DESCRIÇÃO

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 97.159

REQUERENTE: IMPERIAL COLLEGE OF SCIENCE,TECHNOLOGY AND MEDICINE, britânica, Instituição Educacional, University of London, London SW7 2AZ, Inglaterra

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA NOVA VACINA CONTENDO UMA PROTEINA DO ANTIGÉNIO DE SUPERFICIE DA HEPATITE B"

INVENTORES: THOMAS HOWARD CHRISTOPHER e CARMAN WILLIAM FREDERICK

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

29 de Março de 1990 No. GB 9007024.4, no Reino Unido

97.107

IMPERIAL COLLEGE OF SCIENCE,TECHNOLOGY AND MEDICINE

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA PROTEÍNA DO ANTIGÉNIO DE SUPERFÍCIE DA HEPATITE B OU DE UM SEU FRAGMENTO E PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA VACINA"

==========

MEMORIA DESCRITIVA

RESUMO

O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de uma proteína variante de HBsAg ou seu fragmento apresentando a antigenicidade do antigénio de superfície do vírus da Hepatite B, em que a proteína variante ou seu fragmento (vHBsAg) compreende um determinante "a" modificado em que existe um aminoácido diferente de glicina na posição 145 da sequência de HBsAg. O referido processo consiste nos passos de cultura de um hospedeiro transformado com um vector de expressão compreendendo uma sequência de DNA codificadora da referida vHBsAg, num meio de cultura adequado e a purificação da vHBsAg produzida até ao grau de pureza desejado.

O invento diz igualmente respeito a um processo para a preparação de uma vacina compreendendo o vHBsAg, assim como a um equipamento ("kit") para diagnóstico por detecção in vitro de anticorpos anti-vHBsAg e a um processo para a obtenção de uma preparação de anticorpos compreendendo anticorpos anti-vHBsAg.

Esta invento está relacionado com moléculas de DNA recombinante que codificam polipeptídeos com a especificidade de um antigénio viral da hepatite B.

Mais particularmente este invento está relacionado com uma composição de vacina para a estimulação da produção de anticorpos em humanos contra uma variante do vírus da hepatite B.

A infecção com o vírus da hepatite B (HBV), é um problema grave a nível mundial mas existem agora vacinas que podem ser usadas em imunização passiva, por exemplo o produto "Engerix-B" (SmithKline Beecham p.l.c.) que é obtido por técnicas de engenharia genética.

A clonagem de genomas de viriões da Hepatite B dos diferentes serotipos é conhecida; ver Miller et al., Hepatology, 9 (1989) página 322 e referências ali presentes. As partículas de Dane que são viriões da hepatite B e que podem ser isoladas a partir de doentes infectados têm um diâmetro de cerca de 12 nm. Cada uma consiste num invólucro compreendendo o antigénio de superfície da hepatite B (HBsAg), uma cápside (HBcAg), uma polimerase endógena e um genoma de DNA. Um terceiro polipeptídeo, antigénio "e" (HBeAg) é feito pelo vírus da hepatite B e encontra-se no soro numa forma solúvel.

As vacinas que podem ser adquiridas comercialmente contra HBV compreendem antigénio de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) na forma nativa ou na forma recombinante. O autêntico antigénio de superfície do vírus da Hepatite B pode ser removido do plasma de indivíduos infectados como uma partícula de aproximadamente 22nm contendo duas proteínas conhecidas como P24 e o seu derivado glicosilado GP28, ambos são codificados pela sequência codificadora de 226 aminoácidos presente no genoma de

HBV conhecida como a sequ@ncia codificadora da proteína S ou gene S de HBV; ver Tiollais et al., Nature, 317 (1985), página 489 e refer@ncias ali presentes. A sequ@ncia completa de aminoácidos e correspondente sequ@ncia de nucleótidos codificadora de HBsAg estão descritas em Valenzuela et al., Nature, 280 (1979), página 815. O sistema de numeração usado por Tiollais et al., (loc cit.) para definir posiçães de nucleótidos e aminoácidos é também aqui usado.

A inserção das sequ@ncias codificadoras do gene S de HBV sob o controle de promotores de levedura em vectores de expressão para permitir a expressão de HBsAg em S. cerevisiae para a produção de vacinas foi descrita por exemplo por Harford et al. em Develop. Biol. Standard. 54: página 125 (1983), Valenzuela et al., Nature 298, página 347 (1982) e Bitter et al., J. Med. Virol., 25, página 123 (1988). A expressão em Pichia pastoris também foi descrita por Gregg et al., Biotechnology, 5 (1987), página 479 (ver também Pedido de Patente Europeia Publicação Nº 0 226 846) assim como expressão em Hansenula polymorpha (ver EP-A- 0299 108).

As vacinas podem também ser preparadas a partir partículas imunogénicas híbridas compreendendo proteína HBsAg como descrito no Pedido de Patente Europaeia Publicação Nº 0 278 940.

Tais particulas podem conter por exemplo toda, parte ou partes da proteína precursora de HBsAg codificada pela sequ@ncia codificadora que precede imediatamente o gene S de HBV no genoma do HBV, aqui referido como a sequ@ncia codificadora de Pre S. A sequ@ncia codificadora de Pre S codifica normalmente 163 aminoácidos (no caso do subtipo ay do HBV) e compreende uma sequ@ncia codificadora Pre S1 e uma sequ@ncia codificadora Pre S2. Esta última codifica 55 aminoácidos e precede imediatamente a

sequência codificadora da proteína S (ver EP-A-0 278 940 para mais detalhes).

Os subtipos antigénicos de HBV são definidos serologicamente e demonstrou-se serem devidos a alterações de bases isoladas na região do genoma codificadora de HBsAg (Okamoto et al., J. Virol., 1987, 74, 5463-5467). No entanto, todos os subtipos antigénicos conhecidos contêm o determinante "a" consistindo nos aminoácidos 124 a 147 do HBsAg. Anticorpos contra o determinante "a" confere protecção contra todos os subtipos. Demonstrou-se por mutagénese in vitro que na cisteína na posição 147 e na prolina na posição 142 são importantes para apresentação de antigenicidade total do determinante "a" (Ashton et al., J. Med. Virol., 1989, 29, página 196).

Durante a última década foram descritas várias variantes putativas do vírus da hepatite B (HBV).

Mc Mahon et al. descreveram que a substituição de arginina por glicina no domínio putativo de ligação ao anticorpo monoclonal do HbsAg foi encontrado (conforme deduzido pela análise da sequência de DNA) num doente com transplante de fígado tratado com anticorpo monoclonal anti-HBsAg (Cold Spring Harbor Symposium on the Molecular Biology of Hepatitis B viruses, September, 1989). No entanto este resultado não sugere qualquer incentivo para sintetizar uma sequência de aminoácidos variante do HBsAg ou desenvolver uma composição de vacina baseada nela.

Numa outra publicação, encontraram-se crianças e adultos com antigénio de superfície da hepatite B circulante, indicando replicação viral, apesar da presença de anticorpos específicos (anti-HBs) após imunização com uma de duas vacinas da hepatite B autorizadas (Zanetti et al. Lancet, November 1988, página 1132). A análise do HBsAg com anticorpos monoclonais

revelou que o antigénio circulante não é portador do determinante "a" ou que este determinante foi mascarado. Concluiu-se que foi detectado o aparecimento de uma variante do vírus da hepatite B, possivelmente devido a pressão epidemiológica associada a imunização numa área endémica de infecção. No entanto, a variante não foi mais caracterizada.

A partir do trabalho de Zanetti et al., é claro que uma potencial desvantagem com as vacinas da hepatite B presentemente disponíveis é que podem, pelo menos num hospedeiro com uma predisposição imunogenética, causar o aparecimento de um "mutante fugitivo", i.e. um vírus infeccioso que sofreu uma mutação que lhe permite fugir à imunidade neutralizante. Tal vírus variante tem claramente capacidade para causar doenças e pode-se assumir como sendo transmissível. O vírus variante pode portanto dar origem a um problema de imunização grave uma vez que não é eficazmente neutralizado por anticorpos produzidos por vacinas baseadas em HBsAg normal.

O presente invento ultrapassa, ou pelo menos minimiza as desvantagens referidas associadas a vacinas de HBV conhecidas.

De acordo com o presente invento, é proporcionada uma proteína HBsAg ou um seu fragmento apresentando a antigenicidade do antigénio de superfície de HBV, caracterizado por a proteína ou seu fragmento compreender um determinante "a" modificado em que na posição 145 da sequência de HBsAg só exista glicina.

Deve-se entender que o HBsAg variante pode também incluir sequências Pre S caso se pretenda.

A proteína variante HBsAg ou seu fragmento de acordo com o invento é daqui em diante abreviado para vHBsAg.

Será avaliado que o vHBsAg não está numa "forma natural" mas é material sintético ou altamente purificado, sem produtos sanguíneos.

De preferência o vHBsAg do invento corresponde a HBsAg de tamanho completo e é idêntico ao HBsAg normal excepto no que respeita ao resíduo de aminoácido alterado na posição 145.

Preferencialmente o vHBsAg está numa forma altamente purificada, por exemplo num estado de pureza superior a 75%, mais preferencialmente superior a 90% e mais preferencialmente é 95-100% puro.

Num outro aspecto do presente invento é proporcionada uma composição de vacina compreendendo uma quantidade imunoprotectora do vHBsAg juntamente com um veículo adequado.

Outros aspectos do invento são descritos abaixo.

O vHBsAg e vacina do invento podem ser usados para ultrapassar os problemas suscitados pelo aparecimento de um "mutante fugitivo" como definido atrás em que o determinante "a" do HBsAg viral sofreu modificação. Em particular a vacina do invento tem a vantagem de poder ser usado para proteger e evitar o aparecimento ou transmissão de um HBV variante que é definido aqui como tendo um determinante "a" modificado na sequência de aminoácidos de HBsAg em que existe apenas o aminoácido glicina na posição 145.

Assim é igualmente proporcionado um método para a protecção de um humano contra sintomas de doença associadas à infecção com o referido HBV variante, método esse que se

caracteriza pela administração a um humano de uma quantidade segura e eficaz da vacina de acordo com o invento.

Num outro aspecto o presente invento proporciona vHBsAg para usar em terapia, especialmente profiláxia da infecção.

Quando usado para imunizar humanos contra um vírus HBV variante existente será apreciado que a seqüência de vHBsAg na vacina condiz ou é antigenicamente equivalente à seqüência de vHBsAg no vírus HBV variante.

De preferência o aminoácido na posição 145 no vHBsAg do invento é tal que pode ser derivado por uma mutação pontual no codão GGA codificador da glicina na posição 145 no HBsAg normal.

Numa realização preferida do invento o resíduo glicina na posição 145 do HBsAg normal é substituido por um aminoácido mais hidrofílico uma vez que isto resulta numa maior antigenicidade.

Numa realização particularmente preferida do invento a modificação na posição 145 no determinante "a" do HBsAg é a substituição de glicina por arginina, uma vez que como aqui descrito demonstrou-se que esta modificação surge numa variante de HBV isolada clinicamente.

Para descrever o invento mais claramente, é feita referência às figuras que se seguem, em que:

Figura 1 mostra um desenho esquemático de uma parte da seqüência de aminoácidos normal de HBsAg indicando as duas ansas do determinante "a" e o resíduo glicina na posição 145;

Figura 2 mostra um desenho esquemático da sequência de nucleótidos de um HBsAg variante isolado clinicamente, indicando sítios de ligação de iniciadores usados na sequenciação e o codão AGA encontrado nas posições 587-589 resultando numa mutação pontual de G para A na posição 587 na sequência normal;

Figura 3 mostra uma representação esquemática do gene S no plasmídeo pRIT10601 ou pRIT 13438 indicando sítios de ligação a oligonucleótidos para a reacção em cadeia com polimerases (PCR);

Figura 4 mostra uma representação esquemática do plasmídeo pRIT13438;

Figura 5 mostra uma representação esquemática do plasmídeo pNN2deltaEco RI; e

Figura 6 mostra uma representação esquemática do plasmídeo pRIT12775. O poli-ligador 1 em 0,01 é como se segue:Bgl II. Cla I. Hind III. Bam HI. Ava I. Sma I. Ava I. Xho I. Sal I.

Num outro aspecto do invento é proporcionado um processo para a preparação de vHBsAg e da composição de vacina contendo-o.

Preferencialmente, o vHBsAg foi obtido sinteticamente, por síntese peptídica ou mais preferencialmente por técnicas de DNA recombinante.

São bem conhecidos métodos para a construção, manipulação e verificação de moléculas de DNA recombinante e sequências são bem conhecidos. A alteração de glicina para um aminoácido diferente na posição 145 da proteína S normal do HBV (ver Figura 1) para obter o vHBsAg do invento é necessário para alterar o

codão GGA nas posições 433-435 da sequência de nucleótidos do gene S para um codão diferente codificador do aminoácido necessário.

Numa realização particular é preferido alterar o codão GGA mais preferencialmente para AGA ou menos preferencialmente para CGA ou CGC ou CGG ou CGT ou AGG, todos eles tripletos codificadores de arginina.

Existem vários métodos para efectuar a alteração adequada da sequência. Um método adequado é a síntese completa de novo, por química de fosfitos ou de fosforamidetos da sequência codificadora pretendida usando frequências de codões virais ou de leveduras.

A síntese de DNA pode ser conseguida em várias empresas numa base comercial. Um exemplo de tal síntese de genes está descrito por Hayden e Mandecki, DNA 7: p571 (1988) e referências ali presentes.

Um segundo método consiste em clonar num vector de cadeia simples um fragmento de restrição adequado derivado de um vector que já continha o genoma de HBV e depois efectuar mutagénese in vitro específica de sítio como descrito por Botstein e Shortle, Science, 229, p. 1193 (1982). Uma cultura de E. coli K12 estirpe C600 contendo o plasmídeo recombinante pRIT10601 compreendendo um genoma de HBV do subtipo ay clonado em pBR322 foi depositada de acordo com o Tratado de Budapeste na American Type Culture Collection em 2 de Junho de 1982 com o Número de Acesso ATCC 39132. A sequência codificadora do gene S especificando a proteína HBsAg de 226 aminoácidos ou sequências maiores codificadoras de polipeptídeos Pre S podem ser retiradas de tais clones por técnicas de DNA recombinante convencionais.

Um fragmento de restrição adequado é o fragmento XbaI-AccI de 575 pb dentro da região codificadora do gene S do pRIT10601. Sistemas vectores úteis para a mutagénese in vitro podem ser adquiridos comercialmente. O fragmento de gene mutagenizado assim obtido foi re-inserido no gene S.

Um terceiro método é realizar a alteração mutacional pretendida usando tecnologia de reacção em cadeia com polimerase (PCR) como descrito por Ho et al., gene, 77: p51 (1989).

Em cada um dos casos a sequência codificadora de vHBsAg pode ser expressa sob o controle de um promotor adequado em qualquer hospedeiro adequado.

Vectores de expressão compreendendo a sequência de DNA codificadora de vHBsAg são novos e constituem um outro aspecto do presente invento. Os hospedeiros transformados com os referidos vectores de expressão formam ainda um outro aspecto do invento.

Num aspecto preferido S. cerevisiae, Pichia pastoris ou Hansenula polymorpha podem ser usados como hospedeiros e a expressão faz-se sob o controle de um promotor de levedura, como seja o promotor TDH3 de levedura (gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, ver Valenzuela et al., 1982; Bitter et al., 1988, supra) ou PHO5 (Miyanohara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, p. 1, 1983), MOX, FMDH (ver EP-A-0 299 108) e AOX (ver EP-A-0 226 846).

O hospedeiro transformado pode ser cultivado ou fermentado por meios convencionais e o vHBsAg extraído e purificado. A purificação do HBsAg a partir das células de levedura é bem conhecida e pode ser feita segundo qualquer uma das US 4,649,192,

US 4,683,294, US 4,694,074 ou US 4,738,926. A purificação do vHBsAg do invento foi realizada de forma análoga.

Vacinas contendo o vHBsAg foram preparadas por técnicas convencionais e conterão uma quantidade imunoprotectora do vHBsAg preferencialmente em soro fisiológico tamponado e misturado ou adsorvido com qualquer um dos vários adjuvantes conhecidos incluindo hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. Por "imunoprotector" pretende-se significar que é administrada uma quantidade de vHBsAg suficiente para induzir um anticorpo protector ou resposta imune celular para conferir protecção contra o agente infeccioso sem efeitos secundários graves. A quantidade de vHBsAg a ser administrada dependerá da presença de adjuvante e será de uma forma geral entre 1 e 1000 µg de proteína, por exemplo 1 a 200 µg de proteína, mais preferencialmente 5 a 40 µg de proteína. A quantidade e número de doses a serem administradas pode ser determinado em estudos convencionais de gamas de doses envolvendo a observação de títulos de anticorpos e outras respostas em indivíduos.

O vHBsAg pode também ser misturado com outro HBsAg como seja HBsAg normal ou partículas de HBsAg homogéneas ou compostas contendo toda ou parte ou partes dos polipeptídeos PreS1 ou PreS2 para a formulação de vacinas. Ele pode também ser misturado com partículas de HBsAg híbrido portadoras de epítopos de proteínas de outros organismos e com outros imunogénios para formar vacinas bivalentes ou multivalentes. A preparação de vacinas está descrita em "Vaccines", editado por Voller et al., University Park Press, Baltimore, MD, U.S.A., 1978.

O vHBsAg é útil para a inclusão como um reagente imunológico em kits de detecção de infecções por variantes do vírus HBV e similares. Ele pode também ser usado para induzir

anticorpos policlonais e monoclonais por métodos conhecidos, alguns destes anticorpos monoclonais podem ser específicos para o antigénio variante e não reconhecem HBsAg normal.

Assim num outro aspecto do invento é proporcionado um kit para o diagnóstico por detecção in vitro de anticorpos anti-vHBsAg num meio biológico e em particular anticorpos neutralizantes após vacinação, caracterizado por:

a) vHBsAg como aqui definido; e

b) meios adaptados para detectar a reacção antigénio-anticorpo.

Num outro aspecto o invento proporciona uma preparação de anticorpo compreendendo anticorpos anti-vHBsAg para usar na prevenção ou tratamento de infecção por hepatite B em humanos. É também proporcionado um método de tratamento de humanos com uma quantidade eficaz de tal anticorpo anti-vHBsAg para evitar ou tratar a infecção pelo vírus da hepatite B.

O invento será agora ilustrado pelos exemplos que se seguem.

Exemplo 1

Identificação de vírus da Hepatite B variante ("mutante fugitivo")

(a) Métodos

(i) Imunização com vacina HBV

Foi iniciada uma série ensaios da vacina HBV em Itália em 1982. Tomaram parte vários centros, um dos quais, a Quarta Divisão de Doenças Infecciosas no Hospital D. Cotugno em Nápoles, seguiu 1590 pessoas. A região de onde veio a maior parte destes doentes, Campania, tem uma prevalência de HBsAg superior a 5%. Os doentes foram essencialmente crianças portadoras positivas de HBsAg, de duas regiões do Sul de Itália, que foram vacinadas com HB-VAX (Merck Sharp and Dohme) ou HEVAC-B (Pasteur), ambas as vacinas derivadas do plasma. Foram administradas doses de 20 µg da primeira para adultos (10 µg para crianças) nos mese 0, 1 e 6 ou 5µg da última nos meses 0, 1, 2 e 14. Aos bébés foi também dado 0,5 ml de hiperimunoglobulina B (HBIg) (Biagini), preparado pelo processo de fraccionação com etanol de Chon, ao nascimento e com 1 mês de idade. Foram também vacinados uma série de famílias que contacta com os portadores, adultos e crianças.

(ii) Marcadores da hepatite

Amostras de sangue foram testadas para HBsAg, HBeAg, anti-HBe, anti-HBs e anti-HBc usando kits comerciais (Abbott Laboratories). Anti-HBs foi calculado por comparação com uma

curva padrão gerada com um painel de quantificação (Abbott Laboratories). A positividade para HBsAg foi confirmada por novo teste e por neutralização usando o HBsAg Confirmatory Assay (Abbot Laboratories). As neutralizações de HBsAg foram realizadas usando um soro contendo quase exclusivamente anti-a. Os soros de doentes com marcas da replicação viral foram também testados relativamente aos níveis de alanina-aminotransferase (ALT).

(iii) <u>Subtipagem de HBsAg e anti-HBs</u>

A subtipagem de HBaAg foi realizada nos contactos com 5 bébés infectados portadores e 5 crianças infectadas, 6 de 8 dos contactos familiares de adultos infectados e casos AS, AA e AE assim como 2 dos casos adultos. Para subtipagem, esferas revestidas com anti-a, anti-d ou anti-y (Sorin Biomedica) foram incubados durante a noite à temperatura ambiente com soro. Após lavagem com água destilada, adicionou-se 13,2 µCi de anti-HBs de carneiro marcado com ^{125}I, deixou-se 1 hora a 45°C, lavou-se e quantificou-se num contador de cintilação. Uma amostra foi considerada ay quando as contagens obtidas usando anti-a ou anti-y na fase sólida excedeu 2,1 vezes o valor médio do controle negativo (de 7 pessoas saudáveis HBV negativas) e o obtido com as esferas anti-d foi inferior ao valor do controle negativo. As amostras foram consideradas como tendo apenas reactividade y se as contagens foram superiores às do controle negativo quando adicionado a anti-y na fase sólida, mas inferior ao valor do controle negativo quando adicionado a anti-a ou anti-d nas fases sólidas.

A especificidade da reactividade foi confirmada por neutralização com anticorpos monoclonais (Sorin Biomedica). Os soros positivos para HBsAg foram misturados com anticorpo

monoespecífico anti-a, anti-d ou anti-y antes da subtipagem. Como testemunha usou-se um soro contendo um HBsAg refer@ncia.

A subtipagem anti-HBs foi realizada nos casos AS, AA e 2 dos casos adultos, usando uma RIA de sanduíche que emprega um HBsAg recombinante (rHBsAg) de um subtipo na fase sólida e um marcado com iodo radioactivo de um subtipo diferente como sonda. As esferas de polistireno foram revestidas com rHBsAg ad ou ay. Para detectar anti-a, 0,2 ml de soro foi incubado durante a noite à temperatura ambiente com esferas. Após lavagem, as esferas foram incubadas com rHBsAg marcado com iodo radioactivo durante 2 horas a 40°C. Após lavagem, a radioactividade das esferas foi contada. Para o ensaio do subtipo ad, as esferas revestidas com ad foram despistadas com rHBsAg ad marcado e do mesmo modo ay. As amostras com contagens 4 vezes acima da média do controle negativo foram positivos. Os títulos foram expressos como mIU/ml comparado com um painel padrão. A percentagem de anti-a num soro foi determinada calculando a anti-a relativamente a anti-ad ou anti-ay vezes 100.

(iv) <u>Doentes para estudos de sequenciação</u>

Um portador positivo para HBsAg, HBeAg e anti-HBc (doente IE) com um ALT de 105 deu à luz uma criança do sexo masculino (AS) em 5 de Março, 1983. O pai era anti-HBc e anti-HBs positivo. Na altura do nascimento e 1 mês mais tarde foi administrado ao bébé 1,5 ml de HBIg e ele foi vacinado com HB-VAX (MerckSharp and Dohme) aos 3 meses, 4 meses e 9 meses de idade. Para estudos de sequenciação, escolheram-se soros da mãe na altura do nascimento, da criança aos 11 meses de idade (HBsAg, HBeAg e anti-HBc positivos; anti-HBs 420 mIU/ml; ALT 120) e 5

anos mais tarde (HBsAg e HBeAg positivos, anti-HBs negativo; ALT 36). Foram também sequenciados os soros de 4 portadores italianos HBeAg positivos escolhidos ao acaso não evolvidos no estudo e de 3 doentes HBsAg positivos ingleses.

(v) PCR e sequenciação directa

50 µl de soro foi digerido em acetato de sódio 25 mM, 2,5 mM EDTA, 0,5% SDS e 1 mg/ml de proteinase K (Boehringer Mannheim), num volume de 200 µl durante a noite a 37°C. Após 2 extracções com fenol/clorofórmio e 2 com clorofórmio, o DNA foi precipitado com etanol e o sedimento lavado com etanol a 70%. O sedimento foi ressuspenso em 20 µl de água. PCR foi realizada em 10 µl do DNA com 300 pmoles de cada um dos iniciadores BSC2 e BSC4 usando o método de Carman et al., Lancet, 1989, ii, 588-591. Na Figura 2 são apresentados a sequência alvo, sítios de ligação ao iniciador e sequências de iniciador.

Após electroforese em gel de agarose de 10 µl da reacção para confirmar a presença de DNA amplificado, o restante foi passado numa coluna de Sephadex G-50 (Pharmacia)e precipitado com etanol. Após 3 lavagens com etanol a 70%, o sedimento foi ressuspenso em 20 µl de água. Entretanto, 10 pmoles do iniciador de sequenciação BCS3 foi marcado nos extremos num tampão convencional com 10 µCi de gama-^{32}P-ATP usando 10 ° de polinucleótido--cinase (Boehringer Mannheim) num volume final de 20 µl. O iniciador de sequenciação não foi purificado em coluna após marcação.

4 µl do DNA foi adicionado a 4 µl de BCS3 marcado na presença de 2µl de tampão 5x, conforme fornecido no Kit Sequenase

(United States Biochemicals), aquecido até 95°C e arrefecido lentamente até 50°C. As recomendações do fabricante foram seguidas exceptuando as misturas de terminação que foram diluidas com um volume igual de água. As reacções foram sujeitas a electroforese num gel de 5% Sequagel (National Diagnostics) poliacrilamida-ureia.

(vi) Gráficos de Hidrofobicidade

Os aminoácidos 139 a 147 do determinante "a" do HBsAg normal e mutante foram analisados usando software Prosis (Pharmacia).

(b) Resultados

(i) Estudos de subtipagem

Dos 1590 vacinados, 44 (2,8%) desenvolveram HBsAg, de entre estes 12 mostraram reactividade fraca e nenhuma outra marca de HBV. Obtiveram-se detalhes de 18 destes doentes: 5 crianças nasceram de mães portadoras, 5 crianças familiares em contacto e 8 adultos familiares em contacto.

O subtipo de HBV foi determinado como sendo ay em todos os contactos dos bébés e crianças infectadas e em 6 de 8 (todos eles testados) dos contactos de casos adultos. A encontrou-se que a mãe do caso AS era ay em duas ocasiões, a primeira vez dois meses após o parto. O doente AS mostrou-se fracamente positivo para o subtipo y aos 12 e 18 meses de idade ay positivo aos 46

meses, 6 meses após a anti-HBs tornou-se indetectável. O caso AA aos 2 anos de idade após o começo da vacinação, caso AE 9 meses após e todos os casos de adultos (24 e 28 meses após imunização) foram y positivos apenas.

Os resultados foram confirmados usando reagentes monoclonais. Todos os casos com soros contendo y foram neutralizados com anti-y mas não anti-a.

A subtipagem de anti-HBs revelou que 50-70% dos anticorpos eram anti-a. No doente AS, aos 6 meses de idade e posteriormente, cerca de 90% eram contra o determinante a.

(ii) Sequenciação do determinante "a"

O doente AS, através de sequenciação, mostrou-se ter uma única mutação de guanosina para adenosina (G para A) na posição 587 (numerado desde o sítio único EcoRI do genoma de HBV), resultando numa substituição de aminoácido de glicina para arginina no aminoácido 145 de HBsAg. Esta alteração é estável uma vez que estava presente tanto na idade de 11 meses como na idade de 5 anos. A mãe, IE e os doentes testemunha tinham glicina nesta altura no epítopo, tal como em todas as sequências publicadas até à data. A sequência do determinante a era igual nos doentes AS e IE e a mesma dos anteriormente publicados.

(iii) Gráficos de hidrofobicidade

Determinou-se a hidrofobicidade relativa da segunda ansa do determinante a do HBsAg normal e da do paciente AS. Usando o método de Kyte e Doolittle, J. Mol. Biol. 1982, 157, 105-132, o índica médio de hidrofobicidade para a segunda ansa mudou de -1,3 para -1,9 e de -0,5 para 0,9 usando o método de Hopp e Woods (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1981, 78, 3824-3828).

Exemplo 2

Construção de uma seqüência codificadora do gene S variante do serotipo ay contendo substituição de gli para arg na posição de aminoácido 145

Sintetizaram-se quatro oligonucleótidos iniciadores, BC17, BC144, BC145 e BC146, tendo as seqüências mostradas abaixo, por química de fosforamidetos convencional num sintetizador de DNA Biosearch 8600 segundo as instruções do fabricante.

BC17	5'	GTCTAGACTCGTGGTGGACT	3'
BC144	5'	TTGGAATTCGTTAAATGTATA	3'
BC145	5'	CTTCGGACAGAAATTGCACCT	3'
BC146	5'	AGGTGCAATTTCTGTCCGAAG	3'

Estes oligonucleótidos têm homologia com a seqüência ay do gene S em pRIT10601 como se mostra na Figura 3 e foram usados como iniciadores para extensão com nucleótidos pela polimerase Taq com o gene S ay como molde. Os tripletos sublinhados AGA e TCT em BC145 e BC146 codificam a substituição pretendida arg145. Ainda a seqüência GAATTCG em BC144permite a introdução de um sítio de restrição EcoRI num par de bases distal relativamente ao codão de terminação da seqüência codificadora do gene S. A reacção PCR foi realizada como especificado pelo fabricante (Perkin Elmer Cetus) usando pRIT10601 ou o plasmídeo pRIT13438 apresentado na Figura 4 como molde. pRIT13438 é um vector E. coli convencional contendo uma seqüência codificadora completa do gene S ay derivada do pRIT10601 e flanqueada por sítios de restrição

EcoRI e BglII introduzidos por manipulação in vitro. Cerca de 1 a 10 ng do DNA molde foi misturado com 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,01% (p/v) de gelatina, dATP, dGTP, dCTP e dTTP 200 µM cada, 1 µM de cada um dos iniciadores pretendidos e 2,5 unidades da polimerase Taq num volume final de 100 microlitros. Foram estabelecidas duas reacções separadas, uma contendo BC17 e BC146 com o molde, a outra contendo BC144 e BC145 com o molde.

As duas misturas foram sujeitas a 25 ciclos de desnaturação (2 min, 94°C), emparelhamento (2 min, 48°C) e extensão (2 min, 72°C) seguido de um ciclo com um tempo de extensão de 15 minutos a 72°C usando um DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus, adquirido à Van der Heyden, Brussels, Belgium). A presença do fragmento amplificado pretendido em cada uma das misturas foi verificado por electroforese convencional em gel de agarose e os fragmentos foram purificados por passagem através de colunas Centricon 100 (Amicon Division, W.R. Grace e Co. adquirido à Van der Heyden, Brussels, Belgium). Cerca de 1 a 10 ng de cada fragmento amplificado foi misturado numa só reacção com os iniciadores BC17 e BC144 e amplificado exactamente como descrito atrás excepto a reacção de emparelhamento ter lugar a 60°C.

Os oligonucleótidos iniciadores BC90 e BC153 tendo as sequências mostradas abaixo podem também ser usados em vez de BC17 e de BC144.

BC90 5' ATGGAGAACATCACATCAGCATTCCTAGGA 3'
bc153 5' TTGGAATTCGTTAAATGTATACCCAAAGACAAAA 3'

BC90 tem homologia com o extremo 5' da sequência do gene 8 ay começando no codão de iniciação. BC153 sobrepõe-se a BC144.

Estabeleceram-se misturas de reacção PCR, contendo uma BC90 e BC146 juntamente com DNA de pRIT13438 como molde e outros ingredientes como detalhado atrás e a outra BC145 e BC153 juntamente com pRIT13438 como molde e outros ingredientes como detalhado atrás. As duas misturas forma então sujeitas a 25 ciclos de desnaturação (2 min. 94°C) emparelhamento (2 min., 48°C) e extensão (2 min., 72°C) para permitir a amplificação. O fragmento pretendido de 445 pb da amplificação BC90/BC146 e o fragmento de 267 pb da amplificação BC145/BC153 foram purificados por electroforese em gel de poliacrilamida e electroeluição.

Cerca de 10 ng de cada fragmento foram então misturados e sujeitos a 25 ciclos de amplificação PCR na presença dos oligonucleótidos BC90 e BC153 nas mesmas condições de reacção como descrito atrás. O fragmento amplificado resultante com cerca de 690 pb foi recuperado e contem sítios de reconhecimento únicos para as endonucleases XbaI e EcoRI.

A utilização destes oligonucleótidos iniciadores específicos, molde gene S ay e reacção PCR resulta na produção de um fragmento variante de 590 pb S-ay tendo a substituição arg145 e extensões 5' XbaI e 3' EcoRI. O fragmento pretendido é purificado de preferência dos iniciadores e outros produtos da reacção PCR por passagem através de uma coluna Centricon 100. O fragmento foi então substituido por técnicas convencionais de clonagem pelo correspondente fragmento XbaI-EcoRI de uma sequência codificadora viral normal de preferência fundida com um promotor de levedura. Um vector adequado para este fim é pNN2deltaEcoRI mostrado na Figura 5 onde uma sequência codificadora de S serotipo ad foi fundida com o promotor TDH3 de levedura e está a montante do terminador da transcrição ARB3 de levedura para formar uma cassete de expressão. A construção e utilização de tais cassetes de expressão estão descritas em EP-A-0 278 940. Será facilmenta

avaliado pelos familiarizados com a matéria que qualquer vector adequado deste tipo pode ser empregue dependendo dos fragmentos promotor e terminador da transcrição seleccionados para controlar a expressão na espécie de levedura escolhida como hospedeiro. Ainda, outros sítios de restrição poderão ser introduzidos no extremo 3' do fragmento variante usando iniciadores diferentes de BC144. Será ainda avaliado que todas as diferenças de nucleótidos resultando em alterações de aminoácidos entre isoldos de HBV conhecidos dos serotipos adw e ayw residem a jusante do sítio XbaI de tal forma que a substituição em pNN2deltaEcoRI do fragmento variante XbaI-EcoRI obtido por PCR resulta numa sequência codificadora de ay.

Cerca de 1,5 µg do fragmento de 690 pb resultante das reacções PCR com BC90, BC153, BC145 e BC146 descritas atrás foi digerido com as endonucleases XbaI e EcoRI e cerca de 0,15 µg do fragmento digerido foi misturado e ligado com cerca de 50 ng do vector pRIT12642 que foi previamente digerido com as endonucleases de restrição XbaI e EcoRI e desfosforilado. pRIT12642 é exactamente idêntico ao vector pNN2deltaEcoRI mostrado na Figura 5. A partir da mistura de ligação, recuperou-se um plasmídeo e identificou-se como pRIT13555 que contem o fragmento XbaI-EcoRI portador da sequência codificadora de S modificada inserida entre os sítios XbaI e EcoRI do vector pRIT12642, de modo a formar uma cassete de expressão onde a sequência variante codificadora de ay está situada 3' relativamente ao promotor TDH3 e sob o controle deste.

A cassete de expressão vHBsAg resultante obtida como descrito atrás foi retirada do plasmídeo derivado pNN2deltaEcoRI como um fragmento de 2,89 Kb por digestão com as endonucleases BglI e SalI e inserido em qualquer vector escolhido para introdução em levedura. Um vector de multicópias adequado para S.

cerevisiae é pRIT12775 apresentado esquemáticamente na Figura 6 o qual contem um poli-adaptador inserido entre os sítios EcoRI e SalI no replicão do pBR327 e que foi construido por técnicas convencionais de amnipulação de DNA usando fragmentos de DNA conhecidos. O fragmento cassete BglII-SalI de 2,9Ø do pRIT13555 foi obtido por digestão com endonucleases de restrição e inserido entre os sítios BglII e SalI do plasmídeo pRIT12775 por técnicas de clonagem convencionais para formar o plasmídeo pRIT13557. Caso se pretenda integrar a cassete no genoma de levedura é preferido um vector integrativo como os descritos em Jacobs et al., Gene, 8Ø, página 279 (1989). Quando se procede à inserção da cassete de expressão vHBsAg em pRIT12775 as células de levedura de um mutante deficiente em leucina 2 são transformadas pelo método de Ito et al, J. Bacteriol. 153: p163 (1983) com selecção de transformantes independentes de leucina. Uma estirpe recipiente adequada com uma dupla mutação leu2 é a estirpe DC5 depositada segundo o Tratado de Budapeste na American Type Culture Collection em 2 de Junho, 1982 com o número de acesso ATCC 2Ø63Ø.

Uma outra estirpe adequada é um derivado $cir^{Ø}$ do DC5 que foi depositada de acordo com o Tratado de Budapeste na American Type Culture Collection em 1Ø de Agosto, 1984 com o número de acesso ATCC 2Ø82Ø. A estirpe DC5 $cir^{Ø}$ foi transformada com DNA de pRIT13557 pelo método de Ito et al. referido atrás com selecção de colónias independentes de leucina. Uma colónia transformante foi repicada e subcultivada para estabelecer a estirpe identififcada como Y1648.

Uma cassete de expressão portadora da sequência codificadora de vHBsAg pode também ser usada para transformar células hospedeiras de S. cerevisiae, H. polymorpha ou P. pastoris as quais são portadoras de outras cassetes de expressão de modo a

formar partículas de HBsAg compostas que contêm uma mistura de duas ou mais espécies polipeptídicas.

Usaram-se técnicas de clonagem convencional para construir uma cassete de expressão de 2,78 Kb consistindo no promotor TDH3 de levedura, a sequência codificadora do gene S do subtipo ay derivada do pRIT10601 e o fragmento terminador ADR3 de levedura. Esta cassete foi então inserida entre os sítios BglII e SalI do pRIT12775 para formar pRIT13558. pRIT13558 foi então introduzido por transformação, usando a técnica de Ito et al. referida atrás, da estirpe recipiente DC5 cir^{0} com selecção de independência relativamente a leucina. Uma colónia transformante foi repicada e subcultivada para estabelecer a estirpe identificada como Y1654.

A estirpe Y1654 expressa HBsAg do subtipo ay que é útil como controle quando se investiga as propriedades do vHBsAg do presente invento.

Subclonagem e expressão de partículas do subtipo 2y em levedura usando pRIT10601 como material de partida e o promotor ADR3 de levedura foi descrita por De Wilde et al., em Devel. Biol. Standard. 59, 99-107 (1985).

Culturas de Y1648 e Y1654 foram cultivadas e o HBsAg extraído e medido nos extratos celulares brutos por radioimunoensaio AUSRIA (Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois, U.S.A.). Os resultados do ensaio das duas culturas Y1648 e Y1654 estão apresentados abaixo.

ESTIRPE	NÚMERO DA CULTURA	PROTEíNA (g/l cultura)	HBsAg por AUSRIA (g/l cultura)	HBsAg como percentagem de proteína
Y1648	C1316	23.42	0,0115	0,049
	C1324	27.30	0,0131	0,05
Y1654	C1332	20,12	0,127	0,63
	C1336	26,09	0,136	0,52

A estirpe Y1648 produz cerca de 10 vezes menos material reactivo aparente em AUSRIA comparado com a estirpe Y1654. A transfer@ncia Western de extractos celulares brutos usando o anticorpo monoclonal HBS1 (SmithKline Beecham Biologicals, Rixensart, Belgium), reconhecendo o polipeptídeo do antigénio de superfície de HBV reduzido, mostrou que Y1648 produziu aproximadamente a mesma quantidade de proteína reactiva com HBS1 tendo um peso molecular de 24 K tal como Y1654.

Métodos para a cultura de células de levedura, extracção e ensaio de HBsAg e transfer@ncias Western podem ser encontrados em EP-A-0 278 940 e EP-A-0 414 374 ambos sendo aqui incorporados como refer@ncia.

O material do antigénio de superfície foi purificado a partir de extractos celulares de Y1648 e Y1654 por métodos convencionais de acordo com as Patentes US 4, 649, 192 e 4, 683, 294 referidas atrás.

As preparações consistiram em proteína substancialmente pura do antigénio de superfície de HBV conforme analisado por SDS-PAGE e coloração com prata que revelou bandas isoladas fortes da proteína 24K juntamente com vestígios de dímeros e multímeros.

Duas preparações de HBsAg derivado de levedura da estirpe Y1654 deram razões AUSRIA/proteína de 1,64 e 2,79 enquanto que duas preparações de vHBsAg da estirpe Y1648 deram razões AUSRIA/proteína de 0,1 e 0,13.

vHBsAg purificado da estirpe Y1648 foi examinado por microscopia electrónica após coloração com acetato de uranilo. O material mostrou a presença de partículas esféricas típicas do antigénio de superfície de HBV.

Exemplo 3

Preparação de uma composição de vacina

A uma solução aquosa tamponada estéril de 3% de hidróxido de alumínio em fosfato de sódio 10 mM, 150 mM NaCl, pH 6,8, adicionou-se o vHBsAg do Exemplo 2 num tampão semelhante com agitação constante para uma concentração final de 5 a 40 µg de proteína e 0,5 mg por ml de alumínio (Al^{3+}). Adicionou-se então Timerosal (mertiolato de sódio) para uma concentração final de 1 em 20 000 (p/v) como preservativo.

A vacina é adequada para administração parenteral a humanos.

REIVINDICAÇÕES

1ª. - Processo para a preparação de uma proteína do antigénio de superfície da hepatite B ou seu fragmento apresentando a antigenicidade do antigénio de superfície de HBV, em que a referida proteína ou seu fragmento (vHBsAg) compreende um determinante "a" modificado em que o resíduo de glicina na posição 145 da sequência de HBsAg, é substituído por um aminoácido mais hidrofílico, caracterizado por compreender os passos de cultura de um hospedeiro transformado com um vector de expressão compreendendo uma sequência de DNA codificadora da referida vHBsAg, num meio de cultura adequado e a purificação da vHBsAg produzida até ao grau de pureza desejado.

2ª. - Processo de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por se preparar uma vHBsAg em que o aminoácido na posição 145 pode ser derivado por uma mutação pontual no codão GGA codificador da glicina na posição 145 no HHsAg normal.

3ª. - Processo de acordo com a Reivindicação 1 ou com a Reivindicação 2, caracterizado por se preparar uma vHBsAg que é idêntica à proteína HBsAg S normal excepto no que respeita o resíduo de aminoácido alterado na posição 145.

4ª. - Processo de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 3, caracterizado por se preparar uma vHBsAg em que a modificação na posição 145 é a substituição de glicina por arginina.

5ª. - Processo de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 4, caracterizado por se preparar uma vHBsAg que está mais de 75% pura.

6ª. - Vector de expressão, caracterizado por compreender uma sequência de DNA codificadora de uma vHBsAg de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 4.

7ª. - Hospedeiro, caracterizado por ter sido transformado com o vector da Reivindicação 6.

8ª. - Processo para a preparação de uma composição de vacina, caracterizado por se incluir na referida composição uma quantidade eficaz de uma vHBsAg conforme preparada de acordo com a Reivindicação 5, misturada com um veículo ou adjuvante adequado.

9ª. - Método para a protecção de humanos contra doenças associadas a HBV, caracterizado por compreender a administração de uma vHBsAg de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 5, sendo a gama de dosagem da proteína de 1 a 1000 mcg, de preferência de 1 a 200 mcg.

10ª. - Equipamento ("kit") para o diagnóstico por detecção in vitro de anticorpos anti-vHBsAg num meio biológico, caracterizado por o referido equipamento compreender:

(a) vHBsAg de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 5; e

(b) meios adaptados à detecção da reacção de antigénio-anticorpo.

11ª. - Processo para a obtenção de uma preparação de anticorpo, caracterizado por se incorporar na referida preparação anticorpos anti-vHBsAg para usar na prevenção ou tratamento da infecção por hepatite B em humanos.

Lisboa, 27 de Março de 1991

J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º
1200 LISBOA

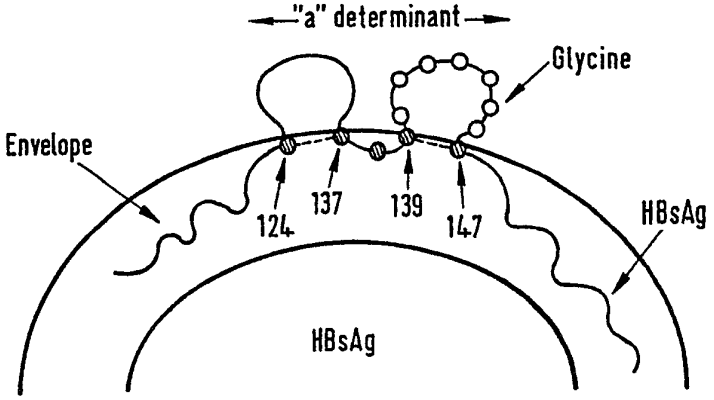
"a" determinant
Glycine
Envelope
124
137
139
147
HBsAg
HBsAg

Fig.1

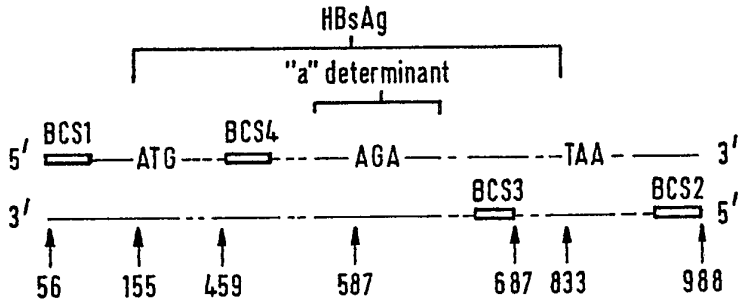
HBsAg
"a" determinant
BCS1
BCS4
5'
ATG
AGA
TAA
3'
BCS3
BCS2
3'
5'
56
155
459
587
687
833
988

Fig.2

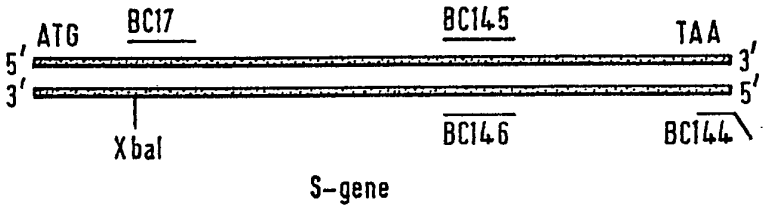
ATG
BC17
BC145
TAA
5'
3'
3'
5'
XbaI
BC146
BC144
S-gene

Fig.3

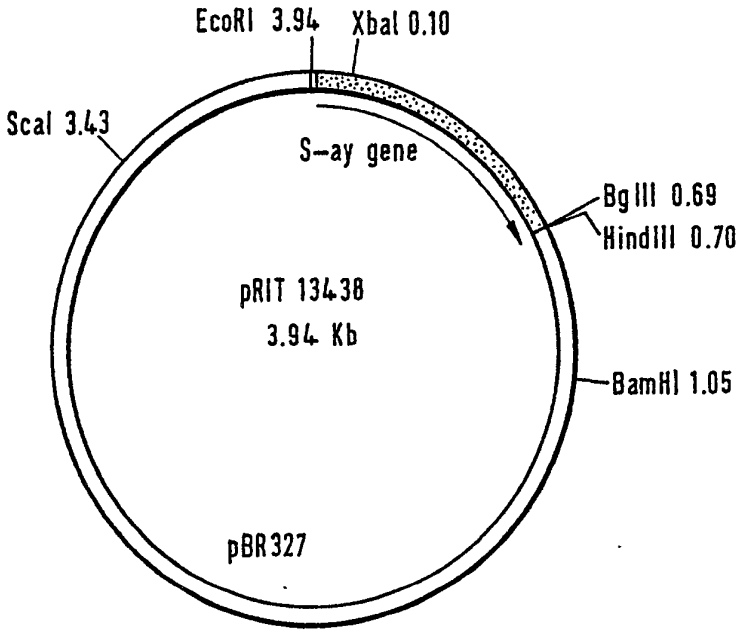
EcoRI 3.94
XbaI 0.10
ScaI 3.43
S-ay gene
BglII 0.69
HindIII 0.70
pRIT 13438
3.94 Kb
BamHI 1.05
pBR327

Fig.4

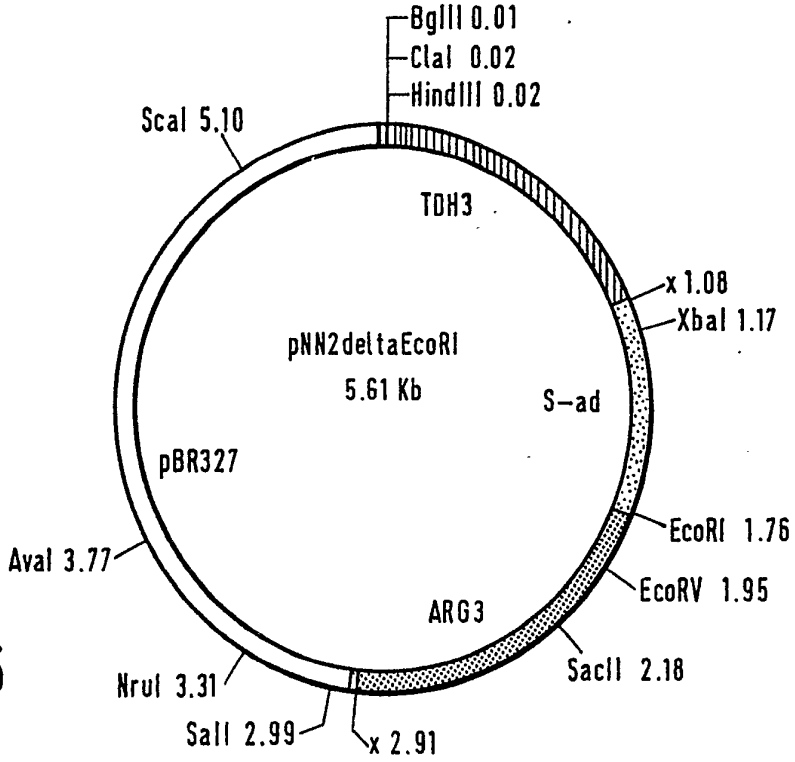
BglII 0.01
ClaI 0.02
HindIII 0.02
ScaI 5.10
TDH3
x 1.08
XbaI 1.17
pNN2deltaEcoRI
5.61 Kb
S-ad
pBR327
EcoRI 1.76
EcoRV 1.95
AvaI 3.77
ARG3
SacII 2.18
NruI 3.31
SalI 2.99
x 2.91

Fig.5

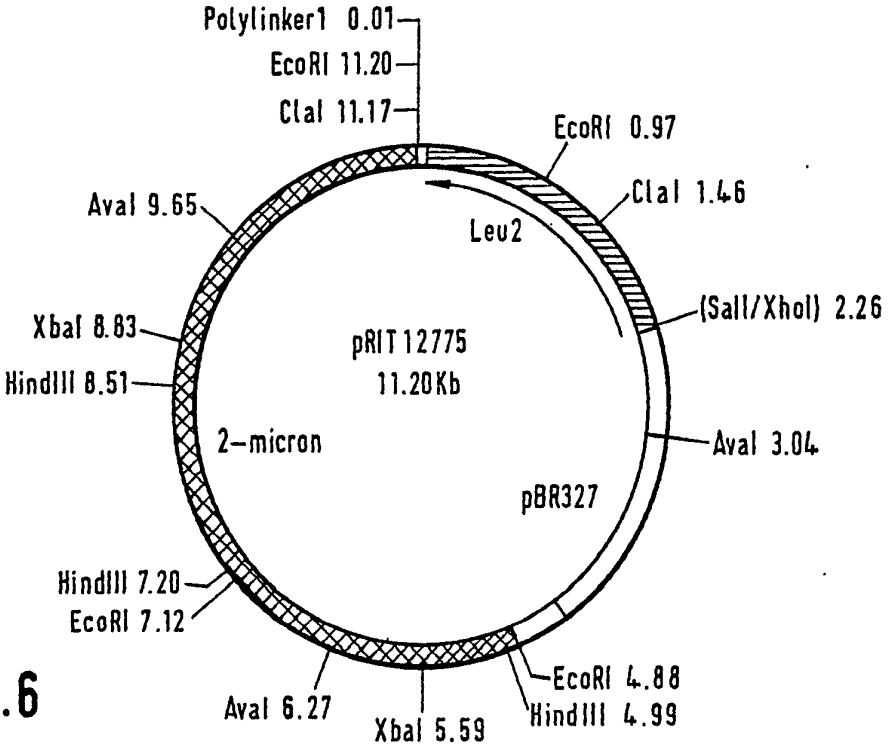
Polylinker1 0.01
EcoRI 11.20
ClaI 11.17
EcoRI 0.97
ClaI 1.46
AvaI 9.65
Leu2
(SalI/XhoI) 2.26
XbaI 8.83
pRIT12775
11.20Kb
HindIII 8.51
2-micron
AvaI 3.04
pBR327
HindIII 7.20
EcoRI 7.12
EcoRI 4.88
HindIII 4.99
AvaI 6.27
XbaI 5.59

Fig.6