

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 97 073

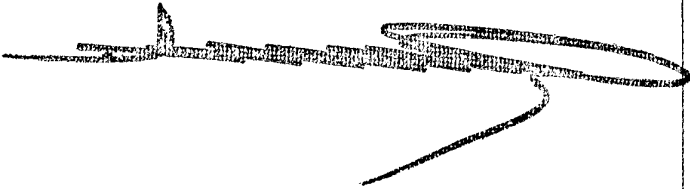
REQUERENTE: BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com
sede em D-3550 Marburg, República Federal
Alemã

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE EPÍTOPOS SORO-
-REACTIVOS DE PROTEÍNAS DE PAPILLOMAVIRUS 16
HUMANO (HPV)"

INVENTORES: Dr. Martin Müller e Prof. Dr. Lutz Gissmann

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

República Federal Alemã, em 20 de Março de 1990, sob o n.º
90105222.5.



Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã, (inventores: Dr. Martin Müller e Prof. Dr. Lutz Gissmann, residentes na República Federal Alemã), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE EPÍTOPOS SORO-REACTIVOS DE PROTEÍNAS DE PAPILLOMAVIRUS 16 HUMANO (HPV)"

DESCR I Ç Ã O

A presente invenção refere-se a regiões soro-reactivas em proteínas do Papillomavirus 16 humano (HPV), E4, E6, E7 e L1.

A invenção refere-se ainda a uma vacina contendo péptidos com sequências que abrangem as das referidas regiões seropositivas, bem como a conjuntos ("kits") de diagnóstico que contêm péptidos com sequências que abrangem as das referidas regiões seropositivas.

O HPV 16 é um tipo de Papillomavirus humano, descrito pela primeira vez em Proc. Natl. Acad. Sci., USA 80, 3813-3815 (1983).

A sequência de DNA e a organização de genoma do HPV 16 encontram-se publicadas em Virology 145, 181-185 (1985).

O HPV 16 está intimamente relacionado não apenas com lesões iniciais do tracto anogenital mas também como o cancro maligno do colo do útero, pênis e vulva. Além disso, o HPV 16 pode também encontrar-se em esfregaços

genitais obtidos a partir de indivíduos clinicamente assintomáticos. Pouco se sabe acerca da resposta imunológica a infecções causadas pelo HPV 16 e por Papillomavirus em geral. Em experiências preliminares testaram-se soros humanos obtidos a partir de pacientes de STD, de pacientes sofrendo de cancro do colo do útero e ainda de indivíduos saudáveis em relação à presença de anticorpos dirigidos contra proteínas virais. Estas proteínas exprimiram-se como fusões com diferentes péptidos procarióticos ligados ao seu terminal azotado e usaram-se como antígenos em experiências de "Western-Blot". Este tipo de teste é relativamente entediante dificultando assim a análise quantitativa de um grande número de colheitas de soro. Além disso, devido à semelhança dos vários tipos de Papillomavirus, não se pode excluir a reactividade cruzada dos anticorpos.

O objectivo da presente invenção é a identificação das estruturas varais do HPV16 que se possam usar como instrumentos na profilaxia, diagnóstico e terapia de doenças humanas causadas pelo HPV16.

O conhecimentos destes domínios é a condição necessárias para o estabelecimento de um método de teste ELISA de péptidos a utilizar para a selecção ("screening") em larga escala de sores humanos.

A presente invenção refere-se a:

- Epítosos soro-reactivos da proteína E4 do HPV16, caracterizado por uma das seguintes sequências de aminoácidos:

I. IPKSPWAPKK

II. KPSPWAPKKHRRLS;

- Epítosos soro-activos da proteína E6 do HPV16, caracterizados por uma das seguintes sequências de aminoácidos:

I. LSRHFMHQKRTAMFQDPQERPRKLPQ

II. AMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILEC;

- Epítopos soro-reactivos da proteína E6 do HPV16, caracterizados por uma das seguintes sequências de aminoácidos:

I. LSRHFMHQKRTAMFQDPQERPRKLPQ

II. AMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILEC;

- Epítopos soro-reactivos da proteína E7 do HPV16, na região genômica E7-221, caracterizados por uma das seguintes sequências de aminoácidos:

I. PTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQ

II. HEYMLDLQPET

III. TLHEYMLDLQPETTD

IV. EYMLDLQPETTDLY;

- Epítopos soro-reactivos da proteína E7 do HPV16, na região genômica E7-107, caracterizados por uma das seguintes sequências de aminoácidos:

I. DEIDGPAGQAEPDRAHY

II. GPAGQAEPDRAHYNI;

- Epítopos soro-reactivos da proteína L1 do HPV16, na região genômica L1-809, caracterizados pela seguinte sequência de aminoácidos:


PLLNKLDDTENASAYAANAGVDN;

- Epítopos soro-reactivos da proteína L1 do HPV16, na região genômica L1-830, caracterizados por uma das seguintes sequências de aminoácidos:

I. ICTSICKYPDYIKMVSEPYGDSLFFYLRREQMFVRHLFN RAGTVG-ENVP

II. DDLYIKGSGSTANLASSNYFPTPSGSMVTSDAQIFNKPY

- Epítopos soro-reactivos da proteína L1 do HPV16, na região genômica L1-842, caracterizados por uma das seguintes sequências de amino-



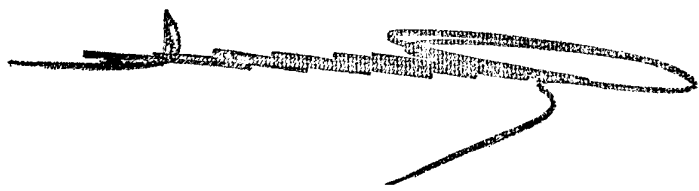
ácidos:

- I. KHTPPAPKEDDPLKK
- II. AIACQKHTPPAPKEDDPLKKYTFWEVNLKEKFSADLD
- III. LKKYTFWEVNLKEKFSADLDQF:

A presente invenção refere-se ainda a:

- Pétidos caracterizados por conterem um ou vários dos epítomos soro-reactivos acima mencionados;
- Uma vacina caracterizada por conter um ou vários dos pétidos acima referidos;
- Um conjunto ("kit") de diagnóstico para identificação de anticorpos específicos contra as proteínas E4, E6, E7 ou L1 de HPV16, caracterizado por conter os péptidos acima referidos;
- Anticorpos monoclonais caracterizados por terem uma afinidade com os epítomos soro-reactivos das proteínas de HPV16 humano;
- Um conjunto de diagnóstico que contenha os referidos anticorpos monoclonais;
- Um meio de diagnóstico que contenha os referidos anticorpos monoclonais para a identificação de proteínas específicas de HPV16;
- A utilização de péptidos acima mencionados para a produção de uma vacina ou de um conjunto de diagnóstico.

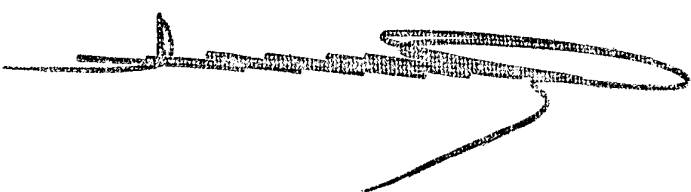
Para identificar os epítomos soro-reactivos nas proteínas E4, E6, E7, e L1 do Papillomavirus humano (HPV) do tipo 16, escolheu-se o método experimental descrito em Science, 228, 1315-1317 (1985). Clonaram-se aleatoriamente pequenos fragmentos do genoma viral na proteína do III do DNA de bacteriofago de cadeia simples, no sentido direc-



to. Identificaram-se os recombinantes positivos por comparação colorimétrica imunológica com os anti-soros adequados preparados contra proteínas de fusão bacterianas (Virology, 145, 181-185 (1985) e determinaram-se os epítomos por sequenciação do DNA inserido. Devido a algumas reacções do substrato, dependentes provavelmente da quantidade de anti-soro usada, apenas se pode identificar uma parte dos recombinantes inicialmente caracterizados, em testes subsequentes após isolamento e reanálise.

Nos casos de recombinantes repetidamente positivos, contudo, este método revelou-se altamente específico, uma vez que se encontraram apenas as sequências de código de leitura aberto (ORF) contra as quais se preparara originariamente o anti-soro, e na maior parte dos casos identificaram-se repetidamente as respectivas sequências (vide Tabela 3). Excepto no caso dos ORFs de E4 e de L1 encontraram-se clones coincidentes independentes continuando a utilizar o "método da biblioteca" para a expressão. Uma evidência adicional resulta de facto de se obterem resultados idênticos com anti-soros diferentes preparados em coelhos isolados ou mesmo com soros derivados de espécies diferentes. O epítomo 221 da proteína E7 identificou-se também com anticorpos monoclonais. Além disso, verificou-se que péptidos sintéticos derivados do epítomo 107 de E7 e do epítomo de E4 reagem com vários soros humanos.

No caso do ORF de E4 apenas se verificou um tipo de recombinantes positivos. Confirmou-se o epítomo, contudo, por um método independente. Sintetizaram-se octapéptidos coincidentes cobrindo o ORF total e usaram-se para testar um anti-soro anti-E4 pelo método ELISA. Verificou-se que quatro outros péptidos cobrindo um total de 14 aminoácidos (posição 17-20) se ligaram a imunoglobulinas dos soros de coelho (Fig. 3). O péptido 17 está completamente contido no epítomo derivado no sentido directo (Tabela 2) mas coincide com o péptido 20 em apenas um aminoácido. Por isso, não é claro se existem realmente dois epítomos adjacentes

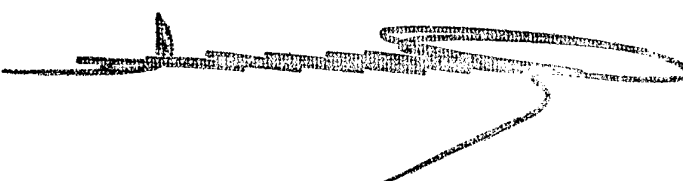


contidos na proteína E4 ou se o péptido 20 se liga a imunoglobulinas de um modo independente da sequência. De facto, este modo de ligação não específico parece ser o caso dos péptidos 5/6 e 40 (Fig. 3) uma vez que os octapéptidos adjacentes coincidentes em seis aminoácidos são completamente negativos. Além disso, apenas o péptido sintético derivado da região reactiva à volta do péptido 20 mas não de outras regiões (Fig. 3) se verificou reagir com o anti-soro de coelho no teste ELISA. Por isso, a ligação não específica devida a alguns produtos aberrantes sintetizados nas partes plásticas poderá ser a razão da reacção positiva nas posições 5/6 e 40.

Os métodos utilizados na presente invenção permitem apenas a identificação de epítomos lineares mas não conformacionais. Assim, fica em aberto a questão se no interior das proteínas nativas estas regiões estão realmente expostas ao sistema imunológico. No caso dos epítomos de E7 isto parece ser muito provável porque são complementarmente coincidentes com as regiões prováveis de ligação de E7 à proteína do retinoblastoma ou às regiões imediatamente adjacentes e uma vez que se verificou que o oligopéptido respectivo reage com soro humanos. Fez-se uma observação semelhante para o péptido do ORF de L1 completamente contido na região L1-830 (Tabela 2).

Os epítomos identificados podem utilizar-se como antígenos para a selecção ("screening") de soros humanos em relação à presença de anticorpos anti-HPV16. É uma questão importante neste contexto saber se numa determinada proteína todos os epítomos foram identificados. Nos sistemas animais a pré-incubação dos soros com os péptidos sintéticos dos epítomos de E4 e E7 antes da reacção com as respectivas proteínas de fusão em experiências de Western-Blot resultou numa quase total perda do sinal (ver também Fig. 3) que indica que não se falhou nenhum epítomo importante.

Os epítomos identificados das diferentes proteínas de HPV16 podem ser úteis como reagentes para definir o tipo de anticorpos presentes em pacientes com

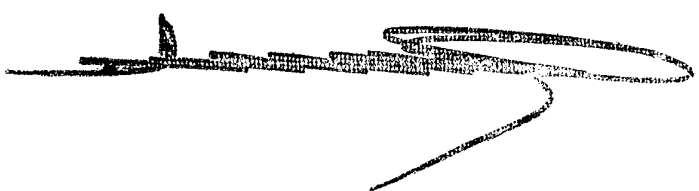


doenças causadas pelo HPV bem como em controles sanitários. Cadeias e fogos bacterianos: utilizou-se o derivado filamentososo do fogo-fusão 1 (fd-tet-J6); (Science 228, 1315-1317 (1985), Gene 73, 305-318 (1988)) como sistema de expressão para os fragmentos de DNA genômico de HPV16 na única posição PVUII da fusão I. Para a transformação com o vector da fusão 1 utilizou-se a estirpe K802 de E-coli (F galK2 galT22 metB1 supE44 hsdR2) (J. of Molec. Biol. 16, 118-133 (1966)). As colônias resistentes à tetraciclina produzem bacteriofagos que não são infecciosos para esta estirpe devido ao seu fenotipo-F. Para o desenvolvimento dos fogos recombinantes utilizou-se a estirpe K91 de E.coli (F+, derivado de K38; Virology 49, 45-60(1972)). Efectuou-se a transformação bacteriana de acordo com J. of Molec. Biol. 166, 557-580 (1983). A inserção de um fragmento de DNA do tamanho de $3n + 2$ nucleótidos sem códons stop internos para a translação restaura uma mutação de estrutura no gene III no sentido directo que impede a produção de prole infecciosa.

Anti-soros: utilizaram-se anti-soros policlonais de coelho preparados contra uma polimerase MS2 (Virology 145, 181-185 (1985)) ou uma proteína de fusão E4 de CII-HPV16 ou dirigidos contra uma proteína de fusão de polimerase MS2/E7 de HPV16. A parte de fusão E7 inclui os aminoácidos das posições 585 a 855, as partes de fusão E4 os aminoácidos das posições 3399 a 3617 do genoma de HPV16. Usaram-se dois anticorpos monoclonais diferentes anti E7 dirigidos contra a mesma proteína de fusão (E7 II e E7 IV, J. Gen. Virol. 68, 2933-2938 (1987)).

O anti-soro anti-HPV16 E6 preparou-se contra uma fusão de polimerase MS2 contendo a parte principal do ORF de E6 (posição 110 a 556, Virology 145, 181-185 (1985)).

Utilizaram-se dois anti-soros policlonais de coelho diferentes, preparados contra a parte N-terminal (L1/1: posição 5692 a 6819) e C-terminal (posição 6819 a 7152) da L1 de HPV16 fundida com o terminal azotado da polimerase MS2 (Virology 145, 181-185 (1985)).




Preparação de biblioteca de expressão da fusão 1 de HPV16: Trataram-se por ultrassons 5 g de DNA plasmídeo de HPV16 durante 120 segundos até se obter um fragmento de tamanho de aproximadamente 1 kb e continuou a digerir-se até cerca de 300 bp (pares de bases) com 0.02 -2 unidades de DNase I durante 10 minutos a 15°C na presença de Mn²⁺ 10 mM. A DNase I fora diluída e pré-incubada durante 1 hora num tampão contendo 50 mM Tris, a pH 8,0, 10 mM MnCl2 e 0.1 mg/ml de BSA.

Para obter extremos planos trataram-se os fragmentos de DNA durante 60 minutos a 15°C com 15 unidades de polimerase T4 e 10 unidades de DNA ligase de E.coli e 100 M de cada um dos quatro desoxirribonucleótidos. Ligou-se então o DNA na única posição PVIII da fusão 1. Transformaram-se células de E. coli k802 (F-) adequadas com o DNA ligado e colocaram-se em placas LM. Obtiveram-se aproximadamente um total de 3x10⁴ colônias produtoras de fagos resistentes à tetraciclina, a partir de oito experiências diferentes. Para obter os fagos recombinantes lavaram-se as colônias com LM. Desta amplificação resultaram oito bibliotecas diferentes com um número total de aproximadamente 5x10¹² partículas infecciosas mas levou também a uma subrepresentação de certos recombinantes.

Centrifugaram-se as suspensões de fagos a aqueceram-se durante 10 minutos a 65°C para remover as bactérias remanescentes. Salvo indicação am contrário guardaram-se separadamente esta bibliotecas amplificadas e utilizaram-se para as experiências seguintes.

Seleção imunológica: Desenvolveram-se entre 2000 e 6000 fagos com 0,2 ml de células K91 em crescimento exponencial em 3.5 ml de agarose a 0.5% contendo 10 mM MgSO4 em placas de agar mínimas. Tiraram-se réplicas em nitrocelulose e incubaram-se depois em placas mínimas frescas durante 6 horas a 37°C para aumentar os sinais. Depois bloquearam-se os filtros durante 60 minutos em PBS de leite



a 5% contendo uma diluição de 1:100 a 1:1000 de anti-soros específicos de HPV (pré-adsorvidos com células K91 tratadas com ultrassons) ou de anticorpos monoclonais. Lavaram-se então os filtros 5 vezes durante 5 minutos em PBS/0.1% de Tween 20 e incubaram-se durante 3 horas à temperatura ambiente com anticorpos de peroxidase anti-coelho (ou anti-rato) de cabra (1:1000) em leite magro a 5%. Após a lavagem revelaram-se os filtros em 50 ml de PBS contendo 30 mg de diaminobenzidina, 30 ml de H₂O₂ e 1.5 ml de NiSO₄. Finalmente lavaram-se os filtros em H₂O durante 30 minutos e secaram-se em papel.

Preparação de DNA de cadeia simples de recombinantes da fusão 1: Seguiu-se um protocolo semelhante ao descrito anteriormente (proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977)). Inocularam-se 50 ml de LM com E. coli K91 resistente à tetraciclina no plasmídeo da fusão 1 e incubou-se durante 16 horas a 37°C. Peletizaram-se então as bactérias a 6000 rpm durante 30 minutos. Após adicionar 2 ml de PEG 6000 a 40% e 2 ml de acetato de sódio 5M, a pH 6.5, à camada sobrenadante, precipitaram-se os fagos durante 60 minutos a 0°C e sedimentaram-se a 6000 rpm durante 60 minutos. O peletizado ressuspendeu-se e 0.3 ml de TE. Após duas extracções com fenol precipitou-se o DNA. Utilizaram-se aproximadamente 25% destas preparações para uma reacção de sequenciação.

Sequenciação: Para a sequenciação do DNA utilizou-se o protocolo padrão VSB(United States Biochemicals) (USB, 1987) e substituiu-se o marcador ("primer") universal por um oligonucleótido de 20 unidades (5'-TCCAGACGTT-AGTAAATGAA-3'). Na Fig. 1 mostra-se um exemplo de uma reacção de sequenciação.

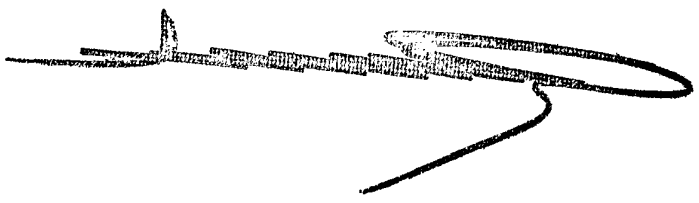
Síntese peptídica: Sintetizou-se um conjunto de péptidos coincidentes correspondentes ao ORF da E4 de HPV16 num substrato de polietileno, seguindo essencialmente a estratégia descrita em Proc. Nat. Acad. Sci. 82, 178 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 3998 (1985).

Os pólipos de polietileno derivati-

tizados com beta-alanina foram obtidos da CRB, Inglaterra. Como alternativa ao processo recomendado por Geysen a sequência proteica dividiu-se em péptidos de oito membros coincidentes em seis unidades e efectuou-se a síntese utilizando a química Fmoc e activação in situ por BOP (reagente de Castro) (Tetrahedron Lett. 14, 1219 (1975)). As soluções dos derivados Fmoc de aminoácidos (6 micromoles) de BOP e de N-metilmorfolina distribuíram-se por tabuleiros reaccionais de polietileno (CRB) de acordo com a sequências peptídicas a sintetizar. Todas as outras reacções se efectuaram de acordo com o protocolo CRB. Como controle positivo sintetizou-se o péptido RPDYLDFA juntamente com os péptidos específicos do HPV16 e testou-se com um anti-soro adequada pelo método ELISA.

ELISA com octapéptidos: detecção de anticorpos em octapéptidos acoplados a pólipos:

Todos os testes se efectuaram em péptidos ligados covalentemente os pólipos de polietileno onde foram originalmente sintetizados. Utilizaram-se séries de 86 pólipos fixadas numa configuração que permite a inserção nos orifícios de um tabuleiro de microtitulação. AS incubações para o teste ELISA efectuaram-se durante a introdução dos pólipos nos orifícios. Lavaram-se as placas com metanol em PBS e bloquearam-se depois com 0.25% de gelatina, 0.1% de Tween 20 em PBS durante 2 horas a 37°C seguido por incubação com soros diluídos a 1:200-1:4000 em 0.125% de gelatina, 0.05% de Tween 20 durante 1 hora a 37°C. Após lavagem com PBS/0.1% de Tween 20 incubaram-se os pólipos durante 1 hora a 37°C com proteína A-peroxidase 1:4000 seguido por lavagem posterior e revelação com tetrametilbenzidina (TMB; V.R. Holland et al. (1974), Tetrahedron 30, 3299-3302) durante 15 minutos. A revelação terminou-se retirando as placas do corante e adicionando 100 ml de H₂SO₄ 0.5M. Mediu-se a absorção num leitor ELISA automático. Para remover o complexo de anticorpo/enzima após o teste ELISA trataram-se os pólipos com ultrassom durante 1 hora (banho maria, 30W, 48kHz) a 60°C em PBS/1% SDS/0.1% β-mercaptoetanol e lavaram-se finalmente com metanol. A eficiên-



cia do processo de interrupção testou-se por ELISA usando proteína A-peroxidase sem soro primário. Utilizaram-se os mesmos péptidos mais de 40 vezes em testes ELISA subsequentes.

Breve descrição das tabelas e figuras:

Tabela 1:

Inserções de DNA de HPV16 representando a região imunogénica 221 da E7 de MPV16. Os clones E7-1 a E7-4 identificaram-se com um anti-soro policlonal do coelho anti E7. Os clones do grupo E7-4 são idênticos aos identificados com o anticorpo monoclonal de rato (tipo II) descrito em J. Gen. Virol. 68, 2933-2938 (1987).

Tabela 2:

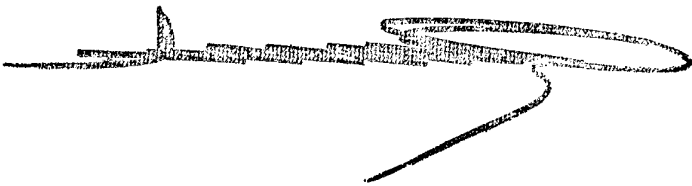
Regiões imunogénicas das proteínas E4, E6, E7 e L1 de HPV16. As regiões de E6, E7 e L1-842 estão representadas em diferentes clones no sentido directo. Para a proteína E4 mostra-se também o epítipo identificado pelos octapéptidos coincidentes. Indicam-se as posições de nucleótidos correspondentes dos primeiros aminoácidos e os últimos nucleótidos dos últimos aminoácidos. O clono 830, que abrange a região imunogénica L1-830 codifica para 88 aminoácidos. Apresenta-se apenas em parte a sua sequência. O número de clones individuais que representam as regiões imunogénicas indica-se na última coluna.

Fig. 1:

Auto-radiograma de uma reacção sequencial de clono 107 no sentido directo (ver Tabela 2). Mostram-se a sequência de DNA da inserção do clono obtida com o marcador ("primer") de sequenciação, as respectivas sequências codificantes, bem como os aminoácidos translacionados. As letras maiúsculas indicam a parte de HPV16 da sequência de DNA.

Fig. 2:

Inibição da revelação imunológica



- da proteína de fusão MS2 polimerase/E7 sz HPV16 com anticorpos monoclonais por bacteriofagos contendo a região imunogénica E7-221.

Bandas de "Western Blot" reveladas com o anticorpo monoclonal do tipo IV contra E7 de HPV16. O anticorpo foi pré-adsorvido com preparação de diferentes clonos fagos e incubado com as bandas contendo a proteína de fusão E7 de HPV16/MS2. Apenas as preparações das partículas de fago de clono 221 (bandas b e d; concentrações diferentes de partículas de fago usadas para absorpção; para os números dos clonos ver Tabela 1) ou do clono 108 (banda e) reagiram com os anticorpos monoclonais impedindo assim a reacção com a proteína de fusão nas bandas. Os clonos 209 (bandas e e f, concentrações diferentes de partículas de fagos) ou 212(g) não interferem com a revelação da proteína. Na banda a os anticorpos foram pré-absorvidos sem partículas de fagos, na banda h foram incubados com partículas contendo uma inserção não relacionada com as sequências de E7.

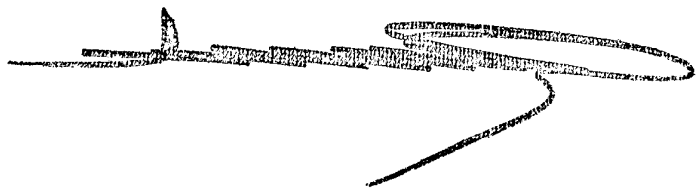
Fig. 3:

Teste ELISA de octa péptidos coincidentes representando o ORF da E4 de HPV16. Os 45 péptidos incubaram-se primeiro com um anti-soro policlonal de coelho contra E7 de HPV16 seguido por incubação com complexo de proteína A-peroxidase. Revelaram-se os péptidos como descrito acima e determinou-se o coeficiente de extinção. Obtiveram-se resultados muito semelhantes em quatro experiências diferentes usando dois anti-soro individuais.

Exemplo 1

Identificação de epítomos na proteína E7 de HPV16 usando a biblioteca de expressão no sentido directo

Colocaram-se aproximadamente 25000 bacteriofagos recombinantes, obtidos a partir de bibliotecas de expressão no sentido directo de HPV16, construídas separada-



mente, em células de E.coli, como descrito acima. Identificou-se um total de 230 recombinantes por selecção ("screening") com um anti-soro policlonal de coelho dirigido contra uma proteína de fusão MS2 polimerase/E7 de HPV16. Desenvolveram-se individualmente 54 destes recombinantes e re-seleccionaram-se, 31 dos quais permaneceram positivos após 2 a 3 selecções subsequentes e analisaram-se posteriormente: Produziram-se partículas de bacteriófago e preparou-se o DNA de cadeia simples e usou-se para sequenciação como descrito acima. Os resultados apresentam-se na Tabela 1. Todos os 31 clones fagos revelaram conter sequências específicas da E7 de HPV16 representando duas regiões genómicas diferentes (E7-221 e E7-107) no ORF de E7.


A região E7-221 é representada por 22 clones que se dividem em 4 grupos de diferentes tamanhos. O grupo E7-1 consiste num único isolado de 68 nucleótidos (bp 576 a bp 643). Os grupos E7-2, -3 e -4 são representados por 3, 9 e 9 clones, respectivamente, sendo todos mais curtos do que o clone E7-1 e coincidem entre as posições de nucleótido 589 a 618. Por isso, o epítipo mais pequeno identificado é representado pela sequência de aminoácidos EYMLDLQPET.

A região E7-107 é representada por 9 clones de duas classes diferentes coincidindo em 41 nucleótidos e o epítipo resultante tem a sequência GPAGQAEPNR-AHY (bp 679 a bp 711, Tabela 2).

Exemplo 2

Identificação de epítipos da proteína E6 de HPV16

AO contrário do caso de E7 não foi possível identificar os bacteriófagos positivos de E6 por selecção de um número equivalente de recombinantes, como acima, com um anti-soro policlonal de coelho preparado contra a proteína de fusão de MS2 polimerase/E6 de HPV16. Isto pode explicar-se por uma subrepresentação desses clones na biblioteca de fagos obtida a partir das colónias originais.



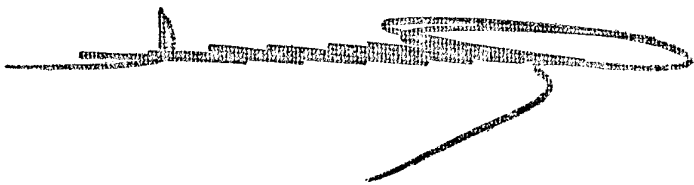
Para identificar os fagos reactivos de E6 ligou-se a fracção de imunoglobulina do soro de coelho anti-E6 à proteína A-Sepharose. Incubaram-se aproximadamente 1010 bacteriofagos, obtidos como uma mistura de sete diferentes bibliotecas de HPV16 construída por ligação individual de DNA de HPV16 cortado e digerido por DNase, do plasmídeo em sentido directo, com os complexos de proteína A-sepharose-imunoglobulina. Os bacteriofagos ligados especificamente eluíram-se e desenvolveram-se em E.coli K91. Obtiveram-se aproximadamente 3000 áreas. Para amplificação suspenderam-se os fagos e desenvolveram-se de novo.

Para testar a eficiência do passo de enriquecimento desenvolveram-se quantidades idênticas de recombinantes eluídos da coluna de proteína A e hibridizaram-se com amostras de DNA de HPV16 específicas do ORF de E6 (24-654) ou de E4 (2714-3693). Por comparação com a hibridação dos recombinantes originais calculou-se um enriquecimento de aproximadamente 20 vezes dos fagos positivos de E6. Uma vez os recombinantes imuno-reactivos exprimem apenas uma parte da proteína E6 (ver abaixo) assumiu-se que esses recombinantes são ainda menos abundantes na biblioteca original e assim o factor de enriquecimento é maior. De facto, obtiveram-se cerca de 300 sinais positivos quando se seleccionaram os fagos com os mesmo anti-soro E6 usado para a coluna de proteína A. Re-seleccionaram 14 dos recombinantes positivos, 9 dos quais se analisaram-se finalmente por sequenciação de DNA e mostraram pertencer a duas classes diferentes representando uma região do ORF da E6 de HPV16. A sequência coincidente (bp 101 a 145) codifica para o epítipo AMFQDPQERPRKLPQ.

Exemplo 3

Identificação dos epítipos da proteína L1 de HPV16

Identificaram-se na proteína L1 de HPV16 três regiões imunogénicas diferentes. Seleccionaram-se 20000 bacteriofagos recombinantes de uma biblioteca de




HPV16 com um anti-soro de coelho dirigido contra a região N-terminal do ORF da L1 de HPV16 (bp 5695 a 6818). Re-selecionaram-se 25 de entre 80 sinais positivos e sequenciaram-se 11 deles. Verificou-se que três clonos continham um fragmento idêntico do ORF da L1 de HPV16, i.e. da posição 5998 a 6066, codificando para o péptido PLINKLDDTENSASAYAANAGVDN (L1-808; Tabela 2) Todos os outros oito clonos continham uma inserção (posição 6307-6570) codificando para um péptido I com o comprimento de 88 aminoácidos (CTSICKYPD---SDAQIFNKPY; L1-830).

Da selecção de 8000 recombinantes da mesma biblioteca de HPV16 com um anti-soro policlonal de coelho dirigido contra a parte C-terminal de L1 de HPV16 (bp 6818 a 7152) resultaram 52 recombinantes positivos. Seis deles foram confirmados por selecção repetida e sequenciaram-se as suas inserções. Todos os clonos pertenciam à mesma região imunogénica (L1-842, Tabela 2). A inserção de dois clonos (842, de 6922 a 6966) codifica para o péptido KHTPPAPKEDDPLKK que coincide em três aminoácidos com a inserção do clono 877 (6958-7023) que codifica para o péptido LKKYTFWEVNLKEKFSADLDQF. Um terceiro grupo de recombinantes (905; de 6907 a 7017) representado por quatro clonos coincide com os clonos 842 e 877 e codifica para o péptido de 37 unidades (AIACQKHTPPAPKEDDPLKKYTFWEVNLKEKFSADLD). Uma vez que a sequência commun aos três clonos consiste em apenas três aminoácidos (LKK) há provavelmente duas posições de ligação independentes na região L1-842 (6907-7023) embora não se possa excluir a existência desse curto epítipo.

Exemplo 4

Identificação de epítipos na proteína E4 de HPV16

Para identificar os epítipos de E4 utilizou-se a mesma biblioteca que para L1. Por selecção com um soro anti-E4 preparado contra uma proteína de fusão MS2 identificaram-se 28 recombinantes. Analisaram-se 3 deles por sequenciação e verificou-se conterem a inserção específica do ORF da E4 de HPV16 (posição 3422 a 3456) correspondente



ao péptido IPKPSPWAPKK.

Exemplo 6

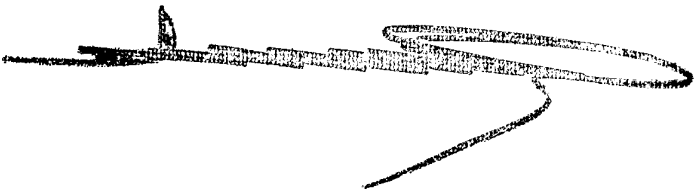
Identificação da posição de ligação de um anticorpo monoclonal de rato anti E7

Como descrito para a identificação de epítomos específicos de E6 ligaram-se 1010 fagos, obtidos a partir de sete diferentes bibliotecas de HPV16 no sentido directo, a complexos de proteína A-Sepharose-IgG (monoclonal de rato). Após eluição obtiveram-se aproximadamente 300 recombinantes, desenvolveram-se e suspenderam-se em LM. Seleccionaram-se 500 recombinantes desta sub-biblioteca com o anticorpo monoclonal anti E7 de HPV16 designado por II. Sequenciaram-se dois dos clones após três passos de re-selecção. Ambos os clones continham uma inserção idêntica à dos clones do grupo 4 da região imunogénica 221 do ORF da E7 de HPV16 (Tabela 1).

A fim de determinar se os vários clones da região imunogénica 221 se ligam a anticorpos monoclonais anti E7 do HPV16 efectuaram-se testes de competição. Revelou-se a proteína de fusão MS2 polimerase/E7, em bandas de "Western Blot", com dois anticorpos monoclonais diferentes (E7 II e E7 IV, J. Chem. Virol. 68, 2933-2938 (1987)). Utilizaram-se partículas de bacteriófago recombinantes purificadas contendo epítomos dos grupos 1 a 4 (Tabela 1) para pré-adsorção dos anticorpos monoclonais antes da imuno-revelação do "Western Blot". Não se observou diferença quando se utilizou o anticorpo monoclonal E7 IV para revelação. Como se mostra na Fig. 2 apenas as partículas de bacteriófago dos grupos 1 e 4 impedem a ligação do anticorpo monoclonal E7 II à proteína E7. Por isso, concluiu-se que existe pelo menos uma posição de ligação adicional para anticorpos adjacente ao epítomo EYMLDLQPET da região imunogénica E7-221 acima descrita.

Exemplo 6

Identificação de regiões imunogénicas na proteína E4 de HPV16 por teste dos péptidos coincidentes.



Sintetizaram-se 45 octapéptidos, representando o ORF da E4 de HPV16 em pólipos de polietileno, como descrito acima. Os péptidos coincidiam em seis aminoácidos, representando deste modo o péptido número 1 os aminoácidos 1 a 8 do ORF de E4 de HPV16, o péptido número dois os aminoácidos 3 a 10, e assim sucessivamente. Incubaram-se os péptidos com o anti-soro policlonal de coelho dirigido contra uma proteína de fusão MS2/E4 de HPV16 acima mencionada. Detectaram-se imunoglobulinas de coelho por incubação com complexos de Proteína A-peroxidase, seguida por revelação com TMB como descrito na parte "Materiais e Métodos". Como se mostra na Fig. 4 obteve-se um aglomerado ("cluster") maioritário de péptidos que se ligam a anticorpo com o anti-soro de coelho. Este aglomerado inclui o péptido KPSPWAPKKHRRLS do ORF da E4 de HPV16. Esta sequência está parcialmente incluída na região reactiva identificada por imuno-selecção (Tabela 3). Do teste dos péptidos com um anti-soro de coelho, preparado independentemente, dirigido contra uma proteína de fusão CII/E4 de HPV16, resultou uma situação muito semelhante comparada com a obtida com o anti-soro anti- MS2/E4 (resultados não mostrados). A incubação com soro de coelho de controle ou com proteína A-peroxidase apenas, não deu origem a sinais significativos. Obtiveram-se sinais adicionais com péptidos isolados (p. ex. péptido nº 40; ver fig. 3), muito semelhantes, não indicando um epítipo específico de ligação a imunoglobulina, uma vez que, ao contrário do péptido KPSPWAPKKHRRLS, os oligopéptidos sintéticos derivados destas regiões não reagem com os anti-soros no teste ELISA (resultados não apresentados).

T a b e l a 1

Região imunogênica 221 na proteína E7 do HPV16

E7-1 (1 clono):

5'-A CCT ACA TTG CAT GAA TAT ATG TTA GAT TTG CAA CCA GAG ACA ACT GAT CTC TAG TGT TAT
GAG CAA T-3'

E7-2 (3 clones):

5' -G CAT GAA TAT ATG TTA GAT TTG CAA CCA GAG ACA A-3'

E7-3 (9 clones):

5' -T ACA TTG CAT GAA TAT ATG TTA GAT TTG CAA CCA GAG ACA ACT GAT C-3'

E7-4 (9 clones):

5' -T GAA TAT ATG TTA GAT TTG CAA CCA GAG ACA ACT GAT CTC TAC T-3'

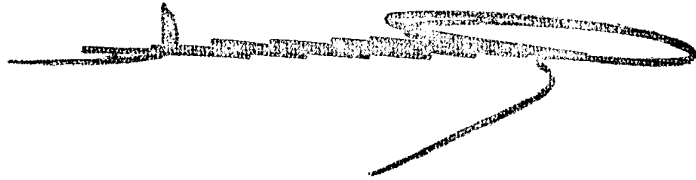


Tabela 2, continuação

Região imunogênica L1-809 (L1 de HPV 16):

809 bp5998-P L L N K L D D T E N A S A Y A A N A G V D N-bp6066 3

Região imunogênica L1-830 (L1 de HPV 16):

830 bp6307-I C T S I C K Y P N----- S N A Q I F N K P Y-bp6570 8

Região imunogênica L1-842 (L1 de HPV 16):

842 bp6922-K H T P P A P K E D D P L K K-bp6966 2
 905 bp6907-A I A C Q K H T P P A P K E D D P L K K Y T F W E V N L K E
 K F S A D L D-bp7017 4
 807 bp6958-L K K Y T F W E V N L K E K F S A D L D Q F-bp7023 1



R E I V I N D I C A Ç Õ E S

- 1ª -

Processo para a preparação de um conjunto de diagnóstico ("Kit") para a identificação de anticorpos específicos contra proteínas HPV16, E4, E6, E7 ou Li, caracterizado por se ligarem de forma covalente péptidos contendo um ou mais dos seguintes epítopos:

I. IPKPSPWAPKK (E4)
II. KPSPWAPKKHRRLS.

I. LSRHFMHQKRTAMFQDPQERPRKLPQ (E6)
II. AMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILEC.

I. PTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQ
II. HEYMLDLQPET
III. TLHEYMLDLQPETTD (ET)
IV. EYMLDLQPETTDLY -221

I. DEIDGPAGQAEPDRAHY (E7)
II. GPAGQAEPDRAHYNI. -107

PLLNKLDDTENASAYAANAGVDN. (L1)
-809

I. ICTSICKYPN--SNAQIFNKPY
II. ICTSICKYPDYIKMVSEPIGDSLFFYLRRREQMF (L1)
VRHLFN RAGTVGENVPDDLYIKGSGSTANLASS -830
NYFPTSSGSMVTSDAQIFNKPY

I. KHTPPAPKEDDPLKK
II. AIACQKHTPPAPQEDDPLKKYTFWEVNLKEKFS (L1)
ADLD -842
III. LKKYTFWEVNLKEKFSADLDQF

a uma fase sólida, de forma a que os anticorpos dirigidos

— aos referidos epítomos sejam detectáveis por técnicas de ensaio imunológico.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o "Kit" diagnóstico preparado ser do tipo ELISA.

- 3ª -

Processo para a preparação de um "Kit" diagnóstico para detectar epítomos específicos de HPV16, caracterizado por um ou mais dos epítomos referidos na reivindicação 1, produzirem anticorpos monoclonais que se ligam subsequentemente a uma fase sólida de modo a ser possível detectar os epítomos específicos referidos.

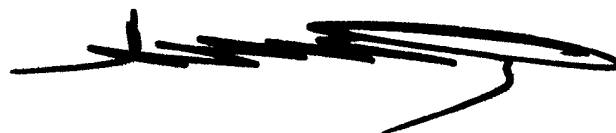
- 4ª -

Processo para a preparação de uma vacina contra o HPV16, caracterizado por se misturar um ou mais dos epítomos referidos na reivindicação 1 com veículos e aditivos adequados.

A requerente reivindica a prioridade do pedido de patente europeia apresentado em 20 de Março de 1990, sob o nº 90105222.5.

Lisboa, 19 de Março de 1991

GABINETE TÉCNICO DE PATENTES



R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE EPÍTOPOS SORO-REACTIVOS DE PROTEÍNAS DE PAPILOMAVIRUS 16 HUMANO (HPV)"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de um conjunto diagnóstico ("Kit") para a identificação de anticorpos específicos contra proteínas HPV16, E4, E6, E7 ou LI, que compreende ligarem-se de forma covalente p^éptidos contendo um ou mais dos seguintes epítopos:

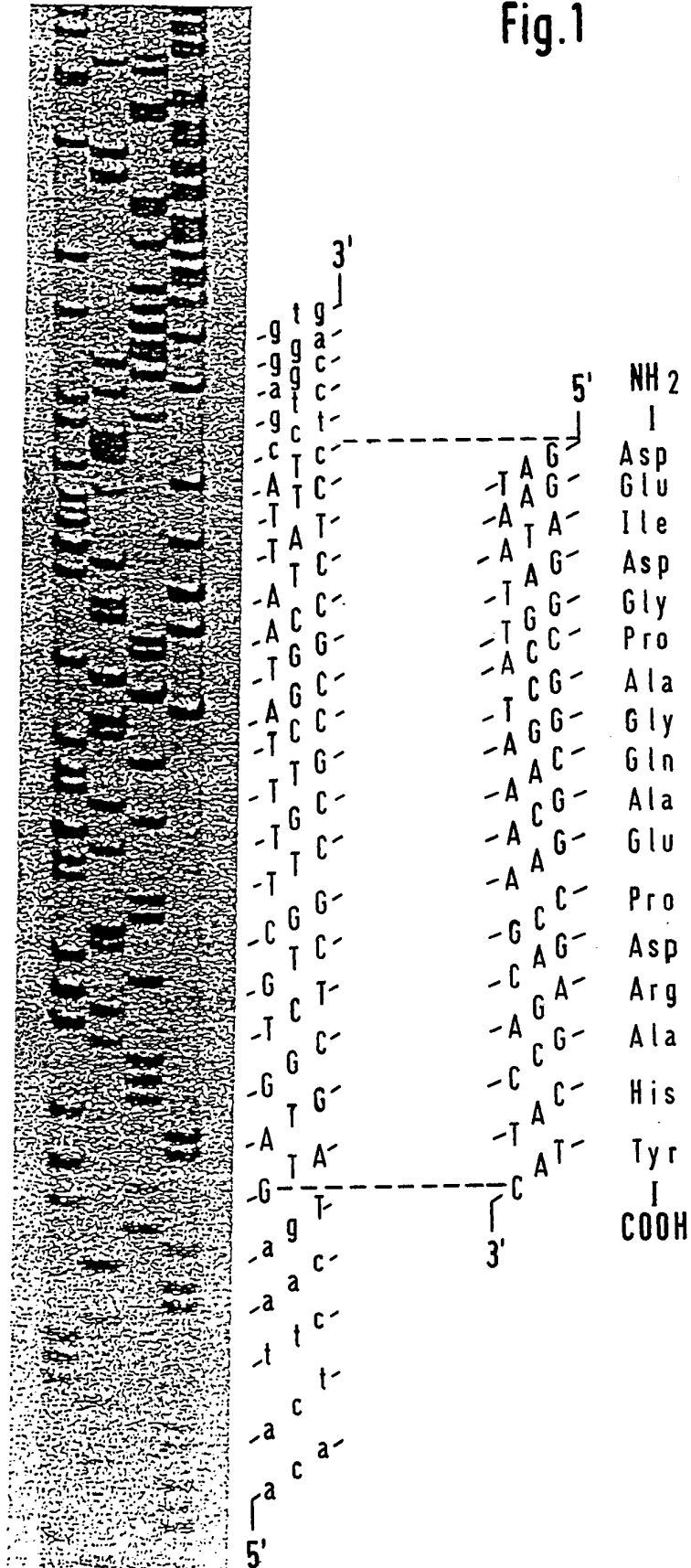
- | | | |
|------|-----------------------------------|------|
| I. | IPKPSWAPKK | (E4) |
| II. | KPSPWAPQQHRRLS. | |
| | | |
| I. | LSRHFMHQKRTAMFQDPQERPRKLPQ | (E6) |
| II. | AMFQDPQERPRQLPQLCTELQTTIHDIILES. | |
| | | |
| I. | PTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQ | |
| II. | HEYMLDLQPET | |
| III. | TLHEYMLDLQPETTD | (E7) |
| IV. | EYMLDLQPETTDLY | -221 |
| | | |
| I. | DEIDGPAGQAEPDRAHY | (E7) |
| II. | GPAGQAEPDRAHYNI. | -107 |
| | | |
| | PLLNKLDDTENASAYAANAGVDN. | (L1) |
| | | -809 |
| | | |
| I. | ICTSICKYBN--SNAQIFNKPY | |
| II. | ICTSICKYPDYIKMVSEPYGDSLFFYLRRQMF | (LI) |
| | VRHLFNAGTVGENVPDDLYIKGSGSTANLASS | -830 |
| | NYFPTPSGSMVTSDAQIFNKPY | |
| | | |
| I. | KHTPPAPKEDDPLKK | |
| II. | AIACQKHTPPAPKEDDPLKKYTFWEVNLKEKFS | (LI) |
| | ADLD | -842 |
| III. | LKKYTFWEVNLKEKFSADLDQF | |



- a uma fase sólida, de forma a que os anticorpos dirigidos aos referidos epítomos sejam detectáveis por técnicas de ensaio imunológico.

107
TCGA

Fig. 1



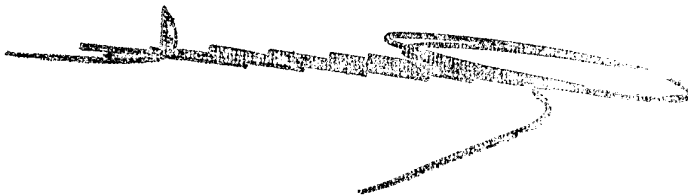
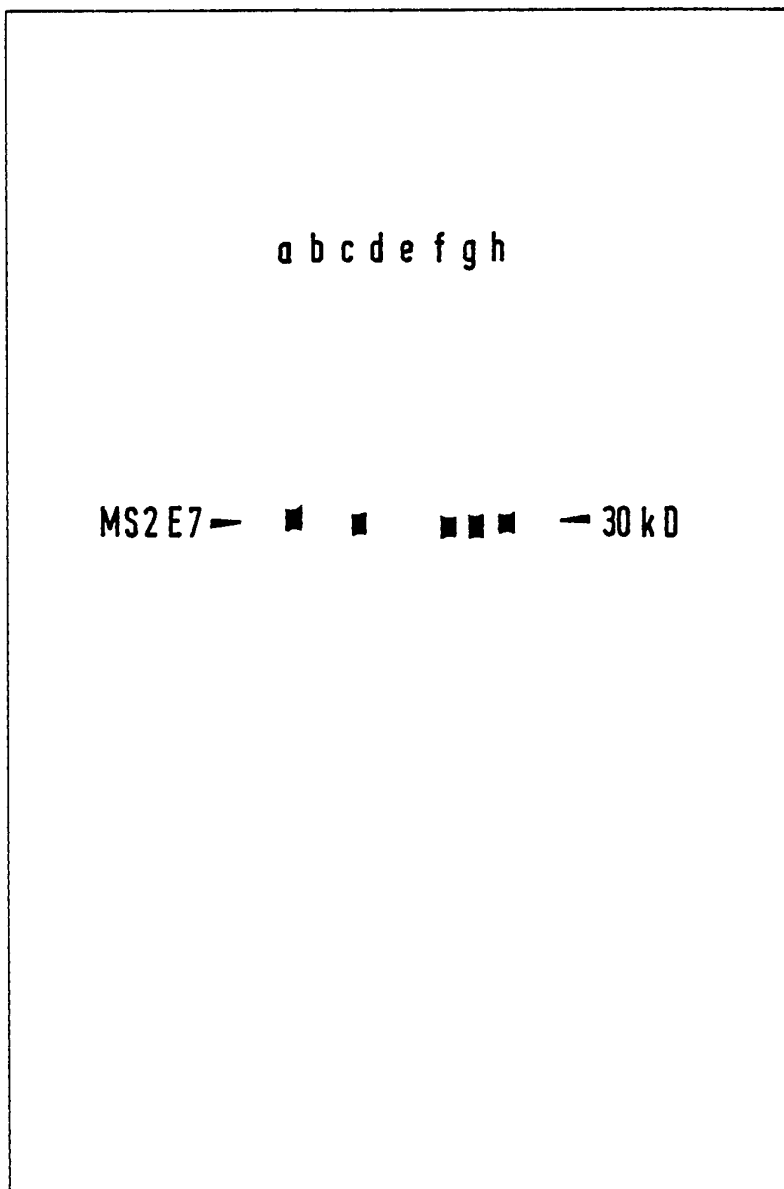


Fig. 2



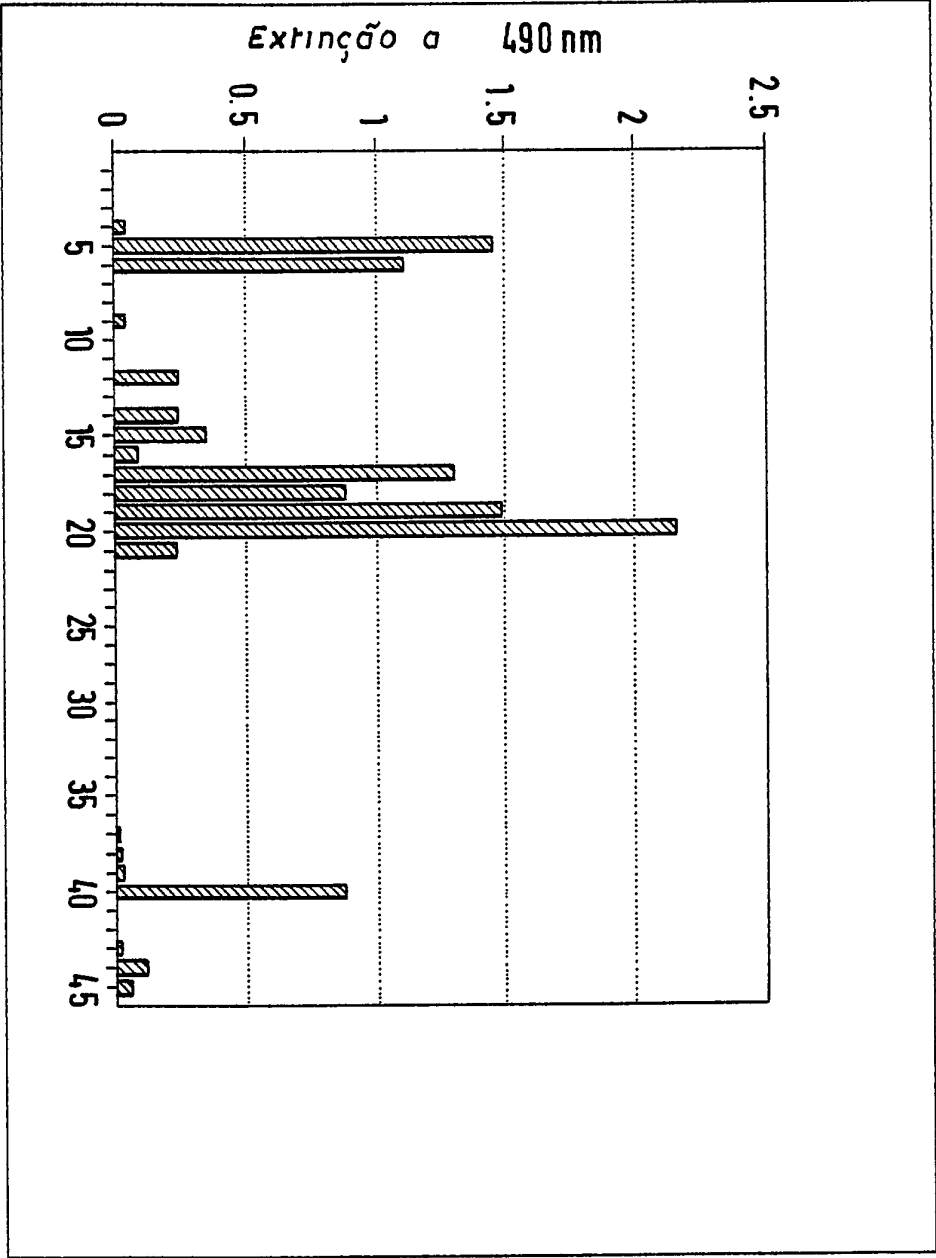


Fig.3