

(11) Número de Publicação: **PT 1185615 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 1/00 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2000.04.05	(73) Titular(es): WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION 614 WALNUT STREET MADISON, WI 53705 US
(30) Prioridade(s): 1999.04.06 US 127912 P 1999.05.06 US 132839 P	(72) Inventor(es): KAWAOKA, YOSHIHIRO US GABRIELE NEUMANN US
(43) Data de publicação do pedido: 2002.03.13	(74) Mandatário: JOSE EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2007.08.01 094/2007	

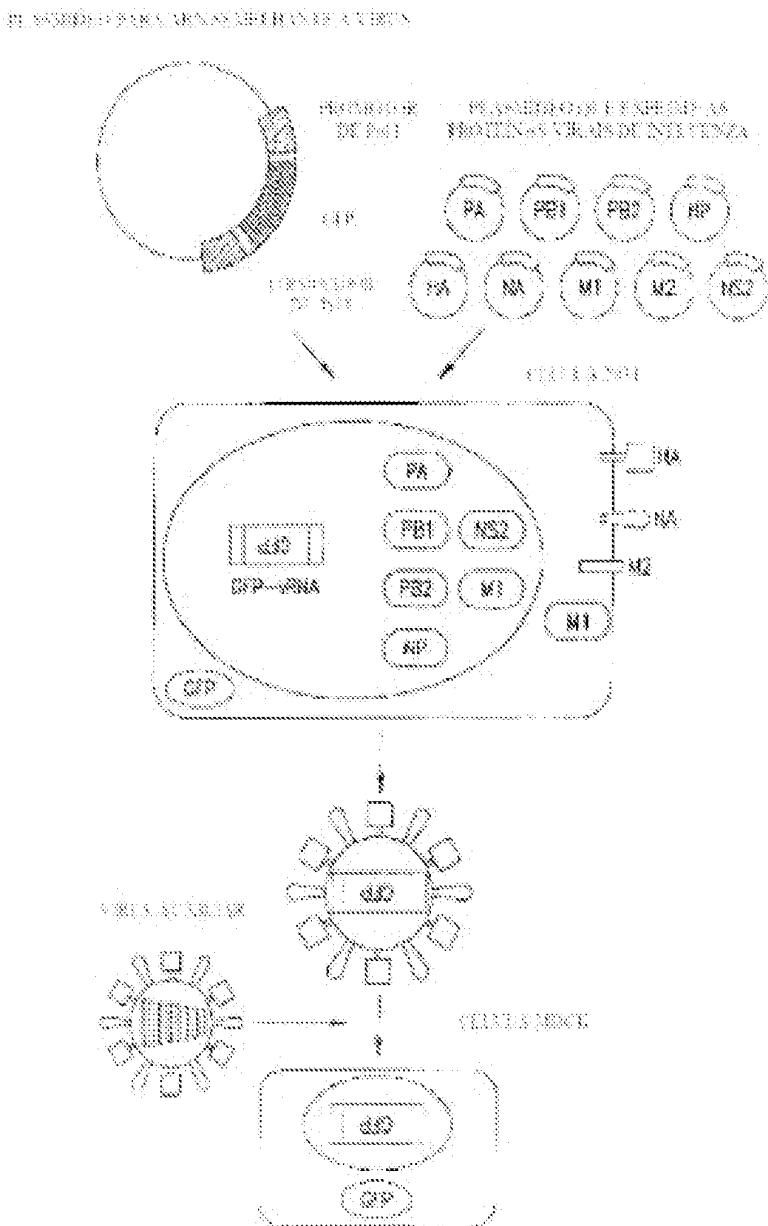
(54) Epígrafe: "VÍRUS DA INFLUENZA RECOMBINANTES PARA VACINAS E TRATAMENTO GENÉTICO"

(57) Resumo:

RESUMO

"VÍRUS DA INFLUENZA RECOMBINANTES PARA VACINAS E TRATAMENTO GENÉTICO"

A presente invenção proporciona uma composição útil para a preparação de vírus de influenza A, por exemplo na ausência de vírus auxiliar.



DESCRÍÇÃO

"VÍRUS DA INFLUENZA RECOMBINANTES PARA VACINAS E TRATAMENTO GENÉTICO"

Antecedentes da Invenção

A capacidade para gerar vírus de ARN infecciosos a partir de ADNC clonados tem contribuído grandemente para a compreensão biológica desses agentes patogénicos e, desse modo, para processos aperfeiçoados de controlo de doenças (Palese et al., 1996). No entanto, este progresso tem sido relativamente limitado para vírus de ARN de sentido negativo quando comparados com vírus de ARN de sentido positivo, visto que nem o ARN viral genómico (ARNv) nem o ARN complementar antigenómico (ARNc) dos vírus de ARN de sentido negativo podem servir como um molde ("template") directo para a síntese de proteínas. Pelo contrário, o ARNv, após encapsidação pela nucleoproteína viral (NP), deve ser transcrito em ARNm de sentido positivo pelo complexo viral de ARN polimerase. Deste modo, forma-se a unidade de replicação mínima pelo ARNv genómico complexado com a NP e as proteínas de polimerase. A despeito destes obstáculos, estabeleceram-se processos de engenharia genética inversa para produzir vírus de ARN não segmentados de sentido negativo, incluindo o vírus da raiva (Snell et al., 1994), o vírus da estomatite vesicular (Lawson et al., 1995; Whelan et al., 1995), o vírus do sarampo (Radecke et al., 1995), o vírus sincicial respiratório (Collins et al., 1995), o vírus de Sendai (Garcin et al., 1995; Kato et al., 1996), o vírus da morrinha (Baron et al., 1997), o vírus da parainfluenza humana de tipo 3 (Hoffman et al., 1997) e SV5 (He et al., 1997).

As famílias Orthomyxoviridae, Arenaviridae e Bunyaviridae contêm genomas segmentados de ARN de cordão negativo e incluem diversos patogéneos humanos e animais, por exemplo, vírus de influenza de tipos A, B e C (*Orthomyxoviridade*), vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) (Arenaviridae) e vírus da febre encefalítica e hemorrágica (Bunyaviridae, Arenaviridae). Os seus genomas consistem em dois (Arenaviridae), três (Bunyaviridae), ou seis a oito (Orthomyxoviridae) moléculas de ARN de cordão Único de polaridade negativa (complementar para o ARNm). Os ARNv interactuam com a NP e a ARN polimerase dependente do ARN para formar complexos de ribonucleoproteína (RNPs). Os RNPs são rodeados por uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira. Inserido neste invólucro encontram-se glicoproteínas virais, as quais são essenciais para a ligação do receptor e para a entrada na célula hospedeiro. Deste modo, a produção de vírus ARN segmentados de sentido negativo a partir de ADNc clonados constitui um desafio formidável, já que tem de se produzir um ARNv separado para cada segmento genético.

Bridgen e Elliott (1996) produziram um vírus de Bunyamwera (família Bunyaviridae) a partir de ADNc três segmentos de ARNv antigenómico de sentido positivo. Não obstante, a eficácia do isolamento do vírus foi reduzida. Nenhum dos ortomixovírus, que contém seis (togotovírus), sete (vírus da influenza C) ou oito (vírus da influenza A e B) segmentos da ARN de sentido negativo foram produzidos inteiramente a partir de ADNc clonados. Este atraso no progresso sentiu-se mais acentuadamente nas esforços para controlar infecções pelo vírus da influenza.

Palese e colegas (Enami et al., 1990) foram pioneiros na genética inversa, sistema dependente do vírus auxiliar para o vírus da influenza A (Figura 1A). Na sua abordagem, os complexos RNP são produzidos por síntese de ARNv *in vitro* na presença de polimerase purificada e proteínas NP e então utilizados para transfectar células eucarióticas. A infecção subsequente com o vírus auxiliar de influenza A tem como resultado a produção de vírus que possuem um gene derivado do ADNc clonado. Um segundo processo, desenvolvido por Neumann et al. (1994), baseia-se na síntese *in vivo* de ARNv por ARN polimerase I (Figura 1B), uma enzima celular que transcreve o ARN ribossómico a que faltam tanto a terminação 5' como uma cauda 3' poliA. As células infectadas com o vírus da influenza e transfectadas com um plasmídeo que contém que contém ADNc clonado pelo vírus da influenza, flanqueadas por sequências promotora e terminadora de ARN polimerase I, que conduziram à produção de vírus transfectantes. Com ambos os processos, no entanto, os transfectantes têm de ser escolhidos a partir de um vasto conjunto original de vírus auxiliares, o que exige um sistema forte de escolha e complica a produção do crescimento de vírus defeituosos.

Um sistema para produzir partículas semelhantes ao vírus incompetente da replicação (VLPs) foi desenvolvido por Mena et al., (1996), em que um ARNv semelhante ao vírus da influenza que codifica um gene repórter é transcrito *in vitro* e transfectado para células eucarióticas. Todas as dez proteínas do vírus da influenza são expressas a partir de plasmídeos sobre o controlo de um promotor T7 ARN da polimerase. Quando as células transfectadas são infectadas com um vírus recombinante de vacínia que exprime a ARN polimerase T7, eles produzem VLP de influenza. No entanto,

a eficácia do sistema é reduzida: em 25% das experiências, os investigadores não conseguiram detectar a expressão do gene repórter. Além disso, o vírus de vacínia exprime mais do que 80 proteínas, qualquer das quais pode afectar o ciclo de vida da influenza viral.

Pleschka et al. 1996 descreve um sistema genético inverso para a produção de um RNPv individual que contém CAT ADNc inteiramente a partir de plasmídeos transfetados em 293 células, mas a produção dos vírus completos (sem auxiliar) não foi indicada.

Deste modo, o que se torna necessário é um processo para preparar vírus de ARN segmentados de cordão negativo, por exemplo, ortomixovírus tais como vírus da influenza A, inteiramente a partir de ADNc clonados.

Sumário da Invenção

A presente invenção diz respeito a um processo para a preparação de vírus influenza infecciosos na ausência de um vírus auxiliar, que compreende as fases que consistem em:

(a) a introdução em células hospedeiras, na ausência de um vírus auxiliar, de uma composição que compreende uma pluralidade de vectores de ortomixovírus que compreendem:

(i) um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de PA do vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(ii) um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de PB1 do vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(iii) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de PB2 do vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(iv) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de HA do vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(v) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de NP do vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(vi) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de NA do vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(vii) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de M do vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(viii) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de NS do vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(ix) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um segmento de ADN que codifica um polipéptido PA da influenza e ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(x) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um segmento de ADN que codifica um polipéptido PB1 da influenza e ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(xi) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um segmento de ADN que codifica um polipéptido PB2 da influenza e ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(xii) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um segmento de ADN que codifica um

polipéptido NP da influenza e ligado a uma sequência de terminação da transcrição; e

(b) o isolamento dos vírus de influenza infecciosos a partir das referidas células hospedeiras.

A presente invenção proporciona pelo menos um dos seguintes vectores isolados e purificados: um vector que compreende o promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de PA de vírus de influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de PB1 de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de PB2 do vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de HA de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de NP de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de NA de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de M de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, e um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de NS de vírus da influenza ligado a uma sequência e terminação da transcrição. O ADNc pode apresentar-se na orientação sentido ou anti-sentido em relação ao promotor. Deste modo, um vector tal como se

descreve na presente memória descritiva pode codificar uma proteína de ortomixovírus (sentido), ou ARNv (anti-sentido). Pode utilizar-se qualquer promotor para exprimir uma proteína viral. Os promotores preferidos para os vectores que codificam o ARNv incluem, mas sem ficarem limitados a estes, um promotor de ARN polimerase I, um promotor de ARN polimerase II, um promotor de polimerase ARN III, um promotor T7 e um promotor T3. Prefere-se ainda que o promotor de ARN polimerase I seja um promotor de ARN polimerase I humana. As sequências de terminação da transcrição preferidas para os vectores que codificam o ARNv incluem, mas sem ficarem limitadas a estas, uma sequência de terminação da transcrição de ARN polimerase I, uma sequência de terminação da transcrição da ARN polimerase II, ou uma sequência de terminação da transcrição da ARN polimerase III, ou uma ribozima. De preferência, os vectores compreendem ADNc de influenza, por exemplo influenza A (por exemplo, qualquer gene de influenza A que inclui quaisquer dos subtipos 15 HA ou 9 NA), ADN B ou C (veja-se os Capítulos 45 e 46 de *Fields Virology* (Fields et al. (eds.), Lippincott-Raven Publ.. Philadelphia, PA (1996)), muito embora se encare que o(s) gene(s) de quaisquer vírus possam ser utilizados nos vectores ou processos de acordo com a presente invenção.

Descreve-se ainda na presente memória descritiva uma composição que compreende uma pluralidade dos vectores ortomixovírus descritos na presente memória descritiva, Por consequência, a composição compreende vectores escolhidos a partir e um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de PA de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um

ADNc de PB1 de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de PB2 de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de HA de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de NP de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de NA de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de M de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de NS de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição e vectores que codificam a PA do vírus da influenza, um vector que codifica a PB1 de vírus da influenza, um vector que codifica a PB2 do vírus da influenza e um vector que codifica a NP de vírus da influenza. De preferência, os vectores que codificam as proteínas virais compreendem ainda uma sequência de terminação da transcrição. Prefere-se que um promotor para os vectores que compreende ADNc do vírus da influenza inclua um promotor ARN polimerase I, um promotor ARN polimerase II, um promotor ARN polimerase III, um promotor T7 e um promotor T3. Prefere-se igualmente que cada vector que compreende um ADNc do vírus da influenza compreenda uma sequência de terminação da transcrição tal como uma sequência de terminação da transcrição de ARN polimerase I, uma sequência de terminação da transcrição de ARN polimerase II, ou uma sequência de terminação da

transcrição de ARN polimerase III, ou uma ribozima. De preferência, os vectores compreendem ADN de infiuenza por exemplo, ADN da influenza A, B ou C. Mais preferivelmente, a composição descrita na presente memória descriptiva a qual pode ser aplicada no processo para a preparação de vírus da influenza infecciosos de acordo com a presente invenção compreende uma pluralidade de vectores ortomixovírus, que compreendem um vector que inclui um promotor de ARN polimerase I ligado de um modo funcional a um ADNc de PA de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição de ARN polimerase I, um vector que compreende um promotor de ARN polimerase I ligado de um modo funcional a um ADNc de PB1 de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição de ARN polimerase I, um vector que compreende um promotor de ARN polimerase I ligado de um modo funcional a um ADNc de PB2 de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição de ARN polimerase I, um vector que compreende um promotor de ARN polimerase I ligado de um modo funcional a um ADNc de HA de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição de ARN polimerase I, um vector que compreende um promotor de ARN polimerase I ligado de um modo funcional a um ADNc de NP de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição de ARN polimerase I, um vector que compreende um promotor de ARN polimerase I ligado de um modo funcional a um ADNc de NA de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição de ARN polimerase I, um vector que compreende um promotor de ARN polimerase I ligado de um modo funcional a um ADNc de M de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição de ARN polimerase I, e um vector que compreende um promotor de ARN polimerase I ligado de um modo funcional

a um ADNc de NS de vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição de ARN polimerase I; e vectores que codificam a PA do vírus da influenza, um vector que codifica a PB1 do vírus da influenza, um vector que codifica a PB2 do vírus da influenza e um vector que codifica a NP do vírus da influenza ou um vector que codifica a HA do vírus da influenza, um vector que codifica a NA do vírus da influenza, um vector que codifica a M1 do vírus da influenza, um vector que codifica a M2 do vírus da influenza e um vector que codifica a NS2 do vírus da influenza.

Adicionalmente, uma composição tal como a que se descreveu anteriormente, compreende ainda um vector que compreende um promotor ligado a sequências não codificadoras de 5' ortomixovírus ligadas às desejadas sequências não codificadoras de 3' ortomixovírus ligadas a sequências de terminação da transcrição. A introdução de uma tal composição numa célula hospedeira permissiva para a replicação de ortomixovírus tem como resultado um ARNv que compreende vírus recombinantes que corresponde a sequências do vector que compreende sequências não codificadoras de 5' ortomixovírus ligadas a um ADNc ligado a sequências não codificadoras de 3' ortomixovírus. De preferência, o ADNc tem uma orientação anti-sentido. Também preferivelmente, o promotor é um promotor de ARN polimerase I, um promotor de ARN polimerase II, um promotor de ARN polimerase III, um promotor T7 e um promotor T3. Prefere-se igualmente que a sequência de terminação da transcrição seja uma sequência de terminação da transcrição de ARN polimerase i, uma sequência de terminação da transcrição da ARN polimerase I ou uma sequência de terminação da transcrição de ARN polimerase III, ou uma ribozima. Por exemplo, o ADNc pode

codificar um epitopo imunogénico, tal como um epitope na terapia do cancro ou vacina.

Um grande número de vectores tal como descritos na presente memória descritiva pode encontrar-se ligada fisicamente ou cada vector pode encontrar-se presente num plasmídeo individual ou outro, por exemplo, veículo linear de libertação do ácido nucleico.

Conforme se mencionou anteriormente, a presente invenção proporciona igualmente um processo para a preparação de vírus da influenza. O processo compreende fazer contactar uma célula com uma pluralidade dos vectores descritos na presente memória descritiva, por exemplo, de maneira sequencial ou simultânea, por exemplo, recorrendo a uma composição tal como descrita na presente memória descritiva, em uma quantidade eficaz para se obter os vírus da influenza infecciosos. A presente invenção inclui igualmente o isolamento do vírus a partir de uma célula que se fez contactar com a composição. Deste modo, na presente memória descritiva descreve-se um vírus isolado, bem como uma célula hospedeira que se faz contactar com a composição ou com o vírus isolado tal como se descreve na presente memória descritiva.

Conforme se descreve a seguir, preparam-se os vírus da influenza A inteiramente a partir da ADNC clonados. A abordagem da engenharia genética inversa descrita na presente memória descritiva é altamente eficaz e pode ser utilizada para introduzir mutações em qualquer segmento genético e para desenvolver sistemas de libertação do gene baseados no vírus da influenza. Por exemplo, transfectaram-se células de rim embriónico humano (293T) com oito

plasmídeos, cada um deles a codificar um ARN viral do vírus A/WSN/33 (H1N1) ou A/PR/8/34 (H1N1), flanqueado por um promotor de ARN polimerase I humana e um terminador de ARN polimerase I de murganho, conjuntamente com plasmídeos que codificam uma nucleoproteína viral e as polimerases virais PB2, PB1 e PA. Esta estratégia conduz a $\approx 1 \times 10^4$ de unidades formadoras de placa (pfu) de vírus por ml de sobrenadante às 48 horas após a transfecção. Dependendo dos vírus produzidos, a adição dos plasmídeos que exprimem todas as restantes proteínas estruturais virais conduziu a um aumento substancial da produção de vírus, $\approx 3 \times 10^4$ pfu/ml. A engenharia genética inversa foi igualmente utilizada para produzir um vírus reclassificado que contém o gene PB1 do vírus A/PR/8/34, em que todos os outros genes representam A/WSN/33. Os vírus adicionais produzidos por este processo apresentavam mutações no gene PA ou possuíam um epitope estranho na cabeça da proteína neuraminidase.

Além disso, pode utilizar-se a mesma abordagem para outros vírus para produzir vírus de ARN não segmentado de cordão negativo (isto é, Paramixoviridae, Rhabdoviridae e Filoviridae), ou outros vírus de ARN segmentados de cordão negativo, por exemplo Arenaviridae e Buniaviridae, inteiramente do ADNC clonado. Além disso, a expressão do ARNC em células em vez do ARNv pode melhorar a eficácia da produção dos vírus.

O processo de acordo com a presente invenção permite a manipulação fácil dos vírus da influenza, por exemplo, pela introdução de mutações de atenuação no genoma viral. Além disso, dado que os vírus da influenza induzem uma forte imunidade humoral e celular, a invenção melhora grandemente estes vírus tais como vectores de vacina, particularmente

com vista à disponibilidade de variantes naturais do vírus, que podem ser utilizadas de maneira sequencial, permitindo o uso repetitivo para a terapia genética.

Desse modo, tal como se encontra descrito na presente memória descritiva, isolaram-se e purificaram-se os vectores ou plasmídeos, os quais exprimem ou codificam proteínas do vírus da influenza, ou exprimam ou codificam a ARNv de influenza, tanto em RNAv nativo como recombinante. Deste modo, um vector ou plasmídeo tal como descrito na presente memória descritiva pode compreender um gene ou uma estrutura de leitura abertura de interesse, por exemplo, um gene estranho que codifica um péptido ou uma proteína imunogénico(a) úteis como uma vacina. De preferência, o vector ou plasmídeo que exprime o ARNv da influenza compreende um promotor, por exemplo, um promotor de ARN polimerase I, apropriado para a expressão numa célula hospedeira particular, por exemplo, células hospedeiras aviárias ou de mamíferos, tais como células caninas, felinas, equinas, bovinas, ovinas ou de primatas incluindo células humanas. Prefere-se também os vectores ou os plasmídeos que compreendem ADN Úteis para preparar ARNv de influenza que compreende sequências de terminação da transcrição de ARN polimerase I. Para os vectores ou os plasmídeos que compreendem um gene ou uma estrutura de leitura aberta, prefere-se que o gene ou a estrutura de leitura aberta seja flanqueada pelas sequências de não codificação 5' e 3' do vírus da influenza, e ainda mais preferivelmente, que o gene ou a estrutura de leitura aberta seja ligado de um modo funcional a um promotor de ARN polimerase I e uma sequência de terminação da transcrição de ARN polimerase I.

Conforme se descreve a seguir, transfecaram-se 293T com plasmídeos que codificam as proteínas estruturais do vírus da influenza A conjuntamente com um plasmídeo que continha o gene repórter de proteína de fluorescência verde (GFP), flanqueado por um promotor e um terminador ARN polimerase I. A transcrição intracelular da última construção pela ARN polimerase I gerou GFP ARNv que foi encapsulada nas partículas semelhantes ao vírus da influenza. Este sistema, que produziu mais de 10^4 partículas infecciosas por ml de sobrenadante, pode ser utilizado em estudos de replicação do vírus da influenza e formação de partículas. Pode também beneficiar os esforços na produção de vacinas e no desenvolvimento de vectores aperfeiçoados para a terapia genética.

Por conseguinte, na presente memória descritiva descreve-se uma célula hospedeira, cujo genoma é aumentado de maneira estável com pelo menos uma molécula de ADN recombinante. A molécula de ADN recombinante inclui pelo menos uma das seguintes: uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sítio lox ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ou terminação ligado a um segundo sítio lox ligado a uma região de codificação HA do vírus da influenza; uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sítio lox ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ou terminação ligada a um segundo sítio lox ligado a uma região de codificação NA do vírus da influenza; uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligada a um primeiro sítio lox ligado a um segmento de ADN

que compreende uma sequência de transcrição stop ou terminação ligada a um segundo sítio *lox* ligado a uma região de codificação M1 do vírus da influenza; uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sítio *lox* ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ou terminação ligada a um segundo sítio *lox* ligado a uma região de codificação NS2 do vírus da influenza; uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sítio *lox* ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ou terminação ligada a um segundo sítio *lox* ligado a uma região de codificação M2 do vírus da influenza; uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sítio *loxP* ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ou terminação ligada a um segundo sítio *lox* ligado a uma região de codificação PA do vírus da influenza; uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sítio *lox* ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ou terminação ligada a um segundo sítio *lox* ligado a uma região de codificação PB1 do vírus da influenza; uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sítio *iox* ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ou terminação ligada a um segundo sítio *lox* ligado a uma região de codificação PB2 do vírus da influenza; ou uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sítio *lox* ligado a um segmento de ADN

que compreende uma sequência de transcrição stop ou terminação ligada a um segundo sitio *lox* ligado a uma região de codificação NP do vírus da influenza.

De preferência, a célula hospedeira é aumentada com uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sitio *lox* ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ligada a um segundo sitio *lox* ligado a uma região de codificação HA do vírus da influenza; uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sitio *lox* ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ligada a um segundo sitio *lox* ligado a uma região de codificação NA do vírus da influenza; uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sitio *lox* ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ligada a um segundo sitio *lox* ligado a uma região de codificação M1 do vírus da influenza; uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sitio *lox* ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ligada a um segundo sitio *lox* ligado a uma região de codificação NS2 do vírus da influenza; e uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sitio *lox* ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ligada a um segundo sitio *lox* ligado a uma região de codificação M2 do vírus da influenza. De preferência, os sitios *lox* são sitios de *loxP*.

A presente invenção proporciona um processo para a preparação de vírus de influenza infecciosos com replicação defeituosa. O processo compreende fazer contactar uma célula hospedeira que é aumentada com moléculas de ADN recombinante conforme se descreveu na presente memória descritiva, por exemplo, que codificam HA, NA, M1, M2, NS2, PA, PB1, PB2 ou NP, com um vírus de influenza recombinante que compreende: ARNv que compreende uma estrutura de leitura aberta Cre e ARNv que compreendem genes de influenza não expressos pela célula hospedeira. Isola-se então o vírus a partir da célula que se fez contactar. De preferência, o vírus recombinante compreende ainda ARNv que compreende uma estrutura desejada de leitura aberra. Como alternativa, faz-se contactar a célula hospedeira aumentada com um vector que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado de um modo funcional a um segmento de ADN que codifica Cre e uma pluralidade de vectores cada um dos quais compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc do vírus da influenza não presente na célula hospedeira. Isola-se então o vírus.

Na presente memória descritiva, descreve-se uma célula hospedeira, cujo genoma é aumentado com uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sítio lox ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ligada a um segundo sítio lox ligado a uma superfície da célula hospedeira que liga uma região de codificação da proteína; uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sítio lox ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ligada a um segundo sítio lox ligado a uma região de codificação da

proteína de fusão; uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sítio *lox* ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ligada a um segundo sítio *lox* ligado a uma região de codificação M1 do vírus da influenza; uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sítio *lox* ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ligada a um segundo sítio *lox* ligado a uma região de codificação NS2 do vírus da influenza; e uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sítio *lox* ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ligada a um segundo sítio *lox* ligado a uma região de codificação M2 do vírus da influenza. De preferência, os sítios *lox* são sítios *loxP*.

De igual modo, descreve-se também na presente memória descritiva uma célula hospedeira, cujo genoma é aumentado com uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sítio *lox* ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ligada a um segundo sítio *lox* ligado à superfície de ligação da célula hospedeira e uma região de codificação da proteína de fusão; uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sítio *lox* ligado a um segmento de ADN que compreende uma sequência de transcrição stop ligada a um segundo sítio *lox* ligado a uma região de codificação M1 do vírus da influenza; uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor funcional na célula hospedeira

ligado a um primeiro sítio *lox* ligado a um segmento de ADN que comprehende uma sequência de transcrição stop ligada a um segundo sítio *lox* ligado a uma região de codificação NS2 do vírus da influenza; e uma molécula de ADN recombinante que comprehende um promotor funcional na célula hospedeira ligado a um primeiro sítio *lox* ligado a um segmento de ADN que comprehende uma sequência de transcrição stop ligada a um segundo sítio *lox* ligado a uma região de codificação M2 do vírus da influenza. De preferência, os sítios *lox* são sítios *loxP*.

As células hospedeiras aumentadas com moléculas de ADN recombinante conforme se descreveu anteriormente são úteis para a preparação de vírus de influenza infecciosos com replicação defeituosa. Por exemplo, faz-se contactar uma célula-hospedeira transformada de maneira estável com moléculas de ADN recombinante que codificam NA, NA, M1, M2 e NS2 com uma pluralidade de vectores, isto é, vectores que exprimem ARNv, que comprehende uma estrutura de leitura aberta Cre, ARNv que comprehende PA, ARNv que comprehende NP, ARNv que comprehende PB1, ARNv que comprehende PB2 e, eventualmente, ARNv que comprehende um gene de interesse; e vectores que codificam PA, PB1, PB2 e NP.

Os processos para a produção de vírus descritos na presente memória descritiva, que não requerem infecção com vírus auxiliar, são úteis em estudos de mutagénese viral, e na produção de vacinas (por exemplo, para a SIDA, influenza, hepatite B, hepatite C, rinovírus, filovírus, malária, herpes, e doença do pé e da boca) e vectores de terapia genética (por exemplo, para o cancro, SICA, adenosina desaminase, distrofia muscular, deficiência de

ornitina transcarbamilase e tumores do sistema nervoso central).

Desse modo, descreve-se na presente memória descritiva um vírus para utilização em terapia clínica (por exemplo, para uma vacina ou terapia genética). Por exemplo, descreve-se na presente memória descritiva um processo para imunizar um indivíduo contra um agente patogénico, por exemplo, uma bactéria, vírus ou parasita, ou um tumor maligno. O processo compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade de pelo menos um vírus isolado de acordo com a presente invenção, eventualmente em combinação com um adjuvante, eficaz para imunizar o indivíduo. O vírus compreende ARNv que compreende um polipeptídeo codificado pelo agente patogénico ou um polipeptídeo específico do tumor.

Descreve-se igualmente um processo para aumentar ou intensificar a expressão de uma proteína endógena num mamífero que apresenta uma indicação ou doença caracterizada por uma quantidade diminuída ou uma ausência de proteína endógena. O processo compreende a administração ao mamífero de uma quantidade de um vírus isolado de acordo com a presente invenção eficaz para aumentar ou intensificar a quantidade da proteína endógena no mamífero. De preferência, o mamífero é um ser humano.

Na presente memória descritiva descrevem-se igualmente vectores e processos para a produção recombinante de vírus de corda positivo, por exemplo vírus da AHN de sentido positivo. Deste modo, descreve-se na presente memória descritiva um vector que compreende um segmento de ADN que compreende sequências de transcrição de iniciação de ARN

polimerase I ligadas de um modo funcional a um segundo segmento de ADN que comprehende sequências de um vírus de ARN de sentido positivo, eventualmente ligado de maneira operacional a um terceiro segmento de ADN que comprehende sequências de transcrição de terminação de ARN polimerase I. De igual modo, proporciona-se um processo para do(s) vector(es) para a preparação de vírus recombinantes. O processo é particularmente útil na medida em que utiliza ADN clonado e técnicas de transfecção, evitando deste modo a manipulação do ARN. Além disso, a transcrição de ARN polimerase I é altamente eficaz e tem uma elevada fidelidade. Para os vírus de ARN de sentido de positivo cujo ARN genómico é não fechado (por exemplo, pestivírus; vírus da hepatite C; e Picornaviridae, incluindo poliovírus, rinovírus, vírus da hepatite A, e vírus da doença do pé e da boca), introduz-se um ADNc que codifica o genoma de comprimento completo na orientação do sentido genómico entre as sequências promotora e terminadora da ARN polimerase I. A transfecção do plasmídeo resultante em células hospedeiras permissivas conduz ao ARN genómico para a replicação do vírus. Um número de vírus de ARN de sentido positivo contém ARNs genómicos fechados (por exemplo, flavivírus, incluindo o vírus da febre de dengue e diversos vírus da encefalite). Muito embora os transcritos de ARN polimerase I não sejam fechado, um ADNc que codifica o genoma de comprimento completo de vírus de ARN com ARNs genómicos fechados é introduzido numa orientação de sentido anti-genómico num vector de transcrição da ARN polimerase I. Após a transfecção do plasmídeo resultante, a ARN polimerase I celular transcreve um ARN anti-genómico (não fechado). Além disso, a eotransfecção com plasmídeos de expressão da proteína para as proteínas necessárias para a replicação tem como resultado a replicação do ARN anti-

-genómico, conduzindo deste modo ao ARN genómico e, por último, ao vírus infeccioso.

Descrição Resumida dos Desenhos

Figura 1. Diagrama esquemático de sistemas genéticos inversos estabelecidos. No processo de transfecção de RNP (A), reúnem-se proteínas NP purificada e polimerase em RNPs com a utilização de ARNv sintetizado in vitro. As células são transfectadas com RNPs, seguido por uma infecção com o vírus auxiliar. No processo (B) de ARN polimerase I, transfecita-se para as células um plasmídeo que contém um promotor de ARN polimerase I, um ADNC que codifica o ARNv a ser recuperado e o terminado de ARN polimerase I. A transcrição intracelular por ARN polimerase I permite obter o ARNv sintético, que é embalado em partículas de vírus de progenia por infecção com vírus auxiliares. Com ambos os processos, seleccionam-se vírus transfectantes (isto é, os que contêm o ARN derivado do ADNC clonado), a partir de uma população de vírus auxiliares.

Figura 2. Diagrama esquemático da produção de construções de ARN polimerase I. Amplificaram-se os ADNC derivados do vírus da influenza por PCR, digerido com *Bsm*BI e clonado nos sítios *Bsm*BI do vector pH21 (E. Hoffmann, Ph. D., Justus, Liebig-University, Giessen, Alemanha), que contém o promotor (P) da ARN polimerase I humana e o terminador T do ARN polimerase I de murganho. O nucleótido de timidina a montante da sequência terminador (*T) representa a extremidade 3' do ARN viral de influenza. As sequências dos vírus de influenza A encontram-se indicadas por letras a negrito.

Figura 3. Processo de engenharia genética inversa proposta para a produção de vírus segmentados de ARN de

sentido negativo. Os plasmídeos que contêm o promotor de ARN polimerase I ligado a um ADNC para cada um dos oito segmentos de ARN viral, e o terminador de ARN polimerase I são transfectados para células conjuntamente com os plasmídeos de expressão da proteína. Muito embora os vírus infecciosos possam ser produzidos com plasmídeos que exprimem PA, PB1, PB2 e NP, a expressão de todas as restantes proteínas estruturais (indicadas entre parêntesis rectos) e aumenta a eficácia da produção de vírus dependendo do vírus produzido.

Figura 4. Eliminação do epitope FLAG em células infectadas com um vírus transfectante. Utilizou-se a coloração do anticorpo para identificar a NA em células MDCK infectadas com vírus de tipo selvagem quer PR8-WSN-FL79 (A, D) ou A/WSN/33 (B, E), ou células MDCK falsamente infectadas (C, F). Nove horas após a infecção, fixaram-se as células com paraformaldeído, trataram-se com Triton X-100 e incubaram-se com anticorpos monoclonais quer anti-FLAG (A-C) ou anti-WSN NA (D-F). A coloração intensa Golgi (vermelho) é evidente nas amostras positivas (A, D e E).

Figura 5. Isolamento dos mutantes PA. Amplificou-se o gene PA de cada vírus por RT-PCR com iniciadores que produziram um fragmento de 1226 bp (posição 677 a 1903 no ARNm, alas 1, 3, 5), que foi então digerido com a enzima de restrição *Bsp*120I (na posição 846 do ARNm, alas 4, 7) ou *Pvu*II (na posição 1284 do ARNm, alas 2, 6). A presença dos sítios *Bsp*120I ou *Pvu*II nos produtos PCR conduziu quer a fragmentos de 169 pb e 1057 pb ou 607 pb e 619 pb, respectivamente. PM = marcadores do peso molecular.

Figura 6. Iniciadores utilizados para ampliar as sequências de influenza.

Figura 7. 3 plasmídeo pPolI-GFP para a produção do ARN semelhante ao vírus da influenza que codifica a proteína

GFP. Este plasmídeo contém um gene GFP (derivado de pEGFP-N1; Clontech, Palo Alto, CA) numa orientação anti-sentido as regiões de não codificação 5' e 3' do segmento do vírus da influenza a, flanqueado pelo promotor humano ARN polimerase I e o terminador de murganho ARN polimerase I.

Figura 8. Diagrama esquemático da estratégia da produção de VLP. Os plasmídeos da expressão de proteína individuais um plasmídeo que contém o promotor ARN polimerase I, um ADNc que codifica o gene repórter GFP, e o terminador de ARN polimerase I são transfectados para células 293T. A transcrição intracelular por ARN polimerase I conduz ao GFP ARNv de polaridade negativa, conforme indicado pelas letras invertidas. Recolhem-se os líquidos sobrenadantes que contêm VLPs, misturados com vírus de influenza auxiliares e inoculam-se em células MDCK.

Figura 9. As proteínas PA, PB1, PB2 e NP de vírus influenza A encapsidam GFP ARNv produzido por ARN polimerase I, que conduz à expressão de GFP. Transfectaram-se células 293T com plasmídeos que exprimem as proteínas PB2, PB1, PA e NP (A) ou com todos os plasmídeos com exceção do que exprime a proteína NP (B), conjuntamente com ARN polimerase I-plasmídeo do gene GFP para síntese intracelular do ARNv de gene de repórter. Fixaram-se as células 48 horas após a transfecção e determinou-se a expressão de GFP com um microscópio de fluorescência.

Figura 10. Produção de VLPs de influenza infecciosa. Transfectaram-se células 293T com nove plasmídeos, cada um dos quais exprime uma proteína de estrutura viral diferente (A), ou com oito plasmídeos que omitem a construção de NP (B), conjuntamente com o ARN polimerase I-plasmídeo do gene GFP. Quarenta e oito horas após a trasnfecção, isolaram-se os sobrenadantes que contêm VLP, misturados com o vírus auxiliar A/WSN/33, e inocularam-se em células MDCK.

Fixaram-se as células 10 horas após a infecção, e determinou-se a expressão de GFP com um microscópio de fluorescência.

Figura 11. Esquema da utilização da recombinase CR_E para exprimir a proteína NS2 da influenza numa célula, cujo genoma é aumentado com uma molécula de ADN recombinante. O genoma da célula compreende uma molécula de ADN recombinante que compreende um promotor ligado a um sítio específico, sítio de recombinação (por exemplo, *loxP*) ligado a uma sequência de transcrição stop ligado a um segundo sítio específico de recombinação com a mesma orientação que o primeiro sítio específico de recombinação ligado ao gene NS2.

Figura 12. Preparação do vírus de influenza deficiente em replicação.

Descrição Pormenorizada da Invenção

Definições

Tal como utilizados na presente memória descriptiva, os termos "isolado e/ou purificado" referem-se a preparação, isolamento e/ou purificação *in vitro* de um vector ou um plasmídeo de acordo com a presente invenção, de modo que não se encontre associado com substâncias *in vivo*, ou se encontre substancialmente purificado a partir de substâncias *in vitro*. Tal como utilizada na presente memória descriptiva, a expressão "ácido nucleico recombinante" ou "sequência ou segmento de ADN recombinante" refere-se a um ácido nucleico, por exemplo ao ADN, que foi derivado ou isolado a partir de uma fonte, que pode subsequentemente ser alterada quimicamente *in vitro*, de modo que a sua sequência não ocorra naturalmente, ou

corresponda a sequências de ocorrência que não se encontram posicionadas tal como se encontrariam posicionadas no genoma nativo. Um exemplo do ADN "derivado" a partir de uma fonte, seria uma sequência de ADN que é identificada como um fragmento útil, e que é então sintetizado quimicamente sob uma forma essencialmente pura. Um exemplo de um tal ADN "isolado" a partir de uma fonte seria uma sequência de ADN útil que é separada ou removida da referida fonte por meios químicos, por exemplo através da utilização de endonucleases de restrição, de modo que possa ainda ser manipulado, por exemplo, amplificado, para utilização na invenção, através da metodologia da engenharia genética.

Tal como utilizada na presente memória descritiva, a expressão 'recombinação específica no sítio' pretende-se que inclua os três seguintes eventos: 1) eliminação de um segmento alvo de ADN flanqueado pelos sítios ou sequências de recombinação específicos do sítio, por exemplo sítios *loxP*; 2) inversão da sequência nucleotídica de um segmento de ADN alvo flanqueado por sítios ou sequências de recombinação específicas do sítio, por exemplo, sítios *lox*; e 3) permuta recíproca de segmentos de ADN alvo próximos dos sítios ou sequências de recombinação específicos do sítio, por exemplo, sítios *lox* localizados em diferentes moléculas de ADN. Os sistemas de recombinase específicos do sítio incluem, mas sem ficarem limitados a estes, o sistema Cre/*loxP* do bacteriófago P1 (patente de invenção norte-americana N.º 5 658 772).

Para remediar a reversibilidade da reacção de recombinação específica do sítio, pode alterar-se a estrutura do sistema de recombinação. A sequência de recombinação específica do sítio pode ser mutada de uma

maneira tal que o produto da reacção de recombinação deixa de ser reconhecido como substrato para a reacção inversa, estabilizando deste modo o invento de integração ou excisão. Por exemplo, para eliminar sequências indesejáveis, posicionam-se os sítios lox com a mesma orientação de modo a flanquearem as sequências não desejadas.

Outros sítios lox incluem os sítios *loxB*, *loxL* e *loxR* que são sequências nucleotídicas isoladas a partir de *E. coli* (Hoess e tal., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3398 (1982)). Podem igualmente produzir-se os sítios lox por uma variedade de técnicas de síntese que são conhecidas na especialidade. Por exemplo, vias de síntese para a produção dos sítios lox que se encontram descritas em Ito e tal., Nuc. Acid Res., 10, 1755 (1982) e Ogilvie e tal., Science, 214, 270 (1981).

Tal como se utiliza na presente memória descritiva, a expressão "sítio lox" significa uma sequência nucleotídica na qual o produto genético do gene *cre* pode catalisar uma recombinação específica do sítio. *LoxP* é uma sequência nucleotídica com 34 pares de bases que pode ser isolada a partir do bacteriófago P1 por processos conhecidos da especialidade (veja-se, por exemplo, Hoess e tal., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3398 (1982)). *LoxP* consiste em duas repetições invertidas de 13 pares de bases separadas por uma região espaçadora de pares de bases.

Tal como utilizada na presente memória descritiva, a expressão "gene *cre*" significa uma sequência nucleotídica que codifica para um produto genético enzimático o qual efectua a recombinação específica do sítio do ADN em

células eucarióticas nos sítios lox. O gene *cre* pode ser isolado a partir do bacteriófago *P1* por processos conhecidos na especialidade (veja-se Abremaid e tal., *Cell*, 32, 1301-1311 (1983)).

Replicação do vírus da influenza

Os vírus da influenza A possuem ~~um~~ ~~genoma~~ de ácido ARNv (ARNvs) virais de sentido negativo de cordão individual que codificam um total de dez proteínas. O ciclo de vida do vírus da influenza tem início com a ligação da hemaglutinina (HA) a receptores que contêm ácido siálico na superfície da célula hospedeira, seguida por uma ~~endocitose~~ mediada por um receptor. O pH baixo dos últimos endossomas desencadeia um desvio conformacional no HA, expondo deste modo o terminal N da subunidade HA2 (o denominado péptido de fusão). O péptido de fusão inicia a fusão da membrana viral e endossómica e a matriz proteica (M1) e os complexos RNP são libertados no citoplasma. Os RNPs consistem em nucleoproteína (NP), que encapsida ARNv, e o complexo de polimerase viral, que é formado pelas proteínas PA, PB1 e PB2. Os RNPs são transportados para o núcleo, onde tem lugar a transcrição e a replicação. O complexo de ARN polimerase catalisa três reacções diferentes: síntese de um ARNm com uma estrutura poliA com terminal 5' e 3', um ARN (ARNc) complementar de comprimento completo e de ARNv genómico utilizando o ADNc como modelo ("template"). Reúnem-se então ARNvs, NP e proteínas de polimerase recentemente sintetizadas em RNPs, exportadas dos núcleos e transportadas para a membrana de plasma, onde ocorre a germinação das partículas do vírus da progenia. A proteína neuraminidase (NA) desempenha um papel crucial final na infecção pela eliminação do ácido siálico dos

sialiloligossacáridos, libertando deste modo, os víriões recentemente reunidos a partir da superfície da célula e evitando a auto-agregação das partículas de vírus. Muito embora a associação dos vírus desenvolva interacções proteína-proteína e proteína-ARNv, a natureza destas interacções é largamente desconhecida.

Togotovírus

Os togotovírus (THOV) representam um novo género da família de *Orthomyxoviridae*. Eles são transmitidos por carraças que foram encontradas em animais domésticos, incluindo camelos, cabras e gado vacum. Por consequência, os THOV podem replicar-se em carraças e células de vertebrados. O genoma dos THOV compreende seis segmentos de ARN no sentido negativo de cordão individual. As proteínas codificadas pelos três segmentos maiores mostram uma homologia significativa em relação às proteínas de polimerase do vírus da influenza PB2, PB1 e PA. O segmento 5 codifica uma proteína relacionada com o vírus da influenza NP. A glicoproteína dos THOV, que é codificada pelo segmento 4, não é homóloga quer das proteínas HA ou NA do vírus da influenza, mas apresenta uma sequência análoga à da glicoproteína de baculovírus. Julga-se que o segmento mais pequeno codifica uma proteína de matriz e não se parece com qualquer das proteínas do vírus da influenza. Tal como o vírus da influenza, ambas as extremidades 3' e 5' do ARNv são necessárias para a actividade promotora, e esta actividade encontra-se localizada nos nucleótidos terminais 14 e 15 das extremidades 3' e 5' do ARNv, respectivamente.

A síntese do ARNm dos THOV é iniciada pelas estruturas fechadas derivadas de células hospedeiras. No entanto, contrariamente ao vírus da influenza, apenas as estruturas fechadas (sem nucleótidos adicionais!) são cindidas a partir de ARNms celulares (Albo e tal., 1996; Leahy e tal., 1997; Weber e tal., 1996). Os ensaios de cisão *in vitro* revelaram que tanto as extremidades 5' e 3' do ARNv são necessárias para a actividade de endonuclease (Leahy et al., 1998), mas a adição de um modelo promotor de ARNc não estimula a actividade de endonuclease (Leahy et al., 1998), tal como foi indicada para o vírus da influenza (Cianci et al., 1995; Hagen et al., 1994). Foi proposta uma estrutura em anzol ("hook") para os THOV (Leahy et al., 1997; Weber et al., 1997), a qual é análoga à estrutura em saca-rolhas proposta para o vírus da influenza (Flick et al., 1996). Esta estrutura em anzol ("hook"), no entanto, apenas se encontra no promotor THOV ARNv. A sequência promotora de ARNc não permite a formação de pares de bases entre as posições 2 e 9, e entre as posições 3 e 8 na extremidade 5' do ARNc. As alterações nas posições 3 ou 8 para permitir a formação de pares de bases entre estes nucleótidos estimulam a actividade de endonuclease, a qual constitui uma prova de suporte muito forte da estrutura em anzol ("hook") proposta (Leahy et al., 1998). No entanto, esta estrutura pode ser crucial para a regulação do ciclo de vida dos THOV; o promotor de ARNv, que forma a estrutura em anzol ("hook"), pode estimular a actividade de endonuclease de PB2, permitindo deste modo a transcrição. O promotor de ARNc, pelo contrário, não pode formar a estrutura em anzol ("hook") e pode, por consequência, ser incapaz de estimular a actividade de endonuclease, resultando deste modo na replicação.

Bunyaviridae

A família *Bunyaviridae* inclui diversos vírus que provocam febres hemorrágicas ou encefalíticas em seres humanos (por exemplo, febre de Rift Valley, Hantaan, La Crosse e febre hemorrágica da Crimeia-Congo). Os víriões esféricos e envolvidos contêm três segmentos de ARN de sentido negativo de cordão simples (revisto em Elliott, 1997). O segmento maior (L) codifica a proteína viral de ARN polimerase (proteína L), enquanto o segmento M codifica as duas glicoproteínas virais G1 e G2 e uma proteína não estrutural (NSm). O segmento mais pequeno (S) codifica a proteína núcleocapside (N) e uma segunda proteína não estrutural (NSs). A replicação e a transcrição do vírus tem lugar no citoplasma e nos rebentos de víriões recentemente associados através das membranas do aparelho Golgi.

Bridgen & Elliott (1996) estabeleceram um sistema de engenharia genérica inversa para produzir vírus infecciosos de Bunyamwera inteiramente a partir de ADNcs clonados. Eles seguiram uma estratégia primeiramente descrita por Schnell et al. (1994) para o vírus da raiva: a transcrição intracelular de um ADNc que codifica para o ARN antigenómico de sentido positivo (mas não para o ARN genómico de sentido negativo) em células que exprimem polimerase e nucleoproteína virais. Brigden & Elliott (1996) infectaram-se células HeLaT4+ com vírus de vaccinia que exprimem a polimerase T7 e transfetaram estas células com plasmídeos que exprimem proteínas codificadas pelos segmentos S, M e L. Eles transfetaram estas células com três plasmídeos que codificam os ADNcs antigenómicos de comprimento completo flanqueados pelo promotor da polimerase T7 e o ribozima do vírus da hepatite delta. Para

aumentar o número de partículas de buniavírus relativamente ao número de partículas do vírus vacínia, os autores utilizaram células de mosquito nas quais o vírus de Bunyamwera se replica mas não o de vacínia. Este protocolo pode ser utilizado não somente para produzir por engenharia genérica *Bunyaviridae*, mas também produzir vírus reclassificados que não podem ser facilmente obtidos por células com infectantes com diferentes estirpes de *Bunyaviridae*.

Para estudar os elementos do promotor de buniavírus e as proteínas virais que são necessárias para a transcrição e a replicação, Dunn et al. (1995) clonaram o gene CAT na orientação de sentido negativo entre as regiões não traduzidas 5' e 3' do segmento de ARN S de Bunyamwera. Transfetaram-se as células com construções que exprimem as proteínas codificadas pelos segmentos L e S e transfetaram-se então com ARN transcrito *in vitro*, do que resultou a actividade CAT. O segmento S de buniavírus codifica duas proteínas, N e NS, em estruturas de leitura sobrepostas. Para determinar se ambas estas proteínas são necessárias para a transcrição e a replicação, ensaiaram-se construções que exprimem apenas N ou NSs quanto à actividade CAT. A expressão da proteína N, conjuntamente com a proteína L, deu como resultado uma actividade CAT, enquanto que não foi detectada qualquer actividade CAT com a construção de expressão NSs. Deste modo, as proteínas L e N são suficientes para a transcrição e a replicação de um ARN semelhante ao buniavírus.

Tal como com o vírus da influenza, as sequências terminais dos ARNs de buniavírus são conservadas complementarmente e elevadamente. Considerou-se por

consequência que estes elementos de sequência definem o promotor buniaviral e são cruciais para a actividade promotora. A eliminação dos cinco nucleótidos na extremidade 3' do ARN viral reduz drasticamente a expressão CAT (Dunn et al., 1995). Pelo contrário, a adição de dois nucleótidos na extremidade 5', ou de 11 ou 35 nucleótidos na extremidade 3' não elimina a expressão CAT (Dunn et al., 1995). Por consequência, tal como o complexo de polimerase do vírus da influenza, a proteína de buniavirus polimerase pode, aparentemente, iniciar a transcrição e/ou a replicação de maneira interna.

A presente invenção será descrita ainda pelos exemplos seguintes.

Exemplo 1

Materiais e Processos

Células e vírus. Mantiveram-se células de rim embriónico humano 293T e células de rim canino Madin-Darby (MDCK) em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal de vitela e em meio de Eagle (MEM) que contém 5% de soro de vitela recém-nascida, respectivamente. Mantiveram-se todas as células à temperatura de 37°C em 5% de CO₂. Propagaram-se os vírus da influenza A/WSN/33 (H1N1) e A/PR/8/34 em ovos com dez dias de idade

Construção de plasmídeos. Para produzir construções de ARN polimerase I introduziram-se ADNcs clonados derivados de ARN viral A/WSN/33 ou A/PR/8/34 entre as sequências promotora e terminadora de ARN polimerase I. Resumidamente,

amplificaram-se os ADNcs clonados por PCR com iniciadores que contêm sítios *Bsm*BI, digeridos com *Bsm*BI, e clonados nos sítios *Bsm*BI do vector pHH21 que contém o promotor de ARN polimerase I humana e o terminador de ARN polimerase I de murganho, separados por sítios *Bam*HI (Figura 2). Os genes PB1, PA, HA, NP, NA, M e NS da estirpe A/WSN/33 foram amplificados com PCR pela utilização dos plasmídeos seguintes: pSCWPB2, pGW-PB1 e pSCWPA (todos obtidos a partir de Dr. Debi Nayak na University of California Los Angeles), e pWH17, pWNP152, pT3WNA15 (Castrucci et al., 1992), pGT3WM e pWNS1, respectivamente. O gene PB1 do vírus da influenza A/PR/8/34 foi amplificado pela utilização de pcDNA774 (PB1) (Perez et al., 1998) como um template. Veja-se a figura 6 para as sequências dos iniciadores. Para garantir que os genes se encontravam isentos de mutações indesejadas, sequenciaram-se os fragmentos derivados de PCR com um auto-sequenciador (Applied Biosystem Inc., CA, USA) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Os ADNcs que codificam os genes HA, NP, NA e M1 do vírus A/WSN/33 foram clonados conforme descritos (Huddleston et al., 1982) e subclonados no vector de expressão eucariótica pCAGGS/MCS (controlado pelo promotor de β -actina de frangos) (Niwa et al., 1991), do que resultam pEWSN-HA, pCAGGS-WSN-NP0-14, pCAGGS-WNA15 e pCAGGS-WSN-M1-2/1, respectivamente. Os genes M2 e NS2 a partir do vírus A/PR/8/34 foram amplificados por PCR e clonados em pCAGGS/MCS, para se obter pEP24c e pCA-NS2. Finalmente, utilizaram-se pcDNA774 (PB1), pcDNA763 (PB2) e pcDNA787 (PA) para exprimir as proteínas PB2, PB1 e PA sob o controlo do promotor do citomegalovírus (Perez et al., 1998).

Produção de partículas de influenza infecciosas.

Transfектaram-se células 293T (1×10^8) com um máximo de 17 plasmídeos em quantidades diferentes com a utilização de Trans IT LT-1 (Panvera, Madison, Wisconsin) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, misturou-se o ADN com o reagente de transfecção (2 μ l de Trans IT-LT-1 por μ g de ADN), incubaram-se à temperatura ambiente durante 45 minutos e adicionaram-se às células. Seis horas mais tarde, substituiu-se a mistura reagente de transfecção do ADN por Opti-MEM (Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland) que contém 0,3% de albumina de soro bovino e 0,01% de soro fetal de vitela. A diferentes tempos após a transfecção, recolheram-se os vírus a partir do sobrenadante e titularam-se em células MDCK. Visto que o vírus auxiliar não era necessário para este processo, analisaram-se os vírus transfectantes isolados sem purificação de placa.

Determinação da percentagem de células transfectadas com plasmídeo que produzem vírus. Vinte e quatro horas após a transfecção, dispersaram-se células 293T com 0,02% de EDTA em células individuais. Diluiu-se então a suspensão de células 10 vezes e transferiu-se para monocamadas confluentes de células MDCK em placas com 24 cavidades. Detectaram-se os vírus pelo ensaio da hemaglutinação.

Ensaio de irnunocoloração. Nove horas após a infecção com o vírus da influenza, lavaram-se as células duas vezes com soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS) e fixaram-se com 3,7% de paraformaldeído (em PBS) durante 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, trataram-se com 0,1% de Triton X-100 e processaram-se conforme descrito por Neumann et al. (1997).

Resultados

Produção de vírus infecciosos por expressão actuada pelo plasmídeo de segmentos de ARN viral, três subunidades de polimerase e proteína NP. Muito embora a transfecção das células com uma mistura de RNPs extraídos de víriões purificados tenha como resultado partículas infecciosas de influenza, esta estratégia não é supostamente eficiente quando utilizada com oito RNPs diferentes produzidos *in vitro*. Para produzir vírus de influenza infecciosa inteiramente a partir de ADNcs, produziram-se oito RNP virais *in vivo*. Deste modo, prepararam-se os plasmídeos que contêm ADNcs para os ARNs virais de comprimento completo do vírus A/WSN/33, flanqueados pelo promotor de ARN polimerase I humana e o terminador de ARN polimerase I de murganho. Em princípio, a transfecção destes oito plasmídeos em células encarióticas deverá ter como resultado a síntese de todos os oito ARNvs de influenza. As proteínas PB2, PB1, PA e NP, produzidas por cotransfecção de plasmídeos de expressão da proteína, devem ser reunidas com os ARNvs em RNPvs funcionais que são replicados e transcritos, formando por último vírus de influenza infecciosos (Figura 3). Transfectaram-se 1×10^6 de células 293T com plasmídeos de expressão da proteína (1 µg de pcDNA762(PB2), 1 µg de pcDNA774(PB1), 0,1 µg de pcDNA787(PA) e 1 µg de pCAGGS-WSN-NP0/14) e 1 µg de cada um dos seguintes plasmídeos de ARN polimerase I (pPolI-WSN-PB2, pPolI-WSN-PB1, pPolI-WSN-PA, pPolI-WSN-HA, pPolI-WSN-NP, pPolI-WSN-NA, pPolI-WSN-M e pPolI-WSN-NS). A decisão de utilizar uma quantidade reduzida de pcDNA787(PA) baseou-se em observações prévias (Mena et al., 1996) e em resultados das condições óptimas para a produção de partículas semelhantes a vírus (VLPs) (resultados não representados). Vinte e quatro horas após a

transfecção de células 293T, observaram-se 7×10^3 pfu de vírus por ml no sobrenadante (Experiência 1, Quadro 1), o que é demonstrativo pela primeira vez da capacidade da engenharia genética inversa para produzir vírus de influenza A inteiramente a partir de plasmídeos.

Quadro 1. Conjuntos de plasmídeos utilizados para produzir vírus de influenza a partir de ADNc* clonado

Plasmídeos de ARN polimerase e para†	Experiências							
	1	2	3	4	5	6	7	8
PB1	+	+	+	+	+	+	+	+
PB2	+	+	+	+	+	+	+	+
PA	+	+	+	+	+	+	+	+
NP	+	+	+	+	+	+	+	+
HA		+		+	+	+	+	+
NA		+		+	+	+	+	+
M1		+		+	+	+	+	+
M2		+		+	+	+	+	+
NS2		+		+	+	+	+	+
Título do vírus (pfu/ml)	7×10^3	7×10^3	1×10^3	3×10^4	0	0	0	0

* As células 293T foram transfetadas com os plasmídeos indicados. Vinte e quatro (Experiências 1 e 2) ou quarenta e oito horas (Experiências 3-8) mais tarde, determinou-se o vírus do sobrenadante em células MDCK.

† A menos que se indique de outro modo, construíram-se os plasmídeos com ADNc que representam o ARNs de vírus A/WSN/33.

Eficiência da produção de vírus de influenza com coexpressão de todas as proteínas estruturais virais. Muito embora a NP viral e as proteínas de polimerase sejam suficientes para a produção activada do plasmídeo de vírus da influenza, foi possível poder aumentar essa eficiência. Em estudos prévios, a expressão de todas as proteínas

estruturais do vírus da influenza (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1, M2 e NS2) resultaram em VLPs que continham um ARNv artificial que codifica um gene de cloramfenicol-acetiltransferase repórter (Mena et al., 1996). Deste modo, a disponibilidade do complemento completo das proteínas estruturais, em vez de apenas as requeridas para a replicação e transcrição do ARN viral, pode melhorar a eficácia da produção de vírus. Para esta finalidade, transfecaram-se células 293T com quantidades óptimas de plasmídeos de expressão da proteína geral viral (conforme julgado pela produção de VLP; resultados não publicados): 1 µg de pcDNA762 (PB2) e pcDNA774 (PB1), 0,1 µg de pcDNA787 (PA); 1 µg de pEWSN-HA, pCAGGS-WSN-NP0/14 e pCAGGS-WNA15; 2 µg de pCAGGS-WSN-M1-2/1; 0,3 µg de pCA-NS2; e 0,03 µg de pEP24c (para M2), conjuntamente com 1 µg de cada plasmídeo de ARN polimerase I (Experiência 2, Quadro 1). Transfetou-se um segundo conjunto de células com o mesmo conjunto de plasmídeos de ARN polimerase I, com a exceção do gene de PB1, para o qual o pFoll-PR/8/34-PB1 foi substituído numa tentativa de produzir um vírus de reclassificação, conjuntamente com plasmídeos que exprimem apenas as proteínas PA, PB1, PB2 e NP (Experiência 3, Quadro 1) ou os que exprimem todas as proteínas estruturais da influenza (Experiência 4, Quadro 1). Os rendimentos de vírus WSN não diferem apreciavelmente para as 24 horas (Experiências 1 e 2, Quadro 1) ou para as 36 horas (resultados não indicados) após a transfeção. No entanto, verificou-se um aumento de mais do que dez vezes nos rendimentos dos vírus com PR/8/34-PSI quando todas as proteínas estruturais da influenza viral fora proporcionadas (Experiências 3 e 4, Quadro 1). Os controlos negativos, aos quais faltou um dos plasmídeos para a expressão das proteínas PA, PB1, PB2 de NP, não permitiu a

obtenção de quaisquer vírus (Experiências 5-8, Quadro 1). Deste modo, dependendo do vírus produzido, a expressão de todas as proteínas estruturais do vírus da influenza A melhorou agradavelmente a eficácia do processo genético inverso.

Seguidamente, determinou-se a cinética da produção do vírus após a transfecção de células utilizando o conjunto de plasmídeos utilizado para produzir um vírus com o gene A/PR/8/34-PB1. Em duas das três experiências, detectou-se primeiramente o vírus às 24 horas após a transfecção. O título medido nessa altura, $>10^3$ pfu/ml, tinha aumentado para $>10^6$ pfu/ml em 48 horas após a transfecção (Quadro 2). Para calcular a percentagem de células transfectadas com plasmídeo que se encontravam a produzir vírus, trataram-se células 293T com EDTA (0,02%) 24 horas após a transfecção para dispersar as células e realizaram-se então estudos de diluição de limitação. Nesta experiência, não se observou qualquer vírus livre na cultura sobrenadante neste instante. Os resultados indicaram que 1 em 10^{13} células se encontrava a produzir partículas de vírus infecciosas.

Quadro 2. Cinéticas da produção de vírus após transfecção de plasmídeo em células 293T*

Horas após a transfecção do plasmídeo	Título do vírus na cultura sobrenadante (pfu/ml)		
	Experiência	1	2
8	ND	ND	ND
12	ND	ND	8
18	ND	ND	8
24	ND	$>10^3$	$>10^3$
30	ND	8×10^3	8×10^3
36	8×10^3	$>10^3$	$>10^3$
42	ND	$>10^3$	8×10^3
48	8×10^3	$>10^3$	1×10^3

* As células 293T foram transfectadas com oito plasmídeos de ARN polimerase I que codificam genes do vírus A/WSN/33 com a excepção do gene PB1, o qual é derivado de vírus

A/PR/8/34, e nove plasmídeos de expressão da proteína conforme se descreveu no texto.

Em instantes diferentes, titularam-se os vírus na cultura sobrenadante em células MDCK. ND = não realizado.

Isolamento de vírus de influenza que contém o epitopo FLAG na proteína NA. Para verificar que o novo sistema de engenharia genética inversa permitiu a introdução de mutações no genoma de vírus de influenza A, produziu-se um vírus que contém um epitope FLAG (Castrucci et al., 1992) na proteína NA. Transfектaram-se células 293T com um plasmídeo de ARN polimerase I (pPolI-WSN-NA/FL79) que continha um ADNc que codificava tanto a proteína NA como um epitope FLAG no fundo da cabeça da proteína, conjuntamente com os requeridos ARN polimerase I e plasmídeos da expressão da proteína. Para confirmar que o vírus isolado (PR8-WSN-FL79) exprime de facto a proteína NA-FLAG, realizaram-se ensaios de imunocoloração de células infectadas com vírus de tipo selvagem PR8-WSN-FL79. Um anticorpo monoclonal do epitope FLAG detectou células infectadas com PR8-WSN-FL79, mas não as infectadas com o vírus de tipo selvagem (Figura 4). O isolamento do vírus PR8-WSN-FL79 foi eficaz tal como para o vírus de tipo selvagem não marcado (resultados não indicados). Estes resultados indicam que o novo sistema de engenharia genética inversa permite a introdução de mutações no genoma do vírus da influenza A.

Produção de vírus de influenza infecciosos que contêm mutações no gene PA. Para produzir vírus que possuem mutações no gene PA, introduziram-se duas mutações silenciosas que criam novas sequências de reconhecimentos para endonucleases de restrição (*Bsp*120I na posição 846 e

*Pvu*II na posição 1284 do ARNm). Previamente, não foi possível modificar este gene por engenharia genética inversa, devido à falta de um sistema de selecção fiável. Isolaram-se vírus de transfecção, PA-T846C e PA-A1284. Clonaram-se biologicamente os vírus transfectantes isolados mediante duas diluições limitativas consecutivas. Para verificar que os vírus isolados eram, de facto, transfectantes com mutações no gene PA, obteve-se o ADNc para o gene PA mediante transcriptase inversa-PCR. Conforme ilustrado na Figura 5, os vírus PA-T846C e PA-A1284C tinham as mutações esperadas dentro do gene PA, conforme demonstrado pela presença dos sítios de restrição recentemente introduzidos. O PCR das mesmas amostras virais iniciadores sem a fase de transcrição inversa não conseguiu produzir quaisquer produtos (resultados não representados), o que é indicativo de que o PA ADNc era, de facto, originado a partir do ARNv em vez do plasmídeo utilizado para produzir os vírus. Estes resultados ilustram como se pode produzir e isolar vírus e genes mutados sem o recurso a vírus auxiliares.

Discussão

Os sistemas genéticos reversos descritos na presente memória descriptiva permitem a produção eficaz de vírus de influenza A inteiramente a partir de ADNcs clonados. Bridgen and Elliott (1996) também utilizaram sistemas genéticos reversos para produzir um vírus Bunyamwera (família *Bunyaviridae*), mas o mesmo contém apenas três segmentos de ARN de sentido negativo e a eficácia da sua produção era reduzida, 10^3 pfu/ 10^7 células. Muito embora os vírus produzidos diferissem entre as experiências, observou-se consistentemente $>10^3$ pfu/ 10^6 células para o

vírus da influenza, que contém oito segmentos. Há várias explicações para a elevada eficácia do sistema de engenharia genética inversa descrita anteriormente. Em vez de produzir RNPs *in vitro* (Luytjes et al., 1989), os RNPs foram produzidos *in vivo* através da síntese intracelular de ARNvs que utilizam ARN polimerase I e através da expressão de plasmídeos actuados das proteínas de polimerase viral e NP. De igual modo, a utilização de células 293T, que são facilmente transfectadas com plasmídeos (Goto et al., 1997), garantiu que uma grande população de células recebeu todos os plasmídeos necessários para a produção do vírus. Além disso, o grande número de transcritos produzidos pela ARN polimerase I, que se encontram entre as enzimas mais abundantemente expressas nas células em crescimento, contribuiu provavelmente para a eficácia global do sistema. Estas características conduziram a um número correspondente abundantemente de transcritos de ARNv em quantidades adequadas de proteína viral para encapsidação do ARNv, formação de RNPs no núcleo e exportação destes complexos para a membrana celular, onde os novos vírus são reunidos e libertados.

Os sistemas genéticos reversos previamente estabelecidos (Enami et al., 1990; Neumann et al., 1994; Luytjes et al., 1989; Pleschka et al., 1996) requerem a infecção com o vírus auxiliar e, por consequência, processos e selecção que permitem que um pequeno número de transfectantes seja encontrado a partir de um ~~grande~~ número de vírus auxiliares. Tais estratégias foram utilizadas para produzir vírus de influenza que possuem um dos seguintes genes derivados do ADNc: PB2 (Subbarao et al., 1993), HA (Enami et al., 1991; Horimoto et al., 1994), NP (Li et al., 1995), NA (Enami et al., 1990), M (Castrucci et al., 1995;

Yasuda et al., 1994) e NS (Enami et al., 1991). A maior parte dos processos de selecção, excepto no que toca aos aplicáveis aos genes HA e NA, baseia-se na temperatura de crescimento, restrição da gama de hospedeiro ou sensibilidade ao fármaco, limitando deste modo a utilidade da engenharia genética inversa para a análise funcional dos produtos genéticos. Mesmo com os genes HA e NA, para os quais se encontram disponíveis sistemas de selecção fiáveis accionados pelo anticorpo, é difícil produzir vírus com defeitos de crescimento proeminentes. Pelo contrário, o sistema genético inverso descrito na presente memória descritiva não exige vírus auxiliar e permite que se produzam transfectantes com mutações em qualquer segmento genético ou com defeitos de crescimento graves. Esta vantagem é demonstrada na Figura 5, que ilustra o isolamento de vírus transfectantes com um gene PA mutado. Tendo a tecnologia para introduzir qualquer mutação viável no genoma do vírus da influenza A será possível que os investigadores se preocupem com um número de assuntos há muito em repouso, tais como a natureza das sequências reguladoras em regiões não traduzidas do genoma viral, relações estrutura-função de proteínas virais e a base molecular da restrição da gama de hospedeiro e patogenicidade viral.

Muito embora as vacinas de influenza inactivadas se encontrem disponíveis, a sua eficácia é subóptima devido, parcialmente, à sua capacidade limitada para eliciar respostas de IgA Local e de células T citotóxicas. Os ensaios clínicos de vacinas ~~de~~ influenza vivas adaptadas ao frio agora sob observação sugerem tais vacinas são atenuadas de maneira óptima, de tal modo que elas não provocaram sintomas de influenza, mas induziram ainda

imunidade protectora (revisto em Keitel & Piedra, 1998). No entanto, os resultados preliminares indicam que estas vacinas de vírus vivos não serão significativamente mais eficazes do que as melhores vacinas inactivadas (revisto em Keitel. & Piedra, 19983, deixando espaço para outros aperfeiçoamentos. Uma possibilidade seria a de modificar uma vacina adaptada ao frio com o sistema de genética inversa descrito anteriormente. Como alternativa, seria possível partir de um esfregar pela utilização de genética inversa para produzir uma estirpe-mãe ("master") de influenza A com mutações de atenuação múltipla nos genes que codificam as proteínas internas. A aplicação mais intrigante do sistema genético inverso descrito na presente memória descriptiva baseia-se na produção rápida de vacinas de vírus vivos atenuados nos casos de pandemias suspeitas que envolvem novos subtipos de HA ou NA de vírus de influenza.

Esse novo sistema genético reverso melhorará provavelmente a utilização de vírus da influenza com vectores de vacina. Os vírus podem ser produzidos de modo a exprimirem proteínas estranhas ou epitopos imunogénicos além das proteínas de influenza viral. Seria possível, por exemplo, produzir vírus com proteínas estranhas tais como um nono segmento (Enami et al., 1991) e usá-las como vacinas vivas. Não somente os vírus de influenza estimulam fortes respostas imunes mediadas por células humorais, mas também proporcionam ~~uma~~ ampla rede de superfície de virião de proteínas HA e NA (por exemplo 15 subtipos de HA e 9 de NA e as suas variantes epidémicas), permitindo a imunização repetida da mesma população alvo.

Os VLPs de influenza que possuem um ARNv artificial que codifica um gene repórter foram produzidos mediante expressão de proteínas estruturais virais e de ARNv com o sistema de polimerase de vaccinia-T7 (Mena et al., 1996). Utilizando a engenharia genética inversa, é agora possível produzir VLPs que contêm ARNvs que codificam proteínas necessárias para a transcrição e a replicação do ARNv (isto é, PA, PB1, PB2 e NP), bem como ARNvs que codificam as proteínas de interesse. Tais VLPs podem constituir veículos úteis de libertação do gene. De um modo importante, a sua falta de genes que codificam proteínas estruturais virais garantiria que os vírus infecciosos não seriam produzidos após a terapia com o gene VLP. Visto que o genoma do vírus da influenza não se integra no cromossoma do hospedeiro, o sistema VLP seria apropriado para a terapia genética em situações que requerem apenas a tradução de células a curto prazo (por exemplo, o tratamento do cancro). Em contraste com os vectores do adenovírus (Kovesdi et al., 1997), os VLPs da influenza podiam conter tanto variantes HA como NA, permitindo o tratamento repetido de populações alvo.

A família *Orthomyxoviridae* comprehende vírus e influenza A, B e C, bem como os Thogotovirus recentemente classificados. A estratégia para a produção de vírus de influenza A infecciosos inteiramente a partir de ADNcs clonados descritos na presente memória descriptiva aplicar-se-ia a quaisquer ortomixovírus e, talvez, a outros vírus de ARN segmentados de sentido negativo bem como (por exemplo, *Sunyaviridae*, *Arenaviridae*). A capacidade para manipular o genoma viral sem limitações técnicas apresenta implicações profundas para o estudo dos ciclos de vida viral e a sua regulação, a função das proteínas virais e os mecanismos moleculares da patogenicidade viral.

Exemplo 2

A expressão das proteínas PBS, PBI, PA, e NP do vírus da influenza conduz à replicação e à transcrição de um ARN viral artificial. Para produzir VLPs de influenza, utilizou-se o sistema de ARN polimerase I para a síntese intracelular de ARNs virais de influenza *in vivo* (Figura 7). Neste sistema, um ADNC que codifica um gene repórter numa orientação anti-sentido é flanqueado pelas regiões de não codificação 5' e 3' de um ARN de influenza viral. Inseriu-se esta cassette entre um promotor e um terminador de ARN polimerase I. A transfecção de tais construções de células eucarióticas conduz à transcrição do gene repórter pela ARN polimerase I celular, produzindo deste modo ARNs semelhantes ao vírus da influenza (Neumann et al., 1994). Pela infecção do vírus da influenza, replicaram-se os ARNvs artificiais e transcreveram-se pelo complexo de polimerase viral, do que resulta a expressão do gene repórter.

Para determinar se a expressão das proteínas PB2, PB1, PA e NP conduz à expressão do gene repórter codificado pelo transcrito derivado de ARN polimerase I, transfecaram-se plasmídeos (1 µg de cada) que exprimem a proteína NP do vírus A/WSN/33 (H1N1) sob o controlo do promotor de β-actina de frangos (pCAGGS-WSN-NP/14), as proteínas de polimerase do vírus A/PR/8/34 sob o controlo do promotor de citomegalovírus (pcDNA782 (PB2), pcDNA774 (PB1) e pcDNA787 (PA)), e a construção do gene repórter de ARN polimerase I (pPolI-GFP) em células de rim embriônico humano (293T). Quarenta e oito horas mais tarde, 30%-40% das células estavam a expressar o GFP (Figura 9). Se o contrário, a expressão de GFP não podia ser detectada em células transfecadas às quais faltava a polimerase ou as

proteínas NP. Estes resultados indicam que a NP e as três proteínas de polimerase de influenza viral tinham formado um complexo funcional que replicou a transcreveu o GFP ARNv derivado da ARN polimerase I.

Transcrição e replicação óptimas de ARNv. Para determinar as quantidades de plasmídeo de ADN necessárias para a expressão óptima do GFP repórter, modelou-se a expressão das proteínas de polimerase de NP. Estudos prévios tinham indicado grandes quantidades de PA reduzem a extensão do gene repórter em sistemas de transcrição/replicação (Mena et al., 1996). Por consequência, de uma maneira gradual, reduziu-se a expressão de PA a partir do plasmídeo, identificando 0,1 µg de pcDNA787(PA) como a quantidade de template que conduzia à expressão mais forte de GFP. Com NP, a componente estrutural principal dos complexos de RNP, podem ser necessárias quantidades elevadas de plasmídeo de expressão da proteína. No entanto, quantidades mais elevadas do plasmídeo não afectaram de maneira apreciável o número de células 293T de GFP positivo. Além disso, diversas quantidades de plasmídeos de expressão da proteína PB2 e PB1 (gama compreendida entre 1,0 e 0,03 µg) não afectou a expressão GFP nas células 293T. Deste modo, em todas as experiências subsequentes, utilizaram-se 0,1 µg de pcDNA787(PA) e 1,0 µg de pcDNA774(PB1), pcDNA762(PB2) e pcGFP-N3N-NSP/14.

Formação de VLPs de influenza a partir de ADNs clonados. Estudos prévios com o sistema de T7 ARN polimerase em vacínia mostraram que a formação de VLPs de influenza necessita de nove proteínas do vírus da influenza: PB2, PB1, FA, NA, HA, NP, M1, M2 NS2 (Mena et

al., 1996). A proteína NS1, pelo contrário, é dispensável para a formação da partícula (Mena et al., 1996). Para estabelecer um sistema eficaz actuado pelo plasmídeo para a produção de VLP, produziram-se ADNcs que codificaram os genes HA, NA, M1, M2 e NS2. Clonaram-se os ADNcs no vector de expressão eucariótica pCAGGS/MCS (controlado pelo promotor β -actina de frango), do que resulta pEWSN-HA, pCAGGS-WNA15, pCAGGS-WSN-M1-2/1, pEP24c e pCA-NS2, respectivamente. A expressão de cada proteína foi confirmada pela análise das manchas de Western.

Para produzir VLPs, transfecaram-se 10^6 células 293T com 1,0 μ g de cada plasmídeo de expressão da proteína (com a excepção do pcDNA787(PA), para o qual se utilizou 0,1 μ g), e com 1 μ g da construção do gene repórter pPolI-GFP. Isolaram-se sobrenadantes de cultura 48 horas após a transfecção e misturaram-se com o vírus A/WSN/33 para proporcionar proteínas do vírus da influenza necessárias para a replicação e a transcrição de GFP ARNv. Inoculou-se então a mistura em células MDCK. Dez horas após a incubação, detectaram-se células MDCK GFP positivas, que correspondem a 450 partículas/ml de sobrenadante (Quadro 3). Deste modo, a expressão accionada pelo plasmídeo de todas as proteínas estruturais virais da influenza deram como resultado a formação de VLPs de infecção infecciosos que contêm GFP ARNv. Além disso, libertou-se GFP ARNv nas células MDCK.

Excelente montagem de vírus de influenza. Estudou-se igualmente a formação de VLP nas células que exprimem diferentes quantidades da construção do gene repórter de ARN polimerase I, bem como ADNs do plasmídeo HA, NA, M1, M2 e NS2. Nas experiências com pPolI-GFP, 1,0 μ g do plasmídeo

de ADN foi altamente eficaz na produção de VLPs, enquanto que a eficácia foi significativamente reduzida para 2,0 µg ou 3,0 µg. Visto que as proteínas NS2 e M2 são expressas em pequenas quantidades nos estados avançados da infecção, era provável que quantidades relativamente pequenas dos plasmídeos de expressão fossem necessárias para a formação óptima de VLP. A redução da construção de expressão de M2 a partir de 1,0 µg até 0,3 µg resultou num aumento de mais do que dez vezes do número de células MDCK GFP positivas (Quadro 3). Uma redução ulterior de plasmídeo para 0,03 µg não aumentou o número de VLPs. Para a NS2, quantidades menores de plasmídeo ensaiado (0,1 µg) foram associadas com uma formação menos eficaz de VLPs (Quadro 3).

A proteína M1 constitui o complemento principal estrutural do vírus. Deste modo, níveis elevados da expressão de M1 são provavelmente necessários para a formação eficaz de VLPs. Esta previsão foi ensaiada em experiências que comparam a formação de VLP em células transfectadas com 1,0 µg ou 2,0 µg de plasmídeo M1 do ADN. Conforme se ilustra no Quadro 3, quantidades mais elevadas de plasmídeo deram como resultado um aumento de mais do que dez vezes o número de células MDCK GFP positivas. A comparação de duas quantidades diferentes (1 µg versus 2 µg) de plasmídeos que exprimem as proteínas MA e NA não revelou quaisquer diferenças apreciáveis na formação de VLP, o que conduz à seleção de 1 µg de cada plasmídeo (pEMV22-MA, pCAGG-NA18) para utilização em experiências subsequentes. Na globalidade, estes estudos tiveram como resultado um aumento superior a 100 vezes da eficácia de formação de VLP, conduzindo por último à produção de mais

do que 10^4 partículas de vírus de influenza infecciosos por ml de sobrenadante (Figura 10).

Quadro 3. Quantidades óptimas de ADN plasmidial para a formação de VPLs infecciosos*

Quantidade (μ g) de expressão de ADN em plasmídeos:											Eficácia relativa da formação de VPL
VPL	M1	M2	NA	NP	HA	M1	M2	NS2	GFP	NS3/4	
1,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1
2,0	1,0	0,1	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	28
3,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,63	1,0	1,0	1,0	17
4,0	1,0	0,1	0,5	1,0	1,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	28
5,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	28
6,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	11
7,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	38
8,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	380

* Transfectaram-se as células 293T com plasmídeos de expressão para todas as nove proteínas estruturais do vírus da influenza e com o plasmídeo GFP da ARN polimerase I. Quarenta e oito horas após a transfecção, isolaram-se os sobrenadantes que contêm a VLP, misturaram-se com o vírus auxiliar A/WSN/33 e inocularam-se em células MDCK. Fixaram-se as células 10 horas após a infecção e determinou-se a expressão de GFP com um microscópio de fluorescência. Apenas as quantidades dos plasmídeos M1, M2 e NS2 variaram (letra a negrito) para determinar as suas quantidades óptimas para a expressão de GFP em células MDCK.

† Determinou-se a eficácia relativa da formação de VLP mediante contagem do número de células GFP-positivas nos cinco campos microscópicos. A amostra que contém 1 μ g de cada plasmídeo (que produz 456 VLP infecciosos/ml de sobrenadante) foi escolhida como referência (valor de 1).

Autenticidade de VLPs produzidos inteiramente a partir de plasmídeos. Para verificar os VLPs iniciam a infecção do mesmo modo que os vírus de influenza autênticos,

neutralizaram-se VLPs com um anticorpo para o WCN HA. Incubaram-se os sobrenadantes que contêm VLP derivados de células 293T transfectadas com plasmídeo com uma porção de anticorpos monoclonais WSN HA com um anticorpo monoclonal para a proteína G do vírus da estomatite vesicular (VSV) (controlo negativo) durante 1 hora à temperatura ambiente. Adicionou-se vírus auxiliar A/PR/8/34, o qual não é neutralizado pelo conjunto de anticorpos monoclonais WSN HA, à mistura e inocularam-se em células MDCK. Apenas o anticorpo monoclonal específico anti-WSN-HA neutralizou os VLPs, o que é indicativo de que a HA constitui um mediador da ligação e da entrada de VLPs nas células.

Seguidamente, identificou-se o conjunto mínimo de proteínas necessário para a formação de VLPs. Outros estabeleceram que eram essenciais as três polimerases de vírus da influenza e a NP para a replicação e a transcrição de ARNv (Honda et al., 1988). Por consequência, incluiu-se cada uma destas quatro proteínas, mas omitiram-se consecutivamente HA, NA, M1, M2 ou NS2. A exclusão de qualquer destes plasmídeos não afectou a replicação/transcrição de GFP ARNv em células 293T transfectadas. Os sobrenadantes derivados de células 293T transfectadas a que faltavam as proteínas HA, NA, M1 ou NS2 não promoveram a expressão de GFP nas células MDCK infectadas, o que é indicativo da ausência de VLPs infecciosos. Detectaram-se VLPs infecciosos com a omissão de M2 mas o número foi reduzido (uma redução superior a 500 vezes em comparação com o conjunto completo de proteínas estruturais). Deste modo, todas as proteínas estruturais do vírus da influenza são necessárias para a formação eficaz de VLPs infecciosos, de acordo com os valores resultantes

de estudos do sistema de vírus de vaeínia (Mena et al., 1996).

A glicoproteína VSV pode substituir as proteínas HA e NA na produção de VLPs. Substituíram-se as proteínas HA e NA do vírus da influenza pela proteína VSV G, que funciona na ligação e fusão do receptor. Nas células 293T transfectadas com pPolI-GFP; quantidades óptimas das construções de expressão PB2, PB1, PA, NP, M1, M2 e NS2; e 1 µg da construção VSV-G (pCAGGS-VSV-G), substituição da proteína VSV-G pelas glicoproteínas do vírus da influenza não afectou adversamente a formação de VLP. Pelo contrário, números superiores de células GFP-positivas foram observados de maneira reproduzível quando VSV-G, em vez das proteínas HA e NA, serviu como glicoproteína viral. Deste modo, a proteína VSV G pode ser incorporada de maneira eficaz nos viriões da influenza e pode actuar tal como as proteínas HA e NA na libertação e entrada de vírus.

Um sistema eficaz para a produção de partículas de vírus de influenza infecciosos constituiria uma vantagem na investigação com este vírus e potencialmente na produção de vacinas e de vectores para terapia genética. Contrariamente aos sistemas de vírus de vaeínia existentes, a estratégia de produção de VLP descrita na presente memória descriptiva é altamente eficaz, quer na transfeccão inicial de células como no rendimento de VLPs ($\approx 10^8$ partículas infecciosas/ml de sobrenadante). Além disso, é accionado inteiramente por plasmídeos que exprimem as proteínas do vírus da influenza (isto é, na ausência de quaisquer outras proteínas virais), o que simplifica grandemente a interpretação dos resultados. Uma outra vantagem é a capacidade para estudar os efeitos de mutações letais na formação de viriões,

embalagem, de complexos de RNP, germinação da replicação de vírus e processos de ligação e fusão. Além disso, é provável que o sistema descrito anteriormente funcionasse igualmente bem com outros vírus, por exemplo, paramixovírus e rabdovírus.

As proteínas HA e NA de vírus da influenza podem ser substituídas funcionalmente pela glicoproteína G de VSV. Anteriormente, referiu-se que os vírus da influenza não conseguiram incorporar a proteína VSV G quando proporcionada pelo vírus SV40 recombinante (Naim et al., 1993). Os resultados descritos na presente memória descriptiva sugerem que nem a proteína HA nem a proteína NA são essenciais para a formação de VLPs, muito embora não se possa excluir que estas glicoproteínas desempenham um papel nas interacções com outras proteínas virais, afectando deste modo a estrutura dos víriões, conforme sugerido pelas formas alongadas dos vírus que exprimem as proteínas HAs, Nas, sem calda, ou ambas (Garcia-Sastre et al., 1995; Jin et al., 1994; Jin et al., 1997; Mitnaul et al., 1996).

O sistema baseado no plasmídeo descrito anteriormente pode ser particularmente útil para a libertação do gene terapêutico. Podem preparar-se VLPs que contêm o ARNv que codifica as proteínas necessárias para a transcrição e replicação (isto é, as NP e as polimerases), bem como as ARNv que codifica a proteína de interesse. Estas partículas são infecciosas e podem libertar um gene designado em células alvo, onde seria replicado e transcrito. Dado que estas partículas não contêm um complemento completo de genes virais, elas não podem produzir vírus de progénie infecciosa. Esta característica, conjuntamente com a falta de integração do genoma viral nos cromossomas hospedeiros,

garantiria a segurança biológica da libertação do gene em indivíduos humanos e não humanos. Finalmente, a disponibilidade dos subtipos 15 HA e 9 NA e das suas variantes permitiria a administração repetida de VLPs, ultrapassando deste modo a imunorresistência às proteínas geradas pelo vector, um dos principais obstáculos que se encontram no uso repetido de outros vectores virais, tais como os adenovírus. Um outro benefício do sistema accionado pelos plasmídeos seria realizado em situações que exigem apenas a expressão a curto prazo de proteínas virais, tais como no tratamento do cancro.

Exemplo 3

Pela utilização do sistema Cre-loxP, é possível produzir linhas de células de embalagem para a produção dos vírus deficientes na replicação. Por exemplo, prepara-se um vector de expressão da proteína que contém uma cassette stop de transcrição (por exemplo, pBS302 of Life Technologies, Bethesda, Maryland; e Sauer et al., 1993; Lasko et al., 1992; Pichel et al., 1993; Bolivar et al., 1977; Stuhl et al., 1981; Stuhl, 1985; Fiers et al., 1978), flanqueado por dois sítios *loxP* e um dos genes virais. A transcrição, iniciada na sequência promotora, é bloqueada nos sítios stop de transcrição. Deste modo, o gene viral não é transcrito nem traduzido. Uma célula que é transfetada de maneira estável com um tal vector é infectada com um vírus da influenza a que falta o ARNv que codifica o gene clonado no sistema *loxP*. Este vírus contém igualmente um ARNv adicional que codifica a proteína Cre. Este vírus não é viável em células normais, visto que lhe falta os seus ARNvs. No entanto, na linha de células de embalagem, a proteína Cre é expressa a partir do ARNv tem como

resultado a recombinação no sítio *loxP*, do que resulta a eliminação do sítio stop de transcrição. Deste modo, o(s) gene(s) viral(ais) respectivo(s) & (são) agora transcritos e expresso(s), permitindo que o vírus se amplifique nestas células (Figura 11).

Além disso, preparam-se linhas de células de embalagem que exprimem as proteínas virais tardias (isto é, HA, NA, M1, M2 e NS2) controladas pelo sistema *loxP* (Figura 12). As proteínas HA e NA podem ser substituídas por outras proteínas virais de ligação e de fusão do receptor (por exemplo, as glicoproteínas GP1 e GP2 de Ebola GP, Marburg GP, Bunyaviridae, as proteínas G e/ou F de rabbiovírus e paramixovírus, glicoproteína de togotovírus e as glicoproteínas de vírus de ARN de cordão positivo). Produzem-se partículas semelhantes a vírus que contêm os ARNvs que codificam as proteínas necessárias para a replicação/transcrição (isto é, as proteínas polimerase e NP), um ARNv que codifica o gene de interesse e um ARNv que codifica Cre. Estes ARNvs são acondicionados em partículas semelhantes a vírus nas linhas de células de acondicionamento.

Essas partículas semelhantes a vírus podem ser utilizadas para fins de terapia de vacina e genética visto que (i) não contêm o complemento completo de genes virais e, desse modo, não podem ser formadas partículas de progénie infecciosas, satisfazendo as preocupações rigorosas de segurança; (ii) exprimirão provavelmente as proteínas estranhas para vários níveis; (iii) não exprimem as glicoproteínas virais (HA, NA) que constituem os抗ígenos principais; deste modo, a resposta imune do hospedeiro contra as proteínas virais deve ser limitada.

Referências

- Albo, C., Martin, J., e Portela, A. J. Virol., 70, 9013-9017 (1996).
- Baron, M. D. & Barrett, T. J. Virol., 71, 1265-1271 (1997).
- Bolivar et al. Gene, 2, 95 (1977).
- Bridgen, A. & Elliott, R. M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 15400-15404 (1996).
- Castrucci, M. R. & Kawaoka, Y. J. Virol., 69, 2725-2728 (1995).
- Castrucci, M. R., Bilsel, P. & Kawaoka, Y. J. Virol., 66, 4647-4653 (1992).
- Collins, P. L., Hill, M. G., Carmago, E., Grosfeld, H., Chanock, R. M. & Murphy, B. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 92, 11563-11567 (1995).
- Cozelmann, K. K. & Schnell, M. J. Virol., 68, 713-719 (1994).
- Dunn, E. F., Pritlove, D. C., Jin, H., e Elliott, R. M. Virology, 211, 133-143 (1995).
- Elliott, R. M. Mol. Med., 3, 572-577 (1977).
- Enami, M., Sharma, G., Benham, C. & Palese, P. Virology, 185, 291-298 (1991).
- Enami, M. & Palese, P. J. Virol., 65, 2711-2713 (1991).
- Enami, M., Luytjes, W., Krystal, M. & Palese, P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87, 3802-3805 (1990).
- Fiers et al. Nature, 273, 113 (1978).
- Garcia-Sastre, A. E. P. Palase. Virus Res., 37, 17-47 (1995).
- Garcin, D., Pelet, T., Calain, P., Roux, L., Curram, J. & Kolakofsky, B. EMBC J., 14, 6087-6094 (1995).
- Goto, H., Bethell, R. C. & Kawaoka, Y. Virology, 238, 265-272 (1997).

- Kagen, M., Chung, T.D.Y., Butcher, J.A., e Krystal, M. J. Virol., 68, 1509-1515 (1994).
- He, B., Paterson, R. G., Ward, C. D. & Lamb, R. A. Virology, 237, 249-260 (1997).
- Hoffman, M. A. & Banerjee, A. K. J. Virol., 71, 4272-4277 (1997).
- Honda, A., K. Ueda, K. Nagata, e A, Ishihama., J. Biochem. (Tokyo), 104, 1021-1026 (1988).
- Horimoto, T. & Kawaoka, Y. J. Virol., 68, 3120-3128 (1994).
- Huddleston, J. A. & Brownless, G. G. Nucl. Acids Res., 10, 1029-1037 (1982).
- Jin, H., G.P. Leser e R.A. Lamb. EMBO J., 13, 5504-5515 (1994).
- Jin, H. G.P. Leser, J. Zhang, e R.A. Lamb. EMBO J., 16, 1236-1247 (1997).
- Kato, A., Sakai, Y., Shiota, T., Kondo, T., Nakanishi, M. & Nagai, Y. Genes Cells., 1, 569-579 (1996).
- Keitel, W. A. & Piedra, P.A. in Textbook of Influenza, eds. Nickolson, K. G., Webster, R. G., e Hay, A. (Blackwell, Oxford), pp. 373-390 (1998).
- Kovesdi, I., Brough, D.E., Bruder, J.T. & Wickham, T.J. Curr. Opion. Biotechnol., 8, 583-589 (1997).
- Lasko et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89, 6232 (1992).
- Lawson, N. D., Stillman, E.A., Whitt, M.A. & Rose, J.K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 92, 4477-4481 (1995).
- Leahy, M.B., Dessens, J.T., e Nuttall, P.A. J. Virol., 71, 8347-8351 (1997).
- Leahy, M.B., Dessens, J.T., e Nuttall, P.A. J. Virol., 71, 8352-8356 (1997).
- Leahy, ., Dessens, J.T. Pritlove, D.C. e Nuttall, P.A. J. Virol., 72, 2305-2309 (1998).
- Li, S., Xu, M. & Coelingh, K. Virus Res., 37, 153-161 (1995).

- Luytjes, W., Krytal. M., Enami, M., Parvin, J.D. & Palese, P. Cell, 59, 1107-1113 (1989).
- Mena, I., Vivo, A., Pérez, E. & Portela, A. J. Virol., 70, 5016-5024 (1996).
- Naim, H.Y. e M.G. Roth. J. Virol., 67, 4831-4841 (1993).
- Neumann, G., Castrucci, M.R. & Kawaoka, Y. J. Virol., 71, 9690-9700 (1997).
- Neumann, G., Zobel, A. & Hobom, G. Virology, , 477-479 (1994).
- Niwa, H., Yamamura, K. & Miyazaki, J. Gene, 108, 193-200 (1991).
- Palese, P., Zheng, H., Engelhardt, O.G., Pleschka, S. & Garcia-Sastre, A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 11354-11358 (1996).
- Perez, D.R. & Donis, R.O. Virology, 249, 52-61 (1998).
- Pichel et al. Oncogene, 8, 3333 (1993).
- Pleschka, S., Jaskunas, S.R., Engelhardt, O.G., Zurcher, T., Palese, P. & Garcia-Sastre, A. J. Virol., 70, 4188-4192 (1996).
- Radecke, F. Spielhofer, P. Schneider, H., Kaelin, K., Huber, M., Dotsch, C., Christiansen, G. & Gilleter, M.A. EMBO J., 14, 5773-5784 (1995).
- Schnell, M.J., Mebatsion, T., e Conzelmann, K.K. EMBO J., 13, 4195-4203 (1994).
- Struhl, K. NAR, 13, 8587 (1985).
- Struhl, K. et al. J. Mol. Biol., 152, 553 (1985).
- Subbarao, E.K., Kawaoka, Y. & Murphy, B.R. J. Virol., 67, 7223-7228 (1993).
- Weber, F., Haller, O., e Kochs, G. J. Virol., 70, 8361-8367 (1996).
- Weber, F., Haller, O., e Kochs, G. Arch. Virol., 142, 1029-1033 (1997).

Whelan, S.P., Ball, L.A., Barr, J.N. & Wertz, G.T. Proc.
Natl. Acad. Sei. USA., 92, 8288-8392 (1995).
Yasuda, J. Bucher, D.J. & Ishibama, A. J. Virol., 68, 8141-
-8146 (1994).

Muito embora a memória descritiva anterior da presente invenção tenha sido descrita em relação a formas de realização preferidas da mesma, e muitos pormenores tenham sido indicados para fins de ilustração, será evidente para os peritos na especialidade que a invenção é susceptível de formas de realização adicionais e que alguns dos pormenores descritos na presente memória descritiva podem ser variados consideravelmente sem que haja um afastamento dos princípios básicos da invenção.

Lisboa, 24 de Setembro de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de virus de influenza infecciosos na ausência de um virus auxiliar, que compreende as fases que consistem em:

(a) a introdução em células hospedeiras, na ausência de um virus auxiliar, de uma composição que compreende um grande número de vectores ortomixovírus que compreendem:

(i) um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de PA do vírus de influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(ii) um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de PB1 do vírus de influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(iii) um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de PB2 do vírus de influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(iv) um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de HA do vírus de influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(v) um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de NP do vírus de influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(vi) um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de NA do vírus de influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(vii) um vector que compreende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNc de M do vírus de influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(viii) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um ADNC de NS do vírus de influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(ix) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um segmento de ADN que codifica um polipeptido PA de vírus de influenza e ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(x) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um segmento de ADN que codifica um polipeptido PB1 de vírus de influenza e ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(xi) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um segmento de ADN que codifica um polipeptido PB2 de vírus de influenza e ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(xii) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um segmento de ADN que codifica um polipeptido NP de vírus de influenza e ligado a uma sequência de terminação da transcrição; e

(b) o isolamento dos vírus de influenza infecciosos a partir das referidas células hospedeiras.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1., em que o processo produz pelo menos 1×10^3 pfu (unidades formadoras de placa)/ml de vírus de influenza infecciosos.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1. ou a reivindicação 2., em que o processo comprehende ainda a introdução na célula de:

(xiii) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um segmento de ADN que codifica um

polipeptido de HA de vírus de influenza e ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(xiv) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um segmento de ADN que codifica um polipeptido de NA do vírus de influenza e ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(xv) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um segmento de ADN que codifica um polipeptido M1 de vírus de influenza e ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(xvi) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um segmento de ADN que codifica um polipeptido M2 de vírus de influenza e ligado a uma sequência de terminação da transcrição,

(xvii) um vector que comprehende um promotor ligado de um modo funcional a um segmento de ADN que codifica um polipeptido NS2 de vírus de influenza e ligado a uma sequência de terminação da transcrição.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3., em que o processo produz pelo menos 3×10^4 pfu/ml de vírus de influenza infecciosos.

5. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 4., em que o promotor é um promotor escolhido de entre o grupo que consiste em um promotor de ARN polimerase I, um promotor de ARN polimerase II, um promotor de ARN polimerase III, um promotor de T7 e um promotor de T3.

6. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 5., em que o promotor é um promotor de ARN polimerase I.

7. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 6., em que o promotor é um promotor de ARN polimerase I humano.
8. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 7., em que a sequência de terminação é escolhida de entre o grupo que consiste numa sequência de terminação da transcrição escolhida de entre uma sequência de terminação da transcrição de ARN polimerase I, uma sequência de terminação da transcrição de ARN polimerase II, uma sequência de terminação da transcrição de ARN polimerase III e um ribozima.
9. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 8., em que dois ou mais vectores se encontram fisicamente ligados.
10. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 8., em que dois ou mais vectores se encontram em plasmídeos separados.
11. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 10., que compreende ainda a fase que consiste na introdução de pelo menos uma mutação em um ou mais dos ADNc da proteína PA da influenza, o ADNc da proteína PB1 da influenza, o ADNc da proteína PB2 da influenza, o ADNc da proteína HA da influenza, o ADNc da proteína NP da influenza, o ADNc da proteína NA da influenza, o ADNc da proteína NS da influenza, antes da introdução do vector nas células hospedeiras.

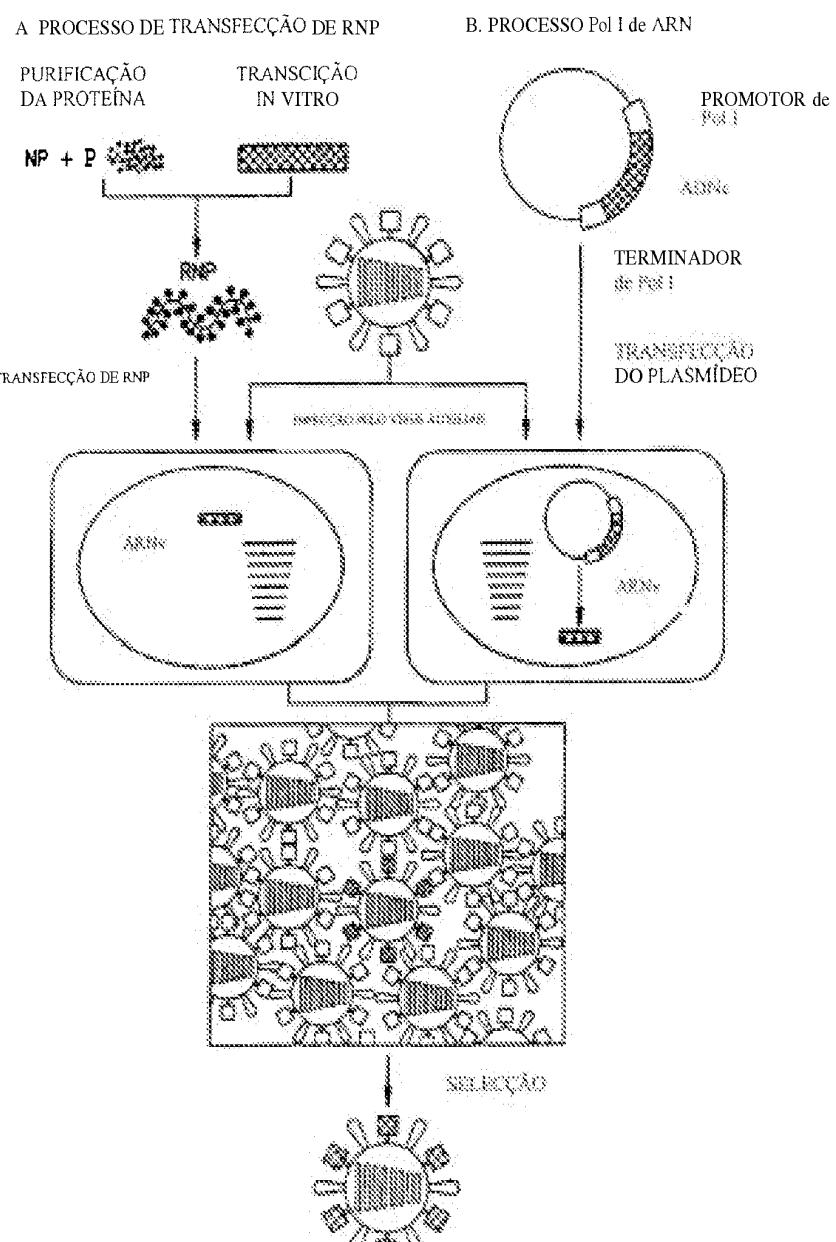
12. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 10., que comprehende ainda a fase que consiste a introduzir pelo menos uma mutação no ADNc da proteína HA da influenza antes da introdução dos vectores nas células hospedeiras.

13. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 12., em que um ou mais vectores comprehende ainda sequências 3' e 5' não codificadoras de um vírus da influenza.

14. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 13., em que um vector codifica um péptido ou uma proteína imunogénicos úteis como vacina.

15. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 14., em que as células hospedeiras são células de mamíferos.

Lisboa, 24 de Setembro de 2007



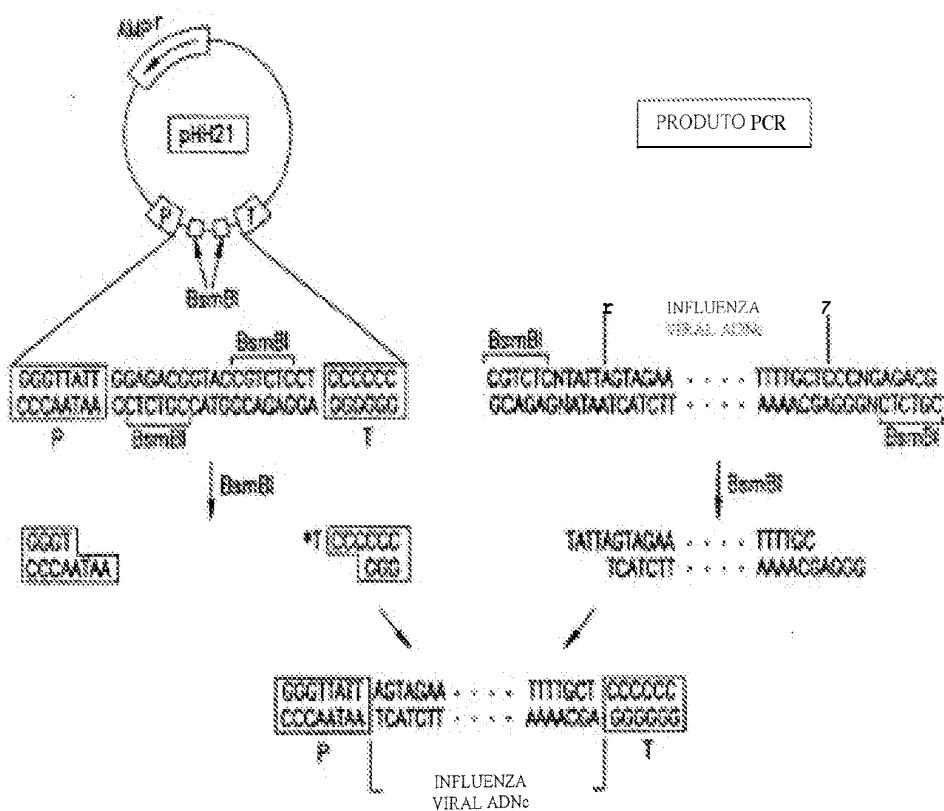


FIG. 2

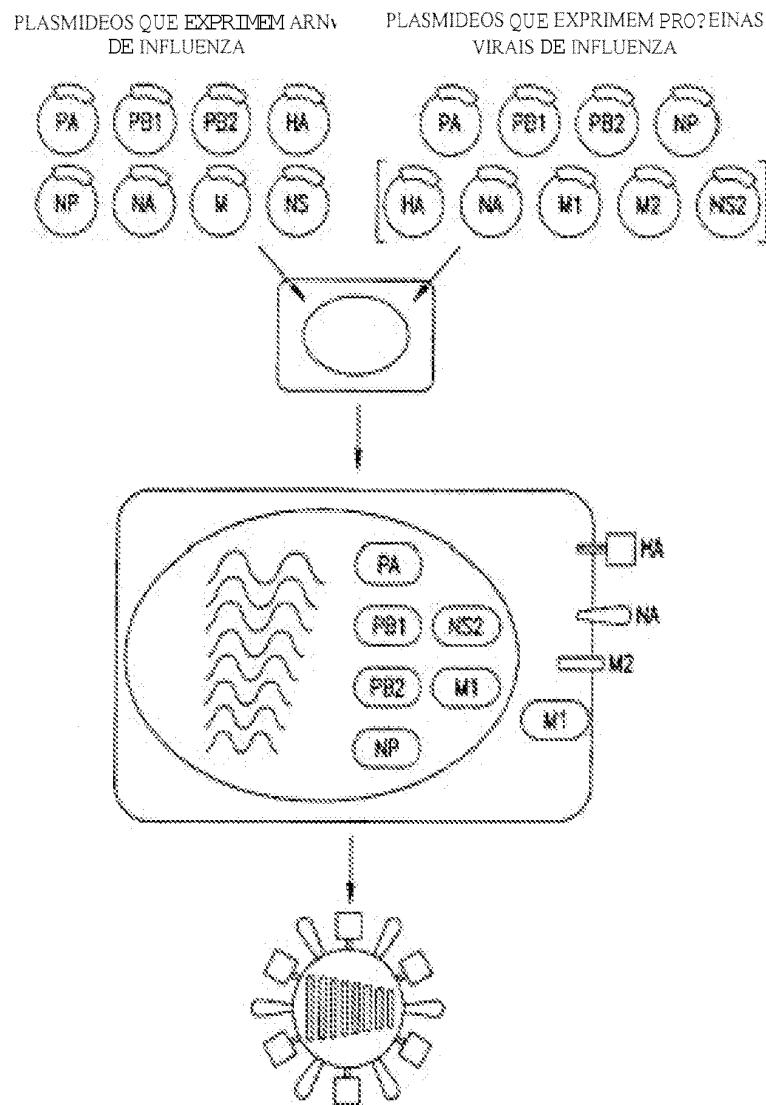


FIG. 3

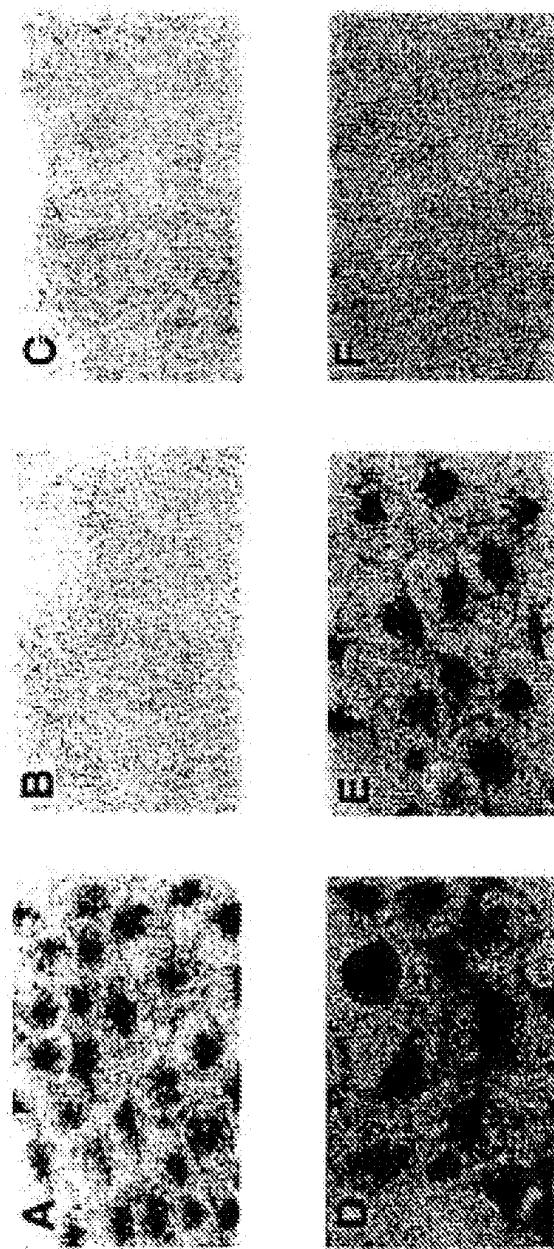
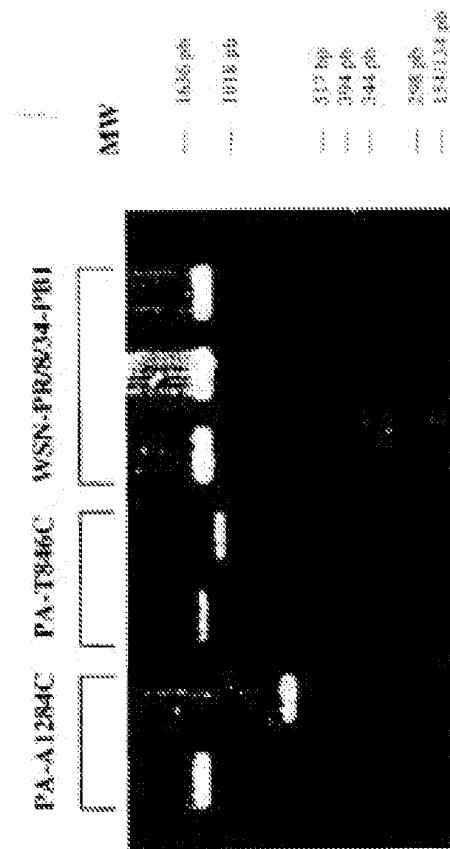


FIG. 4

5/15



1 2 3 4 5 6 7

FIG. 5

6115

PolI-5'WPB2

CAC ACA CGT CTC GTA TTA GAA GAA ACA AGG TCG TTT TTA AAC TAT TCG
ACA CTA ATT GAT CGG CTC CGG AAT TCT TTT CG

Comprimento: 80 nt

Sobreposição: 26 nt

PolI-3'WPB2

CAC ACA CGT CTC CGG GAG CGA AAC CAG GTC AAT TAT ATT CAA TAT CGA
AGG AAT AAA AGA ACT AAC G

Comprimento: 67 nt

Sobreposição: 24 nt

PolI-5'WPB1

CAC ACA CGT CTC GTA TTA GAA GAA ACA AGG CAT TTT TTC ATG AAC GAC
AGG CTA ATT TCA CTA TTT TTC CGG TCT GAG CTC TTC AAT GG

Comprimento: 89

Sobreposição: 26 nt

PolI-3'WPB1

CAC ACA CGT CTC CGG GAG CGA AAC CAG GTC TTT AAT CGA ATT
CAA TCC GAC TTT ACT TTT C

Comprimento: 67 nt

Sobreposição: 27 nt

PolI-5'WPA

CCA ACC CGT CTC CTA TTA GAA GAA ACA AGG TAC TTT TTT GCA CAG TAC
GCA TAG CAA ATA GTA GCA TTC CCA CAA CTA TCT CAA TGC ATG TGT GAG
GAA CGA S

Comprimento: 103

Sobreposição: 25 nt

PolI-3'WPA

CCA ACC CGT CTC CGG GAG CGA AAC CAG GTC ATT CAA ATT CGA AGA
TTT TGT CCG ACA ATG CTT C

Comprimento: 67 nt

Sobreposição: 27 nt

PolI-5'WHA

CAC ACA CGT CTC CTA TTA GAA GAA ACA AGG GTC TTT TTC C

Comprimento: 40 nt

Sobreposição: 22 nt

PolI-3'WHA

CAC ACA CGT CTC CGG GAG CGA AAC CAG CGG AAA AT AAA AAC AAC C

Comprimento: 46 nt

Sobreposição: 29 nt

FIG. 6A

PolI-5'WNPCAC ACA CGT CTC CTA TTA GTA CAA ACA AGG GTC TTT TIC TTT AAA TGC

Comprimento: 47 nt Sobreposição: 30 nt

PolI-3'WNPCAC ACA CGT CTC CGG GAG CAA AAG CAG GGT AGA TAA TCA CTC

Comprimento: 42 nt Sobreposição: 26 nt

PolI-5'WNACAC ACA CGT CTC CTA TTA GTA CAA ACA AGG AGT TTT TTG AAC AAA C

Comprimento: 46 nt Sobreposição: 29 nt

PolI-3'WNACAC ACA CGT CTC CGG GAG CAA AAG CAG GAG TTT AAA TGA ATC CAA ACC

Comprimento: 48 nt Sobreposição: 32 nt

PolI-5'WMCAC ACA CGT CTC CTA TTA GCA CAA ACA AGG TAG TTT TTT ACT CCA GC

Comprimento: 47 nt Sobreposição: 30 nt

PolI-3'WMCAC ACA CGT CTC CCG GAG CAA AAG CAG GTC GAT ATT GAA AG

Comprimento: 41 nt Sobreposição: 26 nt

PolI-5'WNSCAC ACA CGT CTC CTA TTA GCA CAA ACA AGG GTC TTT ATT ATT AAA TAA GC

Comprimento: 53 nt Sobreposição: 36 nt

PolI-3'WNSCAC ACA CGT CTC CGG GAG CAA AAG CAG GGT GAC AAA GAC ACA ATG G

Comprimento: 46 nt Sobreposição: 30 nt

Itálico:

Sequência de reconhecimento BsmBI

Sublinhado:

Sequência do vírus da influenza

Sublinhado + Negrito:

Região que codifica o vírus da influenza

FIG. 6B

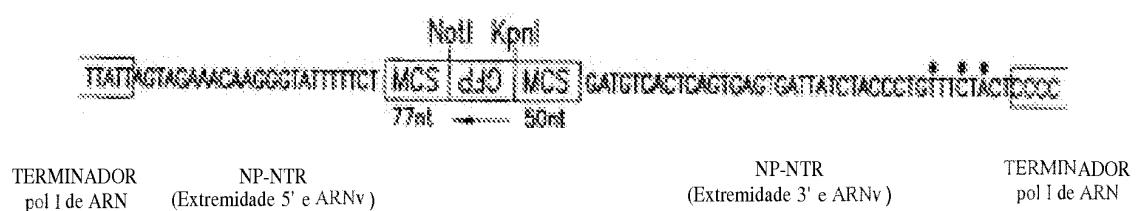
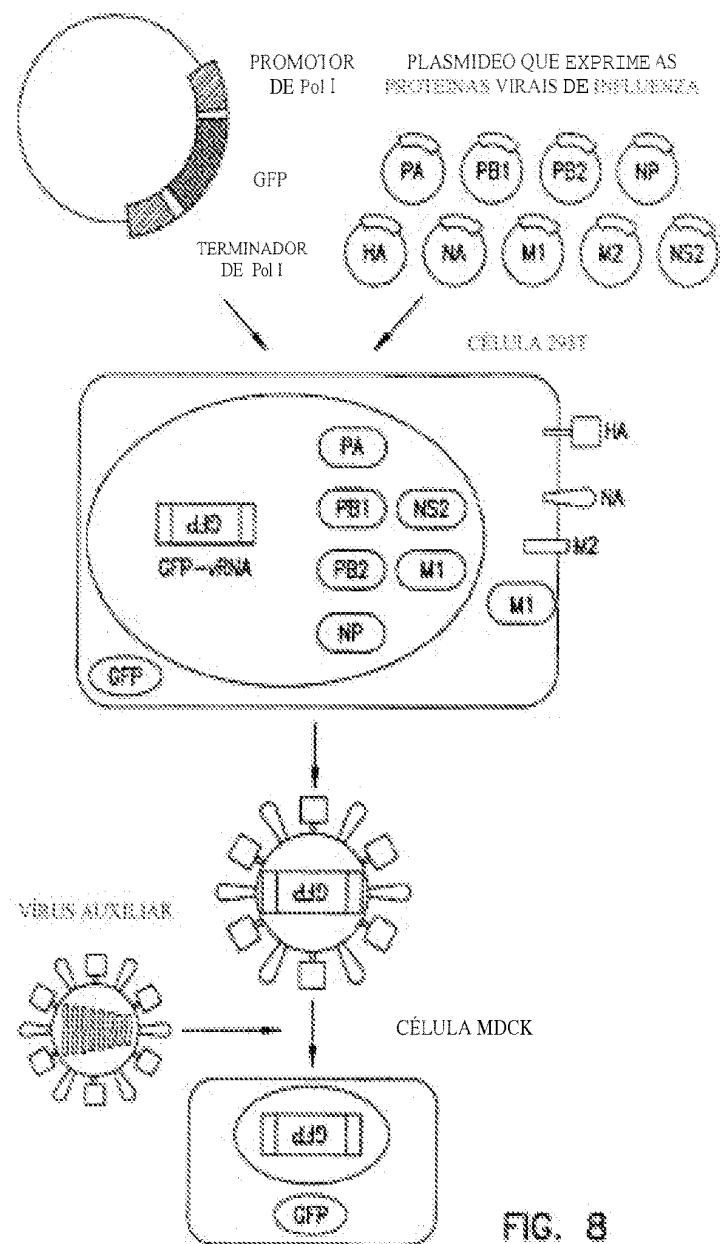


FIG. 7

PLASMÍDEO PARA ARN SEMELHANTE A VIRUS



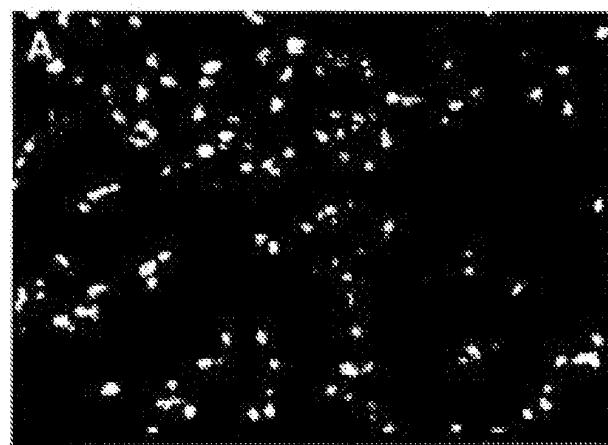


FIG. 9A

11/15



FIG. 96

12/15

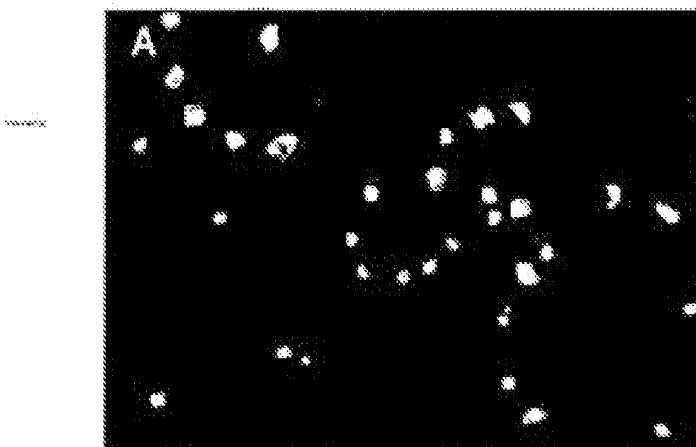


FIG. 10A

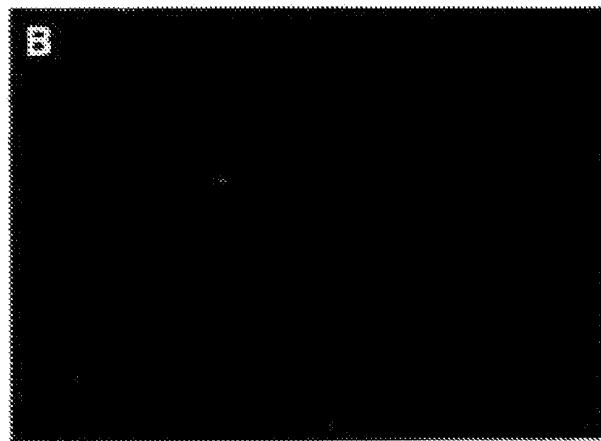


FIG. 10B

PROMOTOR DE β -ACTINA
DE FRANGO

RECOMBINASE CRE

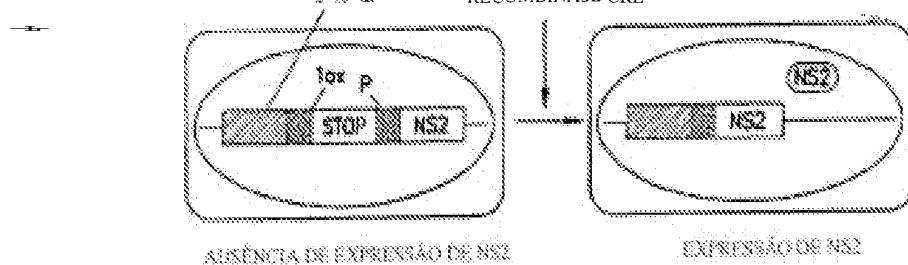


FIG. 11

