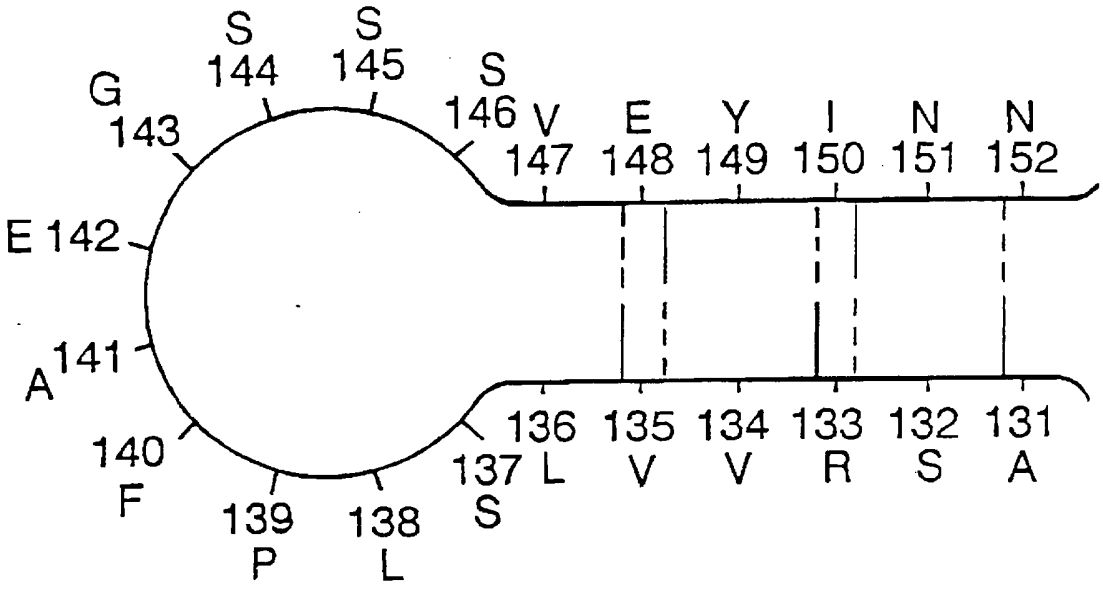

S 144
S 145
S 146
G 143
E 142
A 141
140 F
139 P
138 L
137 S
136 L
135 V
134 V
133 R
132 S
131 A
V 147
E 148
Y 149
I 150
N 151
N 152

FIG. 2