



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 91253 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)
C12N015/10 A C12N015/41 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.07.24	(73) <i>Títular(es):</i> BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH. POSTFACH 200 D-6507 INGELHEIM AM RHEIN DE
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.07.25 DE 3825189 1989.06.24 DE 3920753	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1990.02.08	(72) <i>Inventor(es):</i> WOLFGANG SOMMERGRUBER AT ERBST KUECHLER AT DIETER BLAAS AT TIMOTHY SKERN AT MAGISTER MARKUS DUECHLER AT
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 08/94 1994.08.17	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT
(54) <i>Epígrafe:</i> PROCESSO DE SÍNTESE IN VITRO DE UM ÁCIDO RIBONUCLEICO INFECCIOSO	
(57) <i>Resumo:</i>	

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 91 253

REQUERENTE: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, alemã, industrial e comercial, com sede em D-6507 Ingelheim am Rhein, República Federal Alemã.

EPÍGRAFE: " PROCESSO DE SÍNTESE "IN VITRO" DE UM ÁCIDO RIBONUCLEICO INFECCIOSO ".

INVENTORES: Magister Markus Duechler, Dr. Timothy Skern, Dr. Dieter Blaas, Dipl. Ing. Berthold Berger, Dr. Wolfgang Sommergruber e Prof. Dr. Ernst Kuechler.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

→

Alemã, em 25 de Julho de 1988 e em 24 de Junho de 1989, sob os n.ºs. P 38 25 189.2 e P 39 20 753.6, respectivamente.

Descrição referente à patente de invenção de BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, alemã, industrial e comercial, com sede em D-6507 Ingelheim am Rhein, República Federal Alemã, (inventores: Magister Markus Duechler, Dr. Timothy Skern, Dr. Dieter Blaas, Dipl. Ing. Berthold Berger, Dr. Wolfgang Sommergruber e Prof. Dr. Ernst Kuechler, residentes na Austria), para "PROCESSO DE SÍNTESE "IN VITRO" DE UM ÁCIDO RIBONUCLEICO INFECCIOSO".

DESCRIÇÃO

O objecto da presente invenção é uma síntese in vitro de um ARN infeccioso de HRV2, assim como o assim chamado clone de "tamanho completo" ("full size") de HRV2.

Os rinovírus humanos são os principais causadores de constizações (1). Não obstante existirem mais do que cem serotipos antigénicos diferentes todos eles ligam com o mesmo receptor (2), com excepção de dez serotipos. Os avanços mais recentes da investigação sobre os rinovírus, como a determinação da sequência de nucleótidos de quatro serotipos e a determinação da estrutura cristalina de HRV14, levaram, na verdade, à melhor compreensão da multiplicidade dos serotipos (3, 4, 5, 6, 7, 8), embora ainda não seja possível conseguir cons-

truir uma imunidade permanente ou pelo menos duradoira contra infecções provocadas por rinovírus.

Depois de realizada a infecção, manifesta-se na verdade a presença de anticorpos contra a estirpe que provoca a infecção, mas estes não garantem protecção contra outras estirpes de rinovírus. Uma vacinação profiláctica como a que é possível, por exemplo, no caso dos vírus da poliomielite ou da influenza é pelo menos parcialmente excluída.

Para desenvolver uma possibilidade de terapia activa contra infecções provocadas por rinovírus é indispensável, por consequência, analisar a história dos vírus que aparecem nas células.

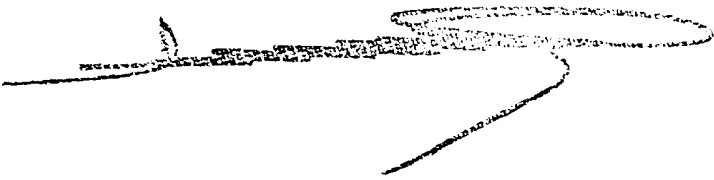
Para esse efeito, é uma condição prévia desenvolver um sistema de ensaio com o qual se possa investigar, por exemplo, alterações sobre a sua acção sobre a história dos vírus.

Um objectivo da presente invenção consiste em proporcionar um sistema de ensaio com o qual se podem investigar quaisquer mutações previstas que se produzam no plano do ADN.

De acordo com a presente invenção, este objectivo foi atingido mediante a síntese de uma cópia de cADN de HRV2 que possibilita transcrever ARN infeccioso in vitro. Com este cADN sintético é surpreendentemente possível imitar o comportamento dos vírus para HRV2 in vitro.

As acções de cada uma das mutações sobre o plano do ADN como, por exemplo, supressões, inserções e trocas de pares de bases podem investigar-se directamente e medir quantitativamente com ele.

Os conhecimentos que se podem obter com o auxilio deste sistema de ensaio, susceptíveis de generalizar mais cedo, por causa da maior homologia do HRV2 para os rinovírus até agora sequenciados do que com o clone de "tamanho completo" de HRV14 que se pode obter de acordo com Mizutani e col.. Não obstante, este clone que continha mais vinte e um nucleótidos do que o ADN "nativo" ele podia obter-se com o seu ARN infeccioso. Racaniello e col. puderam mostrar que uma cópia de cADN completo de poliovírus pode produzir vírus in-



fecciosos.

Até agora, ainda não foi descrito um clone de cADN de nenhuns rinovírus que pertencem ao assim chamado "grupo de receptor menor", a partir do qual se pudesse transcrever um ARN infeccioso.

No entanto, descreveram-se já clones de cADN de HRV2 (6) ainda que o comprimento médio de 0,5 kb não seja vantajoso para a construção de um cADN completo.

Para se atingir o objectivo de acordo com a presente invenção, procedeu-se, por conseguinte, como se descreve seguidamente:

A síntese da primeira cadeia de ARN de HRV2 (5 microgramas) realizou-se como se descreveu na literatura (10). Este cADN foi transformado em cadeia dupla com RNase H e ADN polimerase 1, em que se utilizaram reagentes de Amersham.

Utilizou-se T4 ADN polimerase para degradar as saliências. Depois de tratamento com EcoRI metilase, adicionaram-se ligadoras EcoRI e digeriu-se o cADN com EcoRI. Isolaram-se as moléculas mais compridas do que 4 kb com gel de agarose a 1% e ligou-se o sítio EcoRI do plasmídeo do escrito azul (Stratagene, San Diego, Califórnia, Estados Unidos da América).

Os recombinantes foram sequenciados para garantir que todas as regiões da sequência de HRV2 estivessem cobertas. As zonas que não estão recobertas são preparadas ou por síntese química ou por repetição das operações acima descritas. Em seguida, estes clones são reunidos para se obter uma molécula completa de cADN. Na extremidade 3' do cADN completo de HRV2 adiciona-se um promotor de ARN-polimerase apropriado para a transcrição, por exemplo, o promotor T7 ARN-polimerase ou o promotor SP6 ARN-polimerase.

No caso presente, obtiveram-se cADN recombinantes com um tamanho de até seis kb (Figura 1). Como, no entanto, nenhum dos clones continha a extremidade 5' completa, utilizou-se um clone que continha os nucleótidos 1 a 471 e já foi anteriormente descrito (p100, (6)) para recobrir esta região.

Clones 4 cADN

Utilizaram-se p100 (com o fragmento PstI maior para os nucleótidos 1 - 471), p19 (19 - 5101), p15 (2125 - 7102dA50) e p1 (5373 - 7102dA50) para construir uma molécula de cADN completa, que pudesse ser transcrita pela T7 ARN-polimerase. Utilizou-se a estratégia representada na Figura 1, para construir dois segmentos que correspondem às partes 5' e 3' da molécula. Para a parte 5', inseriu-se o fragmento BamHI/PstI com 0,6 kb do clone 100 no sítio SacI/PstI do plasmídeo Bluescripto. Este plasmídeo contém o promotor de T7 ARN-polimerase juntamente como o poliligador.

Utilizou-se um oligonucleótido de dupla cadeia sintético que continha os nucleótidos 1 a 9 de HRV2 e as extremidades salientes correctas para possibilitar a ligação nos sítios de SacI e BamHI. O sítio de Bluescripto SacI foi escolhido porque ele fica mais próximo do promotor de T7 ARN polimerase. O plasmídeo resultante foi designado como p100b e continha os nucleótidos 1 a 471. Foi aberto com HpaI no nucleótido 226 de HRV2. O fragmento de 4,9 kb HpaI/SmaI isolado do clone 19 foi inserido para se transformar no clone 119 (nucleótidos 1 a 5101).

Esta construção leva, na verdade, a uma outra inserção dos nucleótidos 226 a 471 da sequência de HRV2 entre os sítios de restrição Hpa^o/Sma^oI e AspI, ainda que seja de novo eliminado nas operações seguintes de clonagem (Figura 1).

Construiu-se um plasmídeo que contém a parte 3' procedendo como se descreve em seguida:

Ligaram-se os clones 1 e 15 um com o outro, para o que se substituiu o fragmento de 1,2 kb SpeI/SpeI do clone 1 (as sítios de SpeI estão no poli-ligador e na posição 6554 em HRV2) por intermédio do fragmento de 4,1 kb SpeI/SpeI do clone 15; obteve-se como resultado o clone 115 (nucleótidos 2435 a 7102dA50).

Não foi possível utilizar directamente o clone 15 porque o troço de polidA do sítio SacI estava próximo do poli-ligador. Por esse motivo, o cADN estava na orientação errada e não podia ligar-se, portanto, à metade 5'

do cADN.

Na síntese in vitro do ARN infeccioso é utilizável apenas um sítio de corte de restrição no plasmídeo depois do troço de polidA (neste caso, com um comprimento de aproximadamente cinquenta nucleótidos). Para este efeito o melhor é o Asp 718 I na extremidade de poli-ligador. A parte do poli-ligador que estava entre a sequência de polidA e o sítio de Asp 718 I foi, portanto, eliminada, com o que o plasmídeo 115 foi aberto com EcoRI e os nucleótidos salientes foram eliminados por digestão com "nuclease de feijão mungo". Por eliminação com Asp 718 I, foi separada a parte remanescente do poli-ligador; as extremidades salientes foram preenchidas com fragmento de Klenow da ADN polimerase I. As extremidades modificadas foram em seguida ligadas, obtendo-se o clone 115m; esta estratégia regenerou o sítio de Asp 718 I que fica agora vizinho do troço de polidA.

As duas metades do cADN de HRV2 foram em seguida reunidas através do sítio único de SphI; o fragmento com 1,2 kb SphI/Asp 718 I do clone 119 foi substituído pelo fragmento com 3,2 kb SphI/Asp 718 I do clone 115m; obteve-se o clone pHRV2.

Na transcrição deste plasmídeo, depois de linearização com Asp 718 I, obtém-se um ARN que compreende o genoma completo de HRV2. Além disso, na extremidade 5' encontram-se dezasseis nucleótidos adicionais (que correspondem à sequência do sítio de iniciação da T7 ARN polimerase até à primeira base do cADN) e, na extremidade 3', existem cinco nucleótidos adicionais do sítio Asp 718 I.

A transcrição com T7 ARN polimerase foi efectuada de acordo com métodos usuais (11). A mistura da transcrição foi utilizada directamente como solução de ARN sem qualquer tratamento posterior. A qualidade do ARN foi ensaiada num gel com 1,0% de agarose que contém 0,1% de SDS; normalmente, mais de 90% das moléculas de ARN eram moléculas de "comprimento completo".

A concentração de ARN foi determinada por manchamento de acordo com o método de Fleck and Begg (12). Os fosfatos de nucleósido foram eliminados por precipi

tação dupla em presença de acetato de amônio 800 mM, os ácidos nucleicos foram dissolvidos em água e o ARN foi hidrolisado com bases alcalinas. O ADN e as proteínas foram precipitados com ácido perclórico. Por meio da medição subsequente espectro_fotométrica da concentração dos nucleótidos, determinou-se a concentração inicial de ARN com base na hipótese de que 90% do ARN era constituído por moléculas de "comprimento completo".

Transfixaram-se células Hela (estirpe Ohio) com utilização do método de DEAE-dextrano (9), em que 300 microlitros da mistura de transfecção com ARN, transcritas por pHRV2 cortado com Asp 718 I, foram utilizadas por placa.

Depois de três dias, tingiram-se as células com vermelho-neutro ou violeta-de-cristal e verificou-se a presença de placas.

Surpreendentemente, não se observou nenhuma infecção. A razão possível para este efeito podia ser os nucleótidos adicionais, não obstante Mizutani e Colonna (9) terem obtido um ARN infeccioso de cADN com o comprimento de vinte e um nucleótidos de HRV14. Para garantir as actividades que são provocadas pela presença dos nucleótidos adicionais na extremidade 5', desenvolveu-se uma estratégia alternativa que reduziu a sequência adicional a apenas dois radicais G. É impossível a eliminação completa porque a T7 ARN polimerase necessita de dois radicais G nas posições +1 e +2.

Van der Werf e col. puderam mostrar que um sítio de StuI exactamente no sítio de iniciação da transcrição da T7 polimerase pode ser introduzida por uma "mutagénese dirigida para o sítio", na qual a sequência AGGGCG (a transcrição começa com o primeiro G) é alterada em AGGCCT, em que os dois grupos G essenciais para a transcrição com a T7 ARN polimerase permanecem não removidos. A enzima de restrição StuI corta depois no segundo G e origina extremidades lisas; portanto, o transcrito de ARN de um fragmento que foi clonado por este sítio contém apenas dois grupos G adicionais.

Com utilização de um "estojo de mutagénese dirigida para oligonucleótidos" da Amersham, foi inserido, portanto, um sítio de StuI no plasmídeo p100b, em que se utilizou a possibilidade de produzir ADN de uma cadeia a par-

todas as mutações que se podem produzir no plano do ADN. Para a investigação dos sítios de ligação do receptor, trocaram-se aminoácidos nas proteínas da membrana do vírus de HRV2 que obedecem aos seguintes critérios:

- a) Na superfície do virião ou no "canyon", devem existir radicais AS com uma inserção de cerca de um eixo de simetria quádruplo; isto pode determinar-se por comparação com a estrutura cristalina de HRV14 (5, 13).
- b) Os radicais AS apropriados devem ser conservados dentro de um grupo receptor, o que pode ser garantido por comparação das sequências com outros serotipos (8).
- c) Os radicais AS encontrados de acordo com (b) podem ser específicos então apenas para um grupo receptor, se no respectivo outro grupo receptor se encontrarem radicais AS nos correspondentes sítios da sequência (comparação da sequência com componentes do "grupo receptor mais importante" 4, 3, 7).


O objectivo da presente invenção é proporcionar a preparação de um mutante, no qual um grupo de ARG (AS nº 180) em VP3 de HRV2 é trocado por um radical Thr. Para isso, procede-se como se descreve em seguida:

Para se obter um plasmídeo apropriado para mutagénese in vitro, subclonou-se um fragmento com o tamanho de 0,4 kb do cADN de "tamanho completo" (Figura 4). O fragmento abrange a região do sítio de corte com HindIII (nucleótido nº 1982) até ao sítio de PstI (nº 2422) e foi inserido nos sítios de PstI/HindIII do plasmídeo Bluescript (Stratagene, San Diego, California, Estados Unidos da América).

Correspondentemente às indicações dos estrategénios, produziu-se ADN de cadeia única do plasmídeo por meio de um fago auxiliar necessário à mutagénese e purificou-se. A mutagénese realizou-se por meio de um oligonucleótido (vinte e seis nucleótidos) sintéticos de uma única cadeia, com uma sequência diferente da do tipo nativo no sítio desejado. A sequência do oligonucleótido é a seguinte:

5' - CCCAGATGTAGATGTACCTGGTGATG -3'

Com o auxílio do estojo de "mutagénese in vitro" da firma Amersham, preparou-se o mutante preten-



dido procedendo de acordo com as indicações do fabricante e en saiou-se por sequenciamento do ADN de acordo com os métodos usuais (14, 15). Como a existência de outros sítios de PstI e HindIII no plasmídeo pHRV2/1 tornava impossível que se reclo- nasse o fragmento de PstI-Hind III que mantém a mutação direc- tamente no clone de "tamanho completo", ele foi primeiramente ligado num outro subclone de pHRV2/1, que contém a sequência do sítio de EcoRI (número 743) até ao sítio de ApaI (número 3458) no vector de bluescript, por intermédio dos sítios de corte PstI/HindIII (Figura 4).

O plasmídeo resultante foi digerido com EcoRI e ApaI; o fragmento com 2,7 kb de comprimento foi utilizado para substituir a correspondente sequência em pHRV2/1, pelo que se obteve pHRV2/mRT. A transcrição e a transfecção realizaram-se como se descreveu para pHRV2.

A partir de algumas placas, foram re tirados vírus e com eles infectadas monocamadas de células He- la, em que se formaram em três dias $2 \times 10^7 - 2 \times 10^8$ pfu/ml de meio. Os vírus assim obtidos foram ainda multiplicados vá- rias vezes em monocamada de células Hela e purificadas por três operações de centrifugação (dez minutos a $500 \times g$; trinta minutos a 20.000 rpm, SW40; sessenta minutos a 45 000 rpm, ro- tor SW-50) e peletizados.

Os vírus ressuspensos em tampão de fosfato fisiológico (PBS : 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8,1 mM de KH_2PO_4 , 1,5 mM de Na_2HPO_4 ; pH 7,3) foram utilizados para a preparação de partículas de vírus marcadas com ^{35}S (16). A análise em gel de poliacrilamida desnaturado (Figura 5) não apresentou diferenças nas larguras das deslocações das proteí- nas individuais das membranas dos vírus em comparação com o ti- po nativo.

Para poder garantir possíveis altera- ções do comportamento de ligação dos mutantes de vírus nas cé- lulas hospedeiras, realizaram-se ensaios de ligação como foi descrito por G. Abraham e R. J. Colonno (16); a duração da in- cubação foi de dezasseis horas para a pré-incubação com vírus frio ou de quatro horas para a incubação com vírus marcado com ^{35}S . Como vírus frio, utilizou-se HRV89 e HRV2; compararam-se

vírus HRV2 marcados com ^{35}S nativos e mutantes (figura 6). Não se conseguiu detectar comportamento de ligação significativamente diferente dos mutantes do vírus em relação ao tipo nativo (Figura 6).

A partir de cerca de 1×10^8 de partículas de vírus purificados dos mutantes, isolou-se o ARN por extração com fenol (17) e transcreveu-se a região que se mantém na mutação em cADN. Para isso, utilizou-se para a síntese da primeira cadeia um oligonucleótido sintético com a sequência

5' -CTTCTAATTTGAGCCATTTCTTG -3'

e para a síntese da segunda cadeia o oligonucleótido com a sequência

5' - TCTATTCCAGGTGAGGTT -3'

Digeriu-se o cADN de cadeia dupla com PstI e HindIII e ligou-se no vector de bluescript. Sequenciaram-se os plasmídios assim obtidos. Desta maneira, foi possível garantir que os mutantes do vírus mantinham, de facto, a alteração da sequência pretendida.

Desta forma, podem determinar-se os aminoácidos e as regiões do virião que são essenciais para a ligação do receptor.

Com base na grande homologia existente do HRV2 em relação aos outros rinovírus até agora sequenciados como HRV14 é de se esperar que estes resultados possam ter utilização com elevada segurança também em rinovírus que pertencem ao assim chamado "grupo do maior receptor".

A presente invenção proporciona assim plasmídios que contêm os cADN completos para HRV2 ou por mutagenese específica os análogos que se obtêm sob o controlo do promotor de ARN polimerase.

São também objecto da presente invenção os sistemas que contêm um cADN completo para HRV2 sob o controlo de um promotor de ARN polimerase em que os codões codificam os aminoácidos que ficam na superfície do virião ou no "canyon", são trocados por codões para outros aminoácidos, especialmente por codões para aminoácidos que influenciam o com-

portamento da ligação em relação ao receptor.

Os plasmídios preferidos contêm, antes do primeiro par de bases do cADN, apenas os nucleótidos que são necessários para a iniciação da transcrição. No caso da utilização de T7 ARN polimerase, são, por exemplo, as duas guaninas essenciais.

É vantajoso prever nestes plasmídios um sítio de restrição que aparece apenas uma vez em ligação na extremidade 3' do cADN.

É também, evidentemente, objecto da presente invenção o ARN que se obtém a partir destes plasmídios por transcrição.

Os plasmídios de acordo com a presente invenção podem utilizar-se, por exemplo, para a preparação de polipéptidos virais, em que se transformam sistemas apropriados de hospedeiro com estes plasmídios. Estes polipéptidos virais podem então ser utilizados para tratamento terapêutico, por exemplo, para estimulação do sistema imune ou para a ligação e/ou bloqueio dos receptores celulares para os rinovírus.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1

Representação esquemática da construção da cópia de cADN completa de HRV2, que se encontra sob o controlo de um promotor de T7 ARN polimerase. Os fragmentos que foram ligados em cada secção são representados por linhas grossas. Os números por cima dos sítios de restrição referem-se à sua posição na carta de HRV2, com excepção daqueles por cima dos sítios de SacI e Asp7181, que representam as extremidades de cada clone de cADN. Indicam-se os seguintes sítios de restrição : A, Asp7181; B, BamHI; H, HpaI, P, PstI; R, EcoRI, S, SacI ; Se, SpeI; Sh, SphI; Sm, SmaI. Todos os sítios de Asp7181 e SacI e os respectivos sítios de restrição que são marcados com um ponto, derivam de poli-ligadores do vector. O promotor de T7 ARN polimerase é marcado por uma seta.

Figura 2

Mapa de restrição do genoma de HRV2.

Figura 3

Sequência do genoma de HRV2 clonado e sequência de aminoácidos dele derivada.

Figura 4

Representação esquemática da subclonação de um fragmento apropriado para a mutagênese, assim como a sua reclonação no clone de "tamanho completo" de HRV2 depois de mutagênese. O sítio mutado é designado com "x".

Figura 5

Auto-radiograma de uma electroforese em gel. Separação das proteínas da membrana de vírus de diferentes fracções de gradientes numa preparação de partículas de vírus marcadas com ³⁵S dos mutantes em comparação com o tipo nativo.


Figura 6

Ensaio de ligação dos mutantes de HRV2. Monocamadas de células HeLa foram pré-incubadas com concentrações crescentes de HRV2 frio (a) ou de HRV89 (b). Em seguida, determinou-se a quantidade das partículas de vírus marcadas com ³⁵S do tipo nativo e dos mutantes que ainda não podem ser ligados.

BIBLIOGRAFIA

1. E. Stott, J., e R.A. Killington, Ann.Rev.Microbiol., 26, 503-525 (1972).
2. R. J. Colonno, P.L. Callahan, e W.J. Long, J. Virol. 57, 7-12 (1986).
3. G. Stanway, P.J. Hughes, R.C. Moutford, Ph.D. Mihor, e J. W. Almond, Nucl. Acids Res., 12, 7859-7875 (1984).
4. P.L. Callahan, S. Mizutani, e R.J. Colonno, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 732-736 (1985).
5. M.G. Rossmann, E. Arnold, J.W. Erickson, E.A. Frankenberger, J. P. Griffith, H-J. Hecht, J.E. Johnson, G. Kamer, M. Luo,

- A.G. Mosser, R.R. Rueckert, B.A. Sherry, e G. Vriend, Nature, 317, 145-154 (1985).
6. T. Skern, W. Sommergruber, D. Blaas, P. Gruendler, F. Frauentorfer, C. Pieler, I. Fogy e E. Kuechler, Nucl. Acids Res., 13, 2111-2126 (1985).
7. M. Duechler, T. Skern, W. Sommergruber, Ch. Neubauer, P. Gruendler, I. Fogy, D. Blaas, e E. Kuechler, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 2605-2609 (1987).
8. P.J. Hughes, C. North, C.H. Jellis, P.D. Minor e G. Stanway, J. Gen. Virol. 89, 49-58 (1988).
9. S. Mizutani e R.J. Colonno, J. Virol. 56, 628-632 (1985).
10. T. Skern, W. Sommergruber, D. Blaas, C. Pieler e E. Kuechler, Virology, 136, 125-132 (1984).
11. S. Van der Werf, J. Bradley, E. Wimmer, W. Studier e J. Dunn, J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 2330-2334 (1986).
12. A. Fleck e D. Begg, Biochim. Biophys. Acta, 108, 333 - 339 (1965).
13. D. Blaas, E. Kuechler, G. Vriend, E. Arnold, M. Luo e M.G. Rossmann, Proteins: Structure, Function and Genetics 2: 263-272 (1987).
14. A. Maxam, e W. Gilbert, Methods in Enzymology, Academic Press, New York 65: 499 - 560 (1980).
15. E.Y. Chen, e P.H. Seeburg, DNA 4: 165 - 179 (1985).
16. G. Abraham e R.J. Colonno, J. Virol. 44, 311-322 (1979).
17. Y.F. Lee, N. Kitamura, A. Nomoto, e E.J. Wimmer, Gen. Virol. 44, 311-322 (1979).
18. V.R. Racaniello, D. Baltimore, Science 214, 916-919 (1981).
- •
•



REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para obtenção de um plasmí-
dio, caracterizado pelo facto de ele conter cADN completo para
HRV 2 ou os seus análogos que se podem obter por mutagenese es-
pecífica sob o controlo de um promotor de ARN polimerase.

- 2ª -

Processo para obtenção de um plasmí-
dio, caracterizado pelo facto de conter cADN completo para
HV2 sob o controlo de um promotor de ARN polimerase, em que os
codões que codificam para aminoácidos que ficam na superfície
do virião ou no "canyon" são permutados por codões para outros
aminoácidos, em especial por codões para aminoácidos que in-
fluenciam o comportamento de ligação em relação ao receptor.

- 3ª -

Processo para a obtenção de plasmí-
dio de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fac-
to de a ARN polimerase ser a T7 ARN polimerase.

- 4ª -

Processo para a obtenção de um plas-
mí-
dio de acordo com as reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizado
pelo facto de antes do primeiro par de bases do cADN só estar
presente um número de nucleótidos que é necessário para a ini-
ciação da transcrição.

- 5ª -

Processo para a preparação de um plasmídeo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de antes do primeiro par de base de cADN só estarem presentes as duas guaninas essenciais para a T7 ARN-polimerase.

- 6ª -

Processo para a obtenção de um plasmídeo, de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de possuir adicionalmente um sítio de restrição que aparece apenas uma vez na união na extremidade 3' do cADN.

- 7ª -

Processo para a obtenção de um plasmídeo, caracterizado pelo facto de ser pHRV2/1.

- 8ª -

Processo para a preparação de ANR, caracterizado pelo facto de se realizar a transcrição por um dos plasmídios de acordo com as reivindicações 1 a 6.

A Requerente reivindica as prioridades dos pedidos alemães apresentados em 25 de Julho de 1988 e em 24 de Junho de 1989, sob os n.ºs. P 38 25 109.2 e P. 39 20 753.6, respectivamente.

Lisboa, 24 de Julho de 1989
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

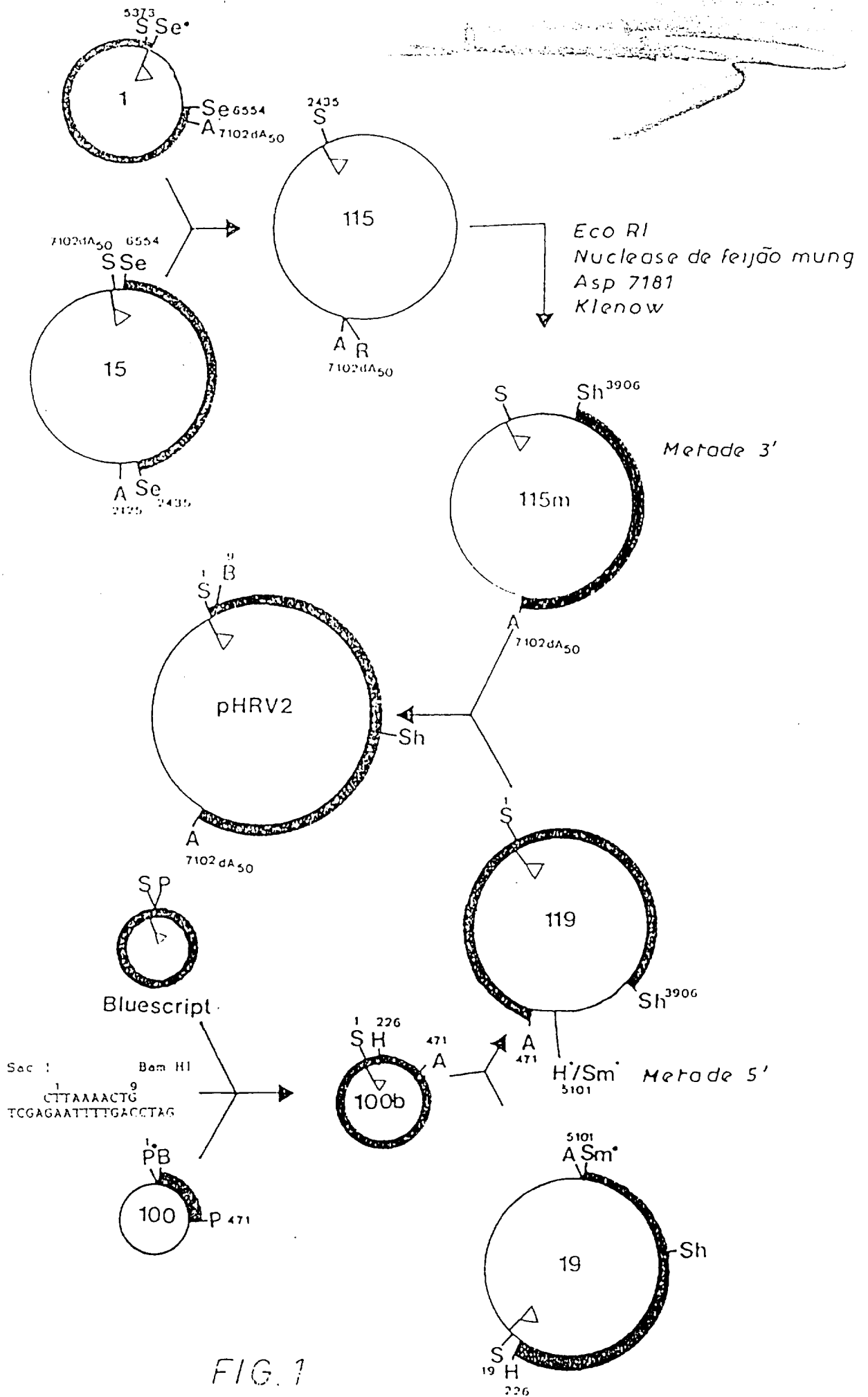




RESUMO

"PROCESSO DE SÍNTESE "IN VITRO" DE
UM ÁCIDO RIBONUCLEICO INFECCIOSO"

A invenção refere-se a um processo para obtenção de um plasmídeo, que contem cADN completo para HRV 2 ou os seus análogos que se podem obter por mutagenese específica sob o controlo de um promotor de ARN polimerase.



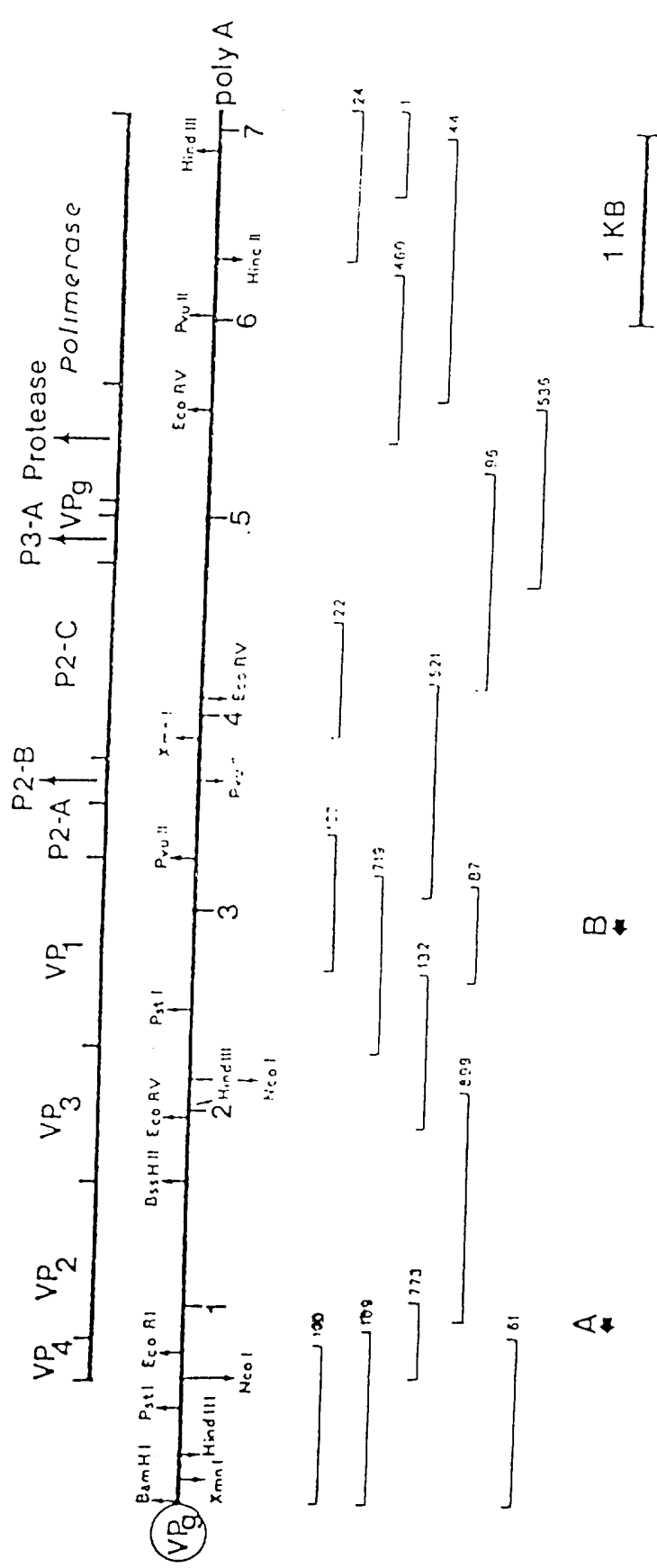


FIG. 2

T T A A A C T G G A T C C A G G T T G T T C C C A C C T G G A T T T C C C A C A G G G A G T G G T A C T C T G T T A T T A C G G T A C T T T G T A C C C A G T T T T A T C T C C C T T C C C C C A
 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

T G T A A C T T A G A A G T T T T T C A C A A G A C C A T A G C C G G T A A T C A G C C A G A T A C T G A M G G T C A M G C A C T T C T G T T C C C C G G T C A A T G T T G A T A T G C T C C A
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

A C A G G G C A A A A C A A C T G C G A T C G T T A A C C G C A A M G C C C T A C G C A M G C T T A G T A G C A T C T T T G A A T C G T T T G G C T G G T C G A T C C G C C A T T T C C C C T G
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

G T A G A C C T G G C A G A T A G G G T A G A A T A C C C C A C T G G C G A C A G T G T T C T A G C C T G C G T G G C T G C C A C C C T A T G G G T G T A G C C A A C A T G G A C
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

A A G G T G T G A A G A G C C C C G T G T G C T C G C T T T G A G T C T C C G G C C C C T G A A T G T G G C T A M C C T T A C C C T G C A G T A G A G C A G T A A C C C A A T G T G T A T C T A
 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

G T C G T A A T G A C C A M T T G C G G A T G G G A C C A M C T A C T T T G G G T G T C C G T G T T C A C T T T T C C T T T A T A T T T G C T T A T G G T G A C A A T A T A C A A T A T A T A
 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

M G A Q V S R Q N V G T H S T Q N S V S N G S S L N Y F H I
 T A T T G S C A C C A T G G G T G C A C A G G T T T C A G A C A A A T G T T G G A C T C A C T C C A C C G C A A A C T C T G T A T C A A T G G G T C T A G T T A A A T T A T T T A A C A T C
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700

N Y F K D A A S N G A S K L E F T Q D P S K F T D P V K D V L E K
 A T T A T T T C A A G A T G C T T C A A T G G T G C A T C A A A C T G G A T T C A C A A A G A T C C T A G T A A T T T A C T G A C C C A G T A A G G A T G T T T G G A A A G G
 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800

E I P T L Q S P T V E A C G Y S D R I I Q I T R G D S T I T S Q D V
 G A T A C C A C A C T A C A G T C C C C C A C A G T G G A G G C T T G T G C A T A C T C T G A T A G G A T T A T A C A G A T T A C C A G A G A G A T T C A C C A T A A C C T C A C A G A T G T
 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900

A N A I V A Y G V W P H Y L S S K D A S A I D K P S Q P D T S S N
 G C T A T G C T A T E G T T G C G T A T G S T G T T G G C C A C A T A T C T A T C C T C C A G G A T G C C T C T G C A M T T G A T A A C C C T C T C A C C A G A T A C A T C T T C A A T
 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000

R I Y I L R S V T W S S S S K G W W W K L P D A L K D M G I I G I
 A G A T T T A T A C T C T A A G G A G T G T G A C C T G G A G C A G T T C C T C A A G G G T T G G T G G G A A C T A C C I G A T G C A C T C A M G G A C A T G G G T A T T T T G G T G A A
 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100

K M F Y H Y L G R S G Y T I H V Q C H A S K F H Q G T L I V A L I P
 A C A T G T T T A T C A T T A C C T G G G T A G G A G T G G A T A C A C A A T A C A T G T G C A G T G T A A T G C T A G T A A A T T C A C C A G G G T A C A C T A A T T G T G C T G T A T C C
 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

E H Q I A S A L H G N V N V S Y N Y T H P G E T G R E V K A E T R
 T G A G C A T C A G A T T G C A A G T G C C T T A C A T G G C A A T G T G A A T G T T G G T T A C A A C T A C A C A C C C A G G T G A A C A G G C A G G A A G T T A A G C T G A G A C C A G A
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300

L N P D L Q P T E E Y W L N F D G T L L G H I T I F P H Q F I N L
 T T G A T C C T G A T C T A C A C C T A C T G A A G A G T A T T G G C T A A C T T T G A T G G G A C A C T C C T T G G A A T A T T A C C A T A T T C C C T C A T C A A T T T A T C A A C T T G A
 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400

FIG. 3a

BAD ORIGINAL

R S N N S A T I I A P Y V N A V P M D S H R S H N N W S L V I I P I
 GGAGTAAATATTCTGCCACAAATATTGCCCTTATGTCMAATGCAGTTCCTATGGATTCAATGCCGAGCCACAAATATTGGAGTITGGTAAATATACCAAT
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500

C P L E T S S A I N T I P I T I S I S P M C A E F S G A R A K R Q
 ATGTCCCTTGAGACATCAAGTGCATTAAACACAATACCTATTACAATATCTATAAGCCCATGTGTGCAGAGITTCGGGCGCGGTGCCMAGCGTCMA
 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600

↓ VP3
 G L P V F I T P G S G Q F L T T D D F Q S P C A I P H Y H P I K E
 CGATTACCAAGTITTCATCACACCAGGTTCCAGGACAGTTTTTGACACAGATGATTCMAATCCCATGTGCACITCCCTCGTATCACCCACTMAGGAA
 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700

I S I P G E V K N L V E I C Q V D S L V P I H N T D T Y I N S E H M
 ITTCTATCCAGGTGAGGTAAAAATTGGTTGAATTGTCAAGTAGACAGCCTAGTACCAATATAACACTGACACCTACATCAATAGTGAATAI
 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800

Y S V V L Q S S I N A P D K I F S I R T D V A S Q P L A T T L I G
 GTATTCTGTGTATGCAATCATCAATTAATGCACCAGATAAGATCTTCTATTCGAACAGATGTTGCTCCCACTTATAGCTACTACTTTCATTGGT
 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900

E I S S Y F T H W T G S L R F S F H F C G T A N T T V K L L L A Y
 GAGATATCTAGCTATTCACCCACITGGACAGGGAGTCTCCGTTTCAGCTTCATGTTTGTGGTACTGCCAACACTACTGTTAAGCTITITGTTGGCATACA
 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000

T P F G I A E P T T R K D A M L G T H V I W D V G L Q S T I S H V V
 CACCACCTGGIATCGCAGAACCCACCAACAGMAGGATGCAATGCTAGGCCACTCATGTTATATGGGATGTGGGGTTCGAGTCTACATAIACAATGGTAGT
 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100

P W I S A S H Y R N T S P G R S T S G Y I T C W Y Q T R L V I P P
 GCCATGGATTAGCGGTAGTCATTATAGAAACACATCACCAGGTAGATCTACATCTGGGTACATAACATGCTGGTATCAGACTAGATTAGTCATTCCACCT
 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200

Q I P P T A R L L C F V S G C K D F C L R M A R D T N L H L Q S G
 CAGACCCCAACACAGTATGTTATGTTTTGTATCTGGGTGCMAAGACTTTTGCTTGGCATGCGCAGGATACTAACCTACACCTGCMAAGTGGTG
 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300

↓ VP1
 A I A Q N P V E N Y I D E V L N E V L V V P N I N S S H P T T S H S
 CAATAGCACAGAACCCCTGTTGAGCAATTATAGATGAAGTTCITTAATGAAGTTTATGTTGTCCCAATATTAATAGTAGTAACCCCAACACATCAATTC
 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400

A P A L D A A E T G H T S S V Q P E D V I E T R Y V Q I S Q I R D
 TGCCCAAGCATTAGATGCTGCAGAAACAGGGCACACTAGTAGTGTCAACCAGAGGATGTCATTEGAACCTAGGTATGTGCAGACATCAACAAACAGGAT
 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500

E M S L E S F L G R S G C I H E S K L E V T L A N Y N K E N F T V
 GAAATGAGTTTAGAGTTTTCTTGGCAGATCAGGATGCATCATGATCTAATTAAGGTTACACTTGCMAATTATAACAGGAGAAATTTACAGTGT
 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600

W A I N L Q E M A Q I R R K F E L F T Y T R F D S E I I L V P C I S
 GGGCTATTATCTACAGAAATGGCTCAATTAGAGGMAATTTGAATTTGTTCACTATACTAGGTTTGATTCGAAATACCCCTAGTTCATGCATTTC
 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700

A L S Q D I G H I T M Q Y H Y V P P G A P V P N S R D D Y A W Q S
 CGCCCTTACTCAGGACATTEGACACATCAAAATGCAATACATGTATGTTCCACCAGGTGCACCGGTGCCCAATAGTAGGGACGATTATGCATGGCAGTCT
 2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800

G T N A S V F W Q H G Q A Y P R F S L P F L S V A S A Y Y M F Y D
 GGCACAAATGCCTCTGTTTTCTGGCAACATGGACAGGCTTATCCAAGATTTTCTTACCTTCCAAAGTGTGGCATCTGCTTATTACATGTTTTATGATG
 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900

FIG. 3b

BAD ORIGINAL

G D D M T L F C Q M V S S V T F I P P M A D L P D K G K A F D S R F
 GGGATGACATGACACTGTTCTGCCAATGGTTCCTAGTGTACATTTATACCACCAATGGCTGATCTACCAGATAMGGCAAGGCTTTTGATTCTAGGTT
 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500

V L C S T N H S L L T P P T I T S L P A M N R R R F F L D L D I I V
 TGTATTATGCAGCACAAATCAITCCCTTCTAACCCCGCAATACCTTCACCTACCTGCAATGAATAGAGATTTTCTCAGATTAGATATAATAGTA
 4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600

H D N F K D P Q G K L N V A A A F R P C D V D N R I G N A R C C P
 CATGATAACTTCAGATCCACAGGGCAACCTAATGTGGCAGCAGCGTTTEGACCATGTGATGTAGATAATAGAATAGGAAATGCAGTGTGTGTCCAT
 4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700

F V C G K A V S F K D R N S C N K Y S L A Q V Y R I M I F F D R R R
 TTGTGTGTGAAAGCAGTTTCTTTCAGAGATCGTACCTTCCTGCACAAATACAGCCCTTGGCAGGGTGTACACATAATGATGAGAGACAGACGGAG
 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800

R Q V V D V M T A I F Q G P I D M K N P P P P A I T D L L Q S V R
 MAGACAGTGGTGTGATGTCATGACAGCTATATCCAGGGCCATTGATATGAAACCCACCACCCTGCTATTACTGACTTGTCCAGTCTGTAGTA
 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900

T P E V I X Y C E G N R W I I P A F C K I E K E L N L A N T I I T
 ACCCTGAGTATATMGATTTGTGAGGGTATATAGATGGATATTCACACAAATGCMGATAGAAAGGAGTTGAACTTGGCTAACACATCATATACAA
 4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000

I I A N V I G M A R I I Y V I Y K L F C T L Q G P Y S G E P K P K T
 TCATTGCMAATGTTATTGSTATGGCGAATATATATGTTATTTACAACTTTTTCACATTACAGGGACCATATTCAGGAGAACCCAGCCCAAGAC
 5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100

K I P E R R V V T Q G P E F E F G H S L I K H N S C V I T T E N G
 TAAATCCCAAGAGCGGTGTAGTACACAGGGCCACAGAGGAAATTTGGGATGTCITTTATTAACATACCTCATGTGTATTAACACAGAAATGGG
 5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200

K F T G L G V Y G R F V V V P T H A D P G K E I Q V D G I T T K V
 AAATCACAGGTCITGGAGTATACGACAGATTTGTGGTCGTACCAACATGCAGATCCTGGAAAGCAATTCAGGTGTGATGATACTACAAAGTCA
 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300

I D S Y D L Y N K N G I K L C I T V L K L D R H E E F R D I R R Y I
 TTGACTCATATGACCTATACACAAAGATGGGATAGACIAGAAATACAGTACTTAAATTAGATAGAAATGAAATTTAGAGATATCAGGAGATATAT
 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400

F N N E D D Y P N C H L A L L A N Q P E P T I I N V G D V V S Y G
 ACCTAACCAATGAGATGATTACCCCAATTCGAATAGCACTGCTAGCAACCAAGCCTGAACCACTATAATCAATGTTGGAGATGTTGTATCCTATGGC
 5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500

N I L L S G N Q T A R M L K Y S Y P T K S G Y C G G V L Y K I G Q
 AATATACTGCTCAGTGGCAACCAACGGCTAGAAATGCTAATAACAGTACCCACTAAATCTGGTACTGTGAGGTGTCTTATACAAATTTGGGCAAG
 5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600

V L G I H V G G N G R D G F S A M L L R S Y F T D V Q G Q I T L S K
 TGETTGAATACATGTTGGGGCAATGGTAGGGATGGTTCTCAGCTATGTTACTCAGATCCTATTTCACTGATGTTCAAGGGCCMAATACGTTATCAA
 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690 5700

K I S E C N L P S I H T P C K I K L Q P S V F Y D V F P G S K E P
 GAAGACCAGTGAATGTAACCTAACCCAGTATACACACCCCAATGCAACCAATTCAGCCTAGTGTTTTCTATGATGATTCCTCGTTCAAAAGAACCA
 5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800

A V L S E K D A R L Q V D F N E A L F S K Y K G N T D C S I N G H
 GCTGTGTTGTCTGAAAGATGCCCGGTACAAATGATTTCAATGAAGCACTATTTCTAATAACAAAGGGAAACAGATTGCTCCATTAATGACCACA
 5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890 5900

FIG. 3d

BAD ORIGINAL



I R T A S S H Y A A Q L I T L D I O P K P I T I F D S V F G I D G L
 T A G A A T T G C A T C A C A I T A T G C A G C A C A C T C A T T A C C T T A G A T A T T G A C C C A A C C T A T T A C A C T T G A G G A C A G T G T C T T T G G C A C T G A T G G A T T
 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000

E A L D L H T S A G F P Y J A H G V K K R D L I N N K T K D I S K
 A G A G G C T C T T G A T T T G A A C A C T A G C C A G G A T T C C A T A T A T T G C A A T G G G A G T T A A A G A G A G A T T A A T A A A C A C A G A C C A G G S A T A T A G C A A
 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100

L K E A I D K Y G V D L P K V I I L F D L L R K H L K V I K G K I
 C T T A A A G A G C A T T G A C A A T A C G G A G T T G A C T T A C C T A T G G T C A C C T T C T T G A A G A T G A C T C A G A A G C A T G A A A G G T A T T A A A G G T A A A C T A
 6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200

R V I E A S S V N D T L L F R T T F G H L F S K F H L N P G I V T G
 G A G T T A T T G A G C T A G T A G T G A T G A T A C C C T A T T A T T A G A C A A C T T T T G G C A C C T C T T T C A A G T T C C A C T T G A T C C I G A T T G I T A C T G G
 6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290 6300

S A V G C D P E V F W S K I P A M L D D K C I H A F D Y I N Y D G
 A T C A G C A G I T G A T G T C C A G A G G T G T T T G G T C A A A T A C C A G C A T G T T G G A T G A T A A T G T A T T A T G G C T T T G A T T A T A C A A T T A T G A T G G I
 6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400

S I H P I H F C A L K Q V L V D L S F N P T L I O R L C K S K H I
 A G I A T A C A C C C T A T T G G T T T G A G C T C T T A A C A G G T A C T G G T A G A T C A T C A T T A T C C A C A T T A T A G A T A G A C T A T G C A A G I C T A A C A C A T C I
 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490 6500

F K N I Y Y E V E G G V P S G C S G T S I F N I K I N N I I I R T L
 T C A A A T A C A T A C T A T G A G T G G A G G C A G G T G T A C C A T C T G G G T G T C A G G T A C T A G T A T T T T A C A C T A T G A T C A T A T A T T A T C A T A G G A C C T I
 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600

V L D A Y K N I D L D K L K I I A Y G D D V I F S Y I H E I D H E
 A G T G T A G A T G C A T A C A G A T A T A G A T C T A G A T A G C T T A A G A T A A T T G C C I A T G G T G A T G A T G C A T T T C I C A T A C A T A C A T G A C T G G A C A T G C A G
 6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700

A I A I E G V K Y G I T I T P A D K S N I F V K L D Y S N V T I I
 G L T A T A C A T A G A G A T G T T A A T A T G G T T T C A C I A T A C T C C T G C I G A T A A C I A C A C A T T T G T A A A T A G A C I A T A C A T G T T A C T I I I I I A
 6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800

X R G F K Q D E K Y N F L I H P T F P E D E I F E S I R W T K K P S
 A A A G G S T T T A G C A A G A T G A G A G T A A C T T T C A T A C A T C C A C T T T C C C T G A G A T G A T A T T T G A T C C A T C A G A T G A C A C A A G A C C A T C
 6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890 6900

Q M H E H V L S L C H L M W H W G R D A Y K K F V E K I R S V S A
 A C A A T G C A T G A C A T G T G T G T C T G T G T C A C T T A A T G T G G C A C A A T G C A C G T A C C G C A T A C A A A A T T T G T G A G A G A T A C G C A G T G A A G C G C I
 6910 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990 7000

G R A L Y I P P Y D L L L H E W Y E K F
 G G T C G T G C A C T G A C A T C C C T C C G T A T G A T T T G C T T T T G C A T G A T G G T A T G A A A T T T T A A G A T A T A G A A T A G T A A A C T G A T A G T T T A T T A G T T T
 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090 7100

AT poly(A)
 7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200

FIG. 3e

RAD ORIGINAL

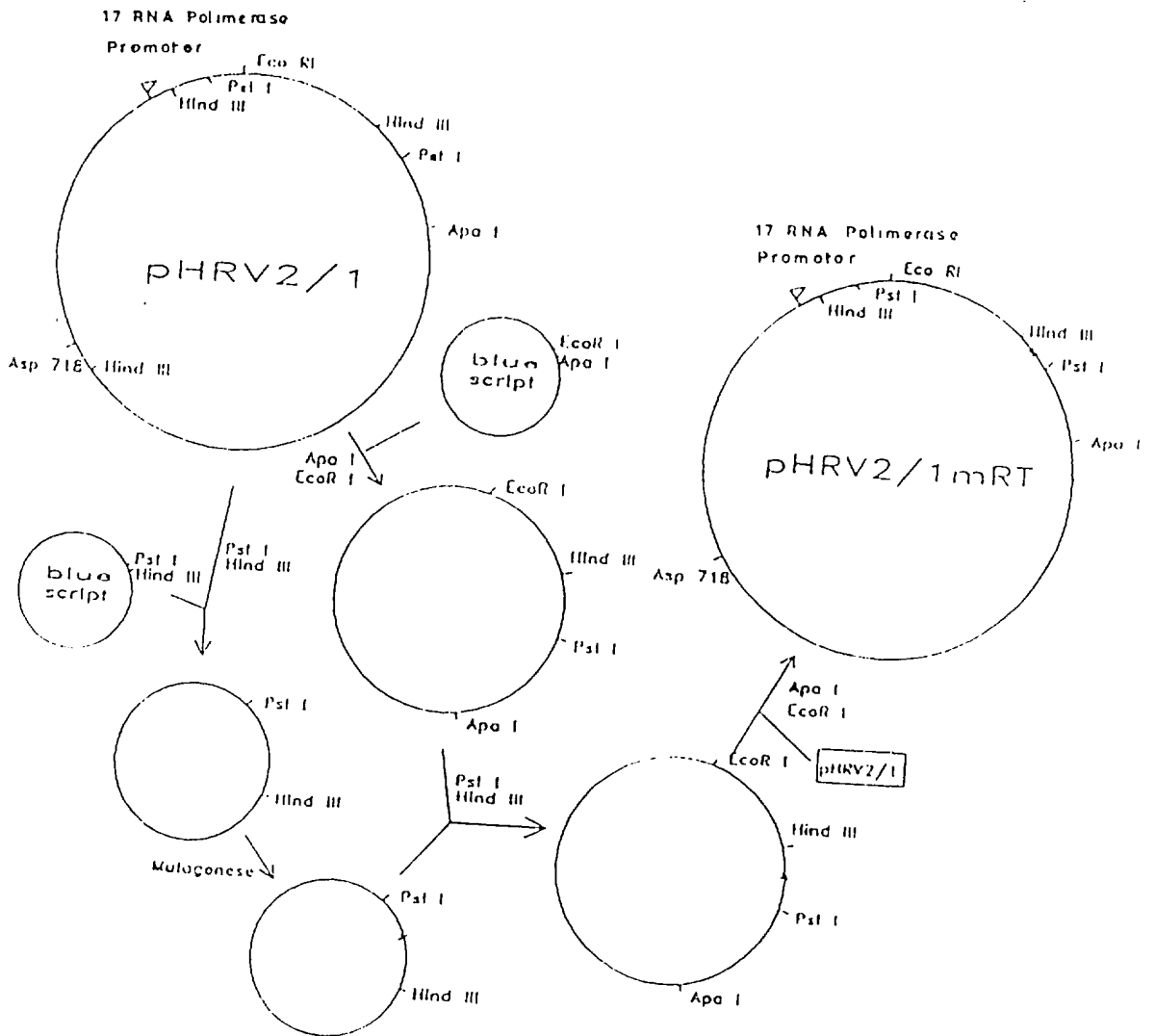


FIG. 4

BAD ORIGINAL

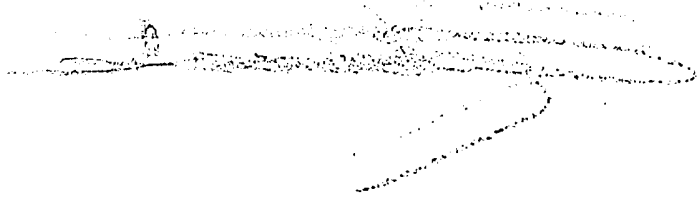
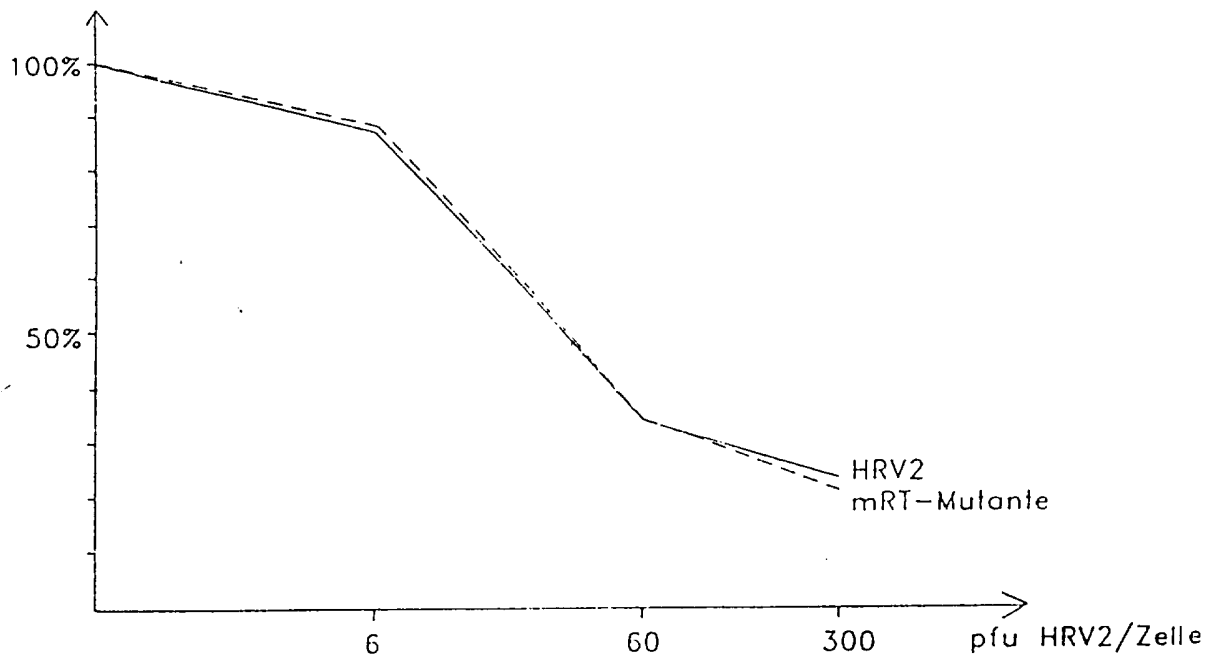


FIG. 5

ORIGINAL

a)



b)

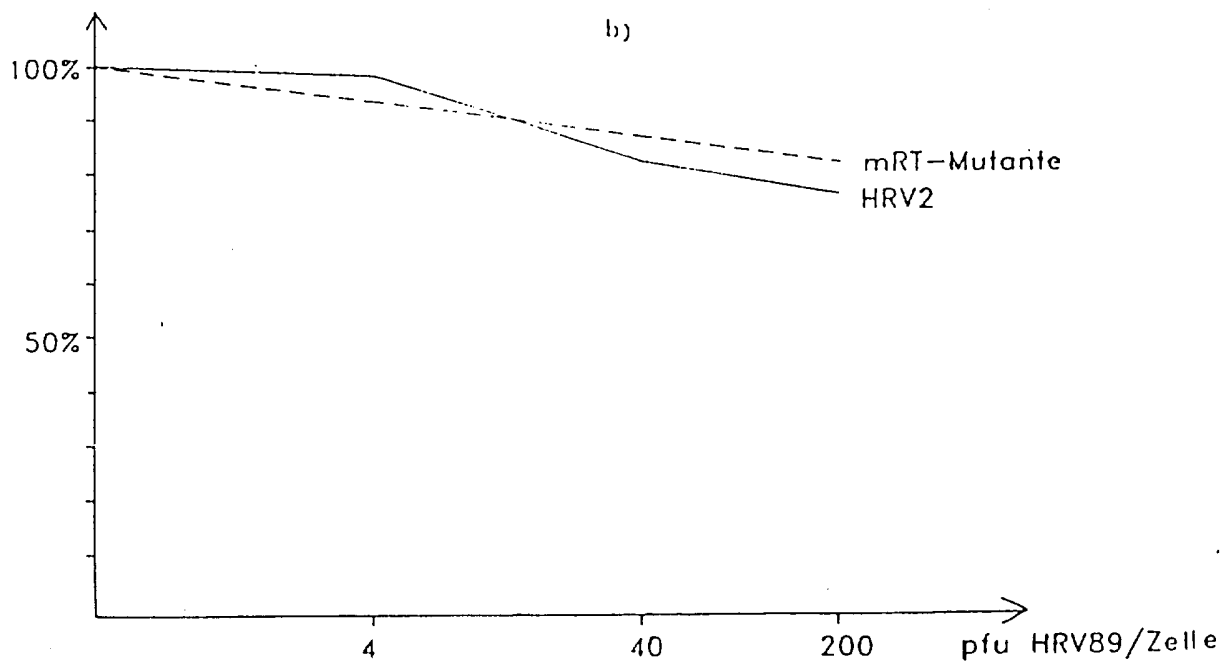


FIG. 6