

78 478



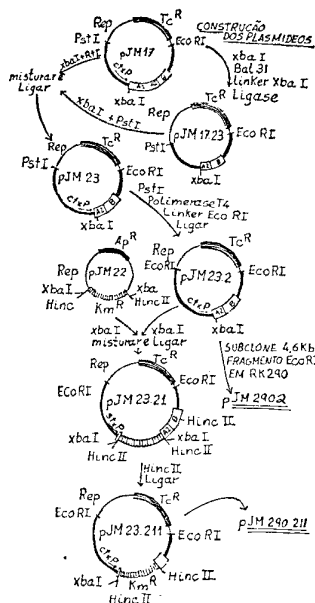
"Processo de construção de uma forma ge-
neticamente estável de Vibrio cholera"

para que

PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLE-
GE, pretende obter privilégio de inven-
ção em Portugal.

R E S U M O

Descreve-se uma forma geneticamente estável não toxinogé-
nica da estirpe Ogawa 395 de Vibrio cholera, com as característi-
cas identificadoras dos Depósitos n.ºs. 39346 e 39347 da American
Type Culture Collection-ATCC, a qual tem uma mutação de deleção
em ambas as cópias do gene que codifica para o peptídeo A₁ resul-
tando na perda de uma sequência genética necessária à expressão
de um peptídeo tóxico A₁, assim como os plasmídeos e técnicas pa-
ra a feitura da estirpe. A estirpe é utilizável como vacina
oral morta ou viva.





DESCRIÇÃO DO INVENTO

Este invento diz respeito a estirpes modificadas de Vibrio cholera que são úteis, por exemplo, para protecção imunológica contra a cólera e outras doenças, assim como aos plasmídeos e técnicas utilizadas para a construção dessas estirpes.

A cólera é uma doença diarreica provocada pelo Vibrio cholera, uma bactéria gram-negativa. Ingerido oralmente, o Vibrio cholera cresce no intestino inferior do homem e produz uma proteína solúvel, a toxina colérica, que é responsável pela diarreia que se observa nesta doença. A toxina é constituída por dois tipos de unidades, a A e a B e a actividade da toxina intacta tem origem num fragmento proteolítico de subunidade A, o peptídeo A₁, que é uma enzima que activa o sistema da adenilato ciclase das células-alvo [Gill (1975), Proc.Nat'l.Acad.Sci USA 72: 2064-2068]. O acréscimo de AMP cíclico nas células intestinais que daqui resulta provoca a diarreia que se observa na doença. A subunidade B não é tóxica, embora se ligue às células-alvo e facilite o transporte do peptídeo A₁ através da membrana das células [Cuatrecasas, Biochem. 12: 3577-3581 (1973)]. Os anticorpos dirigidos contra a subunidade B inactivam eficazmente a toxina, bloqueando a ligação da toxina à superfície das células [id].

Devido ao facto de a toxina colérica ser uma doença intestinal, as vacinas existentes no comércio, de bactérias mortas ou toxóides, têm-se mostrado relativamente pouco eficazes na indução de imunidade quando administradas parentericamente. Uma vez que a própria doença induz imunidade, deve concluir-se que a imunidade intestinal local mediada por IgA segregada é provavelmente o aspecto mais importante da imunidade à cólera adquirida. Para estimular a imunidade local no intestino, os antigénios bacterianos têm de ser transportados através da barreira ácida e proteolítica do estômago. Por esta razão, foram propostas vacinas orais vivas contra a cólera.

Isolaram-se mutantes de V. cholera que não produzem a toxina ou que produzem unicamente a subunidade B da toxina [Finklestein et al., (1974), J. Infect. Dis. 129: 117-123; Honda et al (1979) Proc.Natl.Acad. Sci. USA 76: 2052-2056; Mekalanos et al., (1982), Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79: 151-155]. No entanto, para ser um candidato óptimo a vacina anti-colérica viva, um mutante deve ser: 1) bem caracterizado e geneticamente estável (isto é, não deve reverter para a forma selvagem, produtora de toxina); 2) colonisar bem o intestino; e 3) produzir imunidade alargada

de longa duração. Os mutantes produzidos até agora, por exemplo, os produzidos por mutagênese química ou os produzidos a partir de estirpes afins que não se sabe terem capacidades de colonização e de produção de imunidade podem causar problemas em qualquer das três áreas descritas acima, embora testes preliminares em voluntários humanos demonstre que são relativamente inócuos e que induzem imunidade significativa [Woodward *et al* (1975), Proc. 11 th Jt. Conf. on Cholera NIH, p. 330; Holme *et al*, Acute Enteric Infections in Children, New Prospects for Treatment and Prevention (1981), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Ch. 26, pp. 443 *et seq.* (Levine *et al*)].

O invento consiste, num aspecto, numa forma geneticamente estável, não toxinogénica, de estirpe Ogawa 395 de Vibrio cholera, e qual tem uma deleção em ambas as cópias do gene que codifica para o peptídeo A, (ctx A), resultando na perda de uma sequência genética necessária à expressão de um peptídeo tóxico A₁.

Nas aplicações preferidas, ambas cópias da sequência genética de ctx A estão ausentes, pelo menos a porção da sequência genética que codifica para os aminoácidos 41 a 101 (e, de preferência, para os aminoácidos 10 a 164) da subunidade A₁; ou a sequência genética de ctx B está intacta, ou a mutação de deleção inclui uma porção do gene que codifica para a subunidade B necessária à expressão de uma subunidade B eficaz; e a linha celular do V. cholera tem as características identificadas dos Depósitos n.ºs. 39346 ou 39347 da ATCC (American Type Culture Collection).

Por outro lado, o invento consiste numa técnica de construir uma forma geneticamente estável de V. cholera que é incapaz de expressar um peptídeo tóxico A₁, e um plasmídeo utilizado nessa técnica.

Nas aplicações preferidas, a técnica inclui os passos de isolamento de um primeiro plasmídeo que contém os genes ctx A e ctx B e segmentos, de DNA que ladeiam ambos os lados dos genes; construção de um segundo plasmídeo a partir do primeiro, no qual sofreu deleção uma sequência do gene que codifica para o peptídeo A₁ necessária à expressão de um peptídeo A₁ toxinogénico; recombinação de um segmento do segundo plasmídeo que inclui os segmentos que ladeiam os genes com o cromossoma de uma estirpe de V. cholera que se sabe colonizar o intestino e ser imunogénica, substituindo assim uma cópia do gene ctx A do cromossoma pela mutação de deleção; e fazer culturas dos microrganismos resultantes durante várias gerações para permitir a transferência espontânea da mutação para a outra cópia do gene ctx A. Também nas aplicações preferidas

desta técnica, o segundo plasmídeo inclui uma marca genética para verificar o passo de recombinação, a estirpe utilizada para este passo é a Ogawa 395 e a deleção envolvida é tal como foi descrito acima.

O plasmídeo compreende uma sequência de DNA que corresponde ao segmento do cromossoma que ladeia o gene ctx A-ctx B de uma estirpe de V. cholera e o plasmídeo não possui pelo menos um segmento do gene ctx A necessário à expressão de um peptídeo A₁ tóxico.

Outras características e vantagens do invento são aparentes a partir da seguinte descrição das aplicações preferidas e das reivindicações.

Descrição das Aplicações Preferidas

Descreverei primeiro os desenhos das aplicações escolhidas.

A Fig. 1 é um diagrama que representa os passos da técnica de construção de um plasmídeo para ser recombinado com o cromossoma de V. cholera.

As Fig. 2A e B são diagramas que representam os passos para a recombinação do plasmídeos da Fig.1 com o cromossoma de V. cholera.

A Fig. 3 é uma cópia de uma fotografia de uma análise pela técnica de Southern.

As seguintes abreviaturas aplicam-se às Fig 1 e 2.

Sequências Genéticas

ctx p = promotor da toxina
 A₁ = sequência da subunidade A₁
 A₂ = " " " " A₂
 B = " de B

Marcas de Resistência

Gm = gentamicina
 Tc = tetraciclina
 Km = kanamicina
 Rep = origem de replicação do plasmídeo.

As condições usadas para a digestão dos plasmídeos com os enzimas de restrição indicadas foram as sugeridas pelo fornecedor, New England Biolabs, Beverly, MA. Do mesmo modo, a polimerase T4 do DNA, a Nuclease Bal-31, o fragmento de Klenow e a ligase do DNA foram usadas tal como sugerido pelo seu produto, Bethesda Research Labs, Inc., Bethesda, MD. Os "linkers" Xba I e Eco RI foram adquiridos de New England Biolabs.



Os rectângulos vazios marcados A₁, A₂ e B representam as regiões correspondentes dos genes ctx A e ctx B. Os traços grossos representam DNA de V.cholera adjacente aos genes da toxina.

I. Seleção da estirpe original

A estirpe original de V.cholera utilizada para construir um mutante para vacinas vivas deve induzir protecção duradoura e total e deve colonizar bem o intestino humano. A Ogawa 395 tem demonstrado uma capacidade de induzir uma imunidade que dura três anos, geralmente eficaz contra a infecção por outras estirpes [Cash et al (1974), J. Infect. Dis. 129:45-52]. Também coloniza bem o intestino.

II. Construção do plasmídeo

Em linhas gerais, um plasmídeo (pJM17) preparado a partir de DNA da estirpe selvagem de V.cholera Inaba 569B segundo o método de Pearson e Mekalanos (1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 2976-2980, contém genes de subunidade A da toxina (ctx A) e da subunidade B da toxina (ctx B), assim como da resistência à tetraciclina (Tc^R).

Tal como se descreve na Fig. 1, o plasmídeo pJM17 foi linearizado com Xba I e, em seguida, digerido exonucleoliticamente com Bal31. Uma vez que o local de ataque da XbaI está dentro do gene ctx A, este método resulta na deleção de sequências de ctxA. A ligação dos produtos de digestão de Bal-31 na presença de um "linker" Xba I resultou na construção e isolamento do plasmídeo pJM17.23. A reunião dos fragmentos PstI-XbaI de pJM17 e pJM17.23 resultou na construção de pJM23. Este plasmídeo contém uma deleção interna de 450 pares de bases em ctxA. A posição desta deleção dentro do gene ctx A foi confirmada pela determinação da sequência do DNA, que demonstrou que mais de 80% da sequência necessária à produção do peptídeo A₁, tinha sofrido deleção. Especificamente, a deleção de ctx A transportada por pJM23 remove o DNA que codifica para os resíduos aminoácidos 10 a 164. Uma vez que o peptídeo A₁ enzimaticamente activo tem o comprimento de 192 resíduos aminoácidos esta deleção remove 80% da informação necessária para A₁. A sequência de DNA da deleção de ctxA é apresentado abaixo:

AGT AAC TTA GAT ATT GCT CCA GCA GCA GAT GGT TAT GGA TTG GCA GGT TTC CCT
CCG GAG CAT AGA GCT TGG SER ASN LEU ASP ILE ALA PRO ALA ALA ASP GLY TYR
GLY LEU ALA GLY PHE PRO PRO GLU HIS ARG ALA TRP

continua para o residuo # 10

Foi descrito que um fragmento do peptídeo A₁ de 12500 dalton de peso molecular que contém a região de MET-41 a MET-101, retém 35% da atividade enzimática de um peptídeo A₁ completo [Lai et al. (1979), Abstracts of the 11th International Congress of Biochemistry, Toronto, Canada, p. 207, Abstract 03-45173-7]. O local activo do peptídeo A₁, fica, portanto, nesse fragmento de 12,500 dalton e, mesmo se não está dentro da região de 6600 dalton entre MET-41 e MET-101, não pode ficar mais de cerca de 54 amino ácidos (5900 dalton) para lá de MET-101. O local activo está portanto bem dentro da deleção de ctxA do plasmídeo pJM 23. A deleção dos aminoácidos entre o aminoácido 41 e 101 (ou, de preferência, para assegurar a total ausência de toxigenicidade, entre os aminoácidos 10 e 164) assegura a perda da toxigenicidade de A₁.

Demonstra-se que o plasmídeo pJM23 codifica para a produção da subunidade B tanto em E. coli como em V. cholera, demonstrando-se assim que as mutações de deleção em ctxA tem pouco efeito na expressão de ctxB. Os resultados seguintes (Quadro I) foram obtidos testando a subunidade B total produzida em 18 culturas Hr CYE por teste imunoabsorvente de ligação enzimática (ELISA). Menos de 0,005 µg/ml de subunidade B não puderam ser detectados. ND significa "não determinado" porque a experiência foi proibida.

Quadro 1

Produção de subunidade B por plasmídeos recombinantes

<u>Plasmídeo</u>	<u>Em E. coli MS371</u>	<u>Em V. cholera M7922</u>
pJM17	0,3 µg/ml	ND
pJM23	0,2 µg/ml	9,0 µg/ul
pJM290.2	0,05 µg/ml	1,5 µg/ul
pJM23.211	< 0,005 µg/ml	< 0,005 µg/ml
pJM290.211	< 0,005 µg/ml	< 0,005 µg/ml

III. Recombinação com o cromossoma

Ainda com referência à Fig. 1, dois plasmídeos, pJM 23.2 e pJM23211, foram construídas a partir de pJM 23. Fragmentos desses plasmídeos foram então clonados noutro plasmídeo (RK290) [Runken et al (1981), Nature (London) 289:85-88] para utilização nas substituições de marcas representadas na Fig. 2 e descritas abaixo.

A. Estirpe 0395-N1 do Plasmídeo pJM23



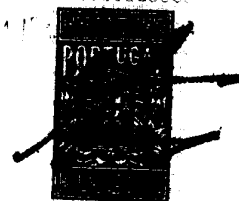
Como se mostra na Fig. 1, pJM 23 é convertido num plasmídeo derivado pJM 23.2 por digestão com Pst I e polimerase T₄, seguida por ligação na presença de "linker" Eco RI. pJM 23.2 é idêntico a pJM23, excepto no facto do local Pst I ter sido substituído por um local Eco RI. A partir de pJM 23.2, constrói-se um plasmídeo (pJM 23.211) com um fragmento de DNA que codifica para a resistência à Kanamycina (Km^R) inserido aproximadamente na junção da deleção ctxA e ctxB originalmente em pJM23.

Isto é realizado por meio da digestão de pJM 23.2 com XbaI na presença de produtos de XbaI do plasmídeo pJM22 que transporta Km^R ladeada por locais XbaI/Hinc II. O plasmídeo resultante pJM 23.21 é digerido por Hinc II e ligado para criar pJM 23.211, o qual tem uma deleção de ctxA começando no aminoácido 10 e extendendo-se através de ctxB até ao local Hinc II.

O gene Km^R fornece uma marca selectiva com a qual se podem obter os recombinantes de 0395 que substituíram ambos os seus genes ctxA residentes pela mutação de deleção transportado por pJM23.211.

Utiliza-se então uma técnica de substituição de marcas para efectuar a recombinação com o cromossoma, tal como se segue: primeiro é feito um derivado espontâneo de 0395 resistente à estreptomicina (Sm^R) plaqueando cerca de 10¹⁰ células Ogawa 0395 em meio contendo 100 µl de estreptomicina. Este derivado é utilizado em todas as experiências subsequentes. O plasmídeo pJM290.211 é transferido para 0395 Sm^R por conjugação, utilizando o plasmídeo RK2013 [Ruvkin *et al.* (1981) *Nature* (London) 289: 85-88] como mobilizador. As células 0395 Sm^R transportando pJM290.211 são Sm^RTc^RKm^R. São superinfectadas com outro plasmídeo pHI1 [pHI1 é o mesmo que o plasmídeo pHI1J1 descrito por Berlinger *et al.* (1978) *Nature* 276:633-634], o qual é Gm^R e são seleccionadas as colónias Gm^RKm^R. pHI1 e pJM290.211 não podem coexistir estavelmente na mesma célula por causa de uma barreira de incompatibilidade. Assim, para que a célula permaneça Km^R, precisa de se recombinar com o DNA que codifica para esta resistência no cromossoma 0395.

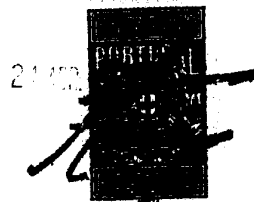
A Fig. 2A representa a ligação cruzada entre a cópia cromossómica dos genes ctx e a deleção derivada transportada pelo plasmídeo pJM290.211. Os recombinantes adequados foram recuperados por superinfectação com o plasmídeo incompatível e selecção de Gm^R e Km^R. A estrutura de tal recombinante, 0395-NT, é mostrada. O local do cromossoma 0395 em que Km^R vai ficar é determinado pelas sequências de DNA que ladeiam o fragmento Km^R. Uma vez que estas são derivadas do DNA que ladeia os genes da toxina no cro-



mossoma, dá-se o resultado apresentado na Fig. 2A e os genes residentes são substituídos pelos genes mutantes transportando o fragmento inserido Km^R . A extensão do DNA de pJM 23.211 que ladeia os loci ctx A e ctx B e que corresponde à sequência de DNA cromossômico selvagem pode ser expressa como a distância entre o local Eco RI e o local Xba I no fragmento do gene A em pJM 23.21 (2,7 kb) e a distância entre o local Hinc II no gene B e o local Eco RI adjacente ao gene Tc^R (1,4 kb). Assim, a mutação de deleção recombina-se com o cromossoma e substitui uma cópia normal do locus ctx.

Uma vez que 0395 possui duas cópias do locus da toxina, é necessário recombinar a mutação de deleção 290.211 em ambas. Surpreendentemente, isto é conseguido simplesmente fazendo crescer as estirpes que transportam uma marca substituída durante várias gerações em que as recombinações resultaram na transferência espontânea da mutação noutra cópia. Os derivados 0395 transportando as mutações de deleção em ambas as cópias são então reconhecidas por hibridização de colônias utilizando uma sonda (o fragmento XbaI/Hinc II de 0,95 kb de pJM17) que hibridiza especificamente com o DNA ausente na mutação de deleção. As que não reagem a esta sonda são em seguida verificadas por hibridização de Southern para confirmar a perda da sequência removida pela deleção. A migração das bandas confirma que as deleções da dimensão esperada do gene A são introduzidos em ambas as cópias dos dois genes ctx residentes de 0395 para dar origem à estirpe 0395-NT.

Como se esperava para a deleção ctx A-ctx B, a estirpe 0395-NT não produz nem a subunidade A nem a subunidade B, uma vez que as porções de ambas estes genes sofreram deleção em pJM290.211. Os resultados abaixo (Quadro 2) apresentam o antígeno da subunidade B total produzida em 18 culturas Hr CYE e testadas por ELISA. Menos de 0,005 $\mu\text{g/ml}$ da subunidade B não puderam ser detectados. A actividade da toxina total é expressa em termos de $\mu\text{g/ml}$ de toxina colérica. O mesmo fluido sobrenadante da cultura foi testado como referido acima para a subunidade B. O teste de toxicidade foi o teste de célula-CHO realizado como foi descrito por Guerant et al (1974) Infect. Immunol 10: 320-327.



Quadro 2

Subunidade B e Actividade Toxínica Produ-
zidas por Derivados de V. cholera

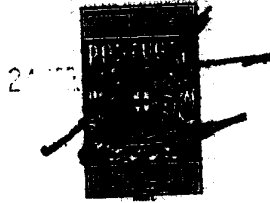
<u>Estirpe</u>	<u>Antigénio de Subunidade B</u>	<u>Actividade Toxínica</u>
0395	0.3 $\mu\text{g/ml}$	0.3 $\mu\text{g/ml}$
0395-NT	< 0.005 $\mu\text{g/ml}$	< 0.001 $\mu\text{g/ml}$
0395-N1	0.3 $\mu\text{g/ml}$	< 0.001 $\mu\text{g/ml}$

B. Estirpe 0395-N1

A construção presente em pJM23.2 e recombinada com o cromossoma por meio de uma técnica de substituição de marcas. O plasmídeo pJM290.2 é formado por transferência de um fragmento de 4,6 kb de pJM23.2 em RK 290. O plasmídeo pJM290.2 é então transferido para a estirpe 0395-NT que tem cada uma das suas duas cópias de ctx ligadas a uma Km^R . A introdução de pJM290.2 nesta estirpe permite então que as recombinações subsequentes substituam as cópias ligadas a Km^R com a construção em pJM290.2. Estas colónias recombinantes são reconhecidas pela sua sensibilidade a KM.

Especificamente, tal como é apresentado na Fig.2B, a estirpe foi curada de pHI1 e pJM290.2 foi então transferido para a estirpe. Após cerca de 50 gerações de crescimento, os recombinantes Km^R espontâneos foram isolados por meio de réplicas. Um destes foi curado de pJM290.2 e tem a estrutura que se apresenta (0395-N1). A hibridização de Southern para confirmar a estrutura de um destes que dão origem à estirpe 0395-N1 é feita como se segue.

É preparado DNA a partir das estirpes 0395 e 0395-N1. O DNA é digerido com XbaI e analisado pelo método de Southern (1975), J.Mol.Biol. 98: 503-517 que com a sonda A1 (o fragmento XbaI-Hind III fragmento de 580 pares de bases de EWD299 [Dallas (1979) J.Bact.139: 850-858], quer com a sonda B (o fragmento Eco RI-Hind III de 590 pares de bases de EDW 299). Os dois loci ctx de 0395 são vistos como duas bandas que reagem com ambas as sondas. A estirpe 0395-N1, todavia, reage unicamente com a sonda B e as bandas que reagem são de tamanho mais pequeno devido à deleção de ctxA originalmente presente em pJM23. A Fig. 3 é uma cópia de uma fotografia de hibridizações de Southern mostrando que 0395-N1 perdem a sequência homóloga a uma sonda derivada da região A₁, mas retém a sequência da subunidade B, a qual reside em fragmentos de restrição que são mais pequenos do que a deleção de ctx A₁, noplasmídeo pJM 23 (450 pares



de bases). Consistente com este resultado, 0395-N1 produzia quantidades normais de subunidade B quando comparada com a estirpe de origem 0395, mas não apresentava toxicidade em células-CHO. Deste modo, 0395-N1 é idêntica à estirpe de origem 0395 excepto na deleção de ctxA originalmente presente em pJM23.

As estirpes e plasmídeos resultantes foram depositados na American Type Culture Collection e têm os seguintes números de depósito:

Estirpe 0395-N1	39346
Estirpe 0395-NT	39347
Plasmídeo pJM290.2	39348
Plasmídeo pJM290.211	39349

As amostras dos depósitos da ---- ATCC estarão disponíveis após o registo desta patente nos Estados Unidos, publicação de um requerimento de patente europeia ou japonesa ou de acordo com as leis de qualquer país em que é feito um requerimento da patente.

IV. Utilização

Tanto a estirpe 0395-N1 como a estirpe 0395-NT são úteis como fontes de protecção imunológica contra a infecção de cólera. São utilizáveis como vacinas mortas ou vivas.

A estirpe 0395-N1 é produzido a partir de uma estirpe original que se sabe colonizar bem o intestino e provocar uma forte reacção imunitária. Demonstrou-se que a estirpe mutante estava alterada unicamente no facto de ter uma mutação de deleção que impede a expressão de uma subunidade A₁ toxinogénica. A estirpe é útil, por exemplo, como vacina preparada e administrada nas doses e condições descritas em Holme et al, Acute Enteric Infections in Children, New Prospects for Treatment and Prevention (1981), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Cap. 26, pp. 443 et seq. (Levine et al).

O facto de os indivíduos infectados com o V. cholera Ogawa 395 toxinogénico não excretarem quantidades significativas de células intactas indica que está envolvida uma defesa imunitária dirigida às células, além das defesas anti-toxina. A estirpe 0395-NT, embora não possua a informação genética necessária para produzir a subunidade B da toxina, possui, no entanto, outras características imunogénicas da Ogawa 395 e é útil como vacina preparada e administrada como dito acima.

Os plasmídeos e métodos descritos aqui são úteis para construir as estirpes 0395-NT e 0395-N1 e podem também ser usados para construir

estirpes que expressem a subunidade B com qualquer outro antigénio. Tais estirpes poderiam então ser utilizados numa vacina para aproveitar a maior imunogenicidade que se obtém ligando um antigénio à subunidade B e utilizando assim a subunidade B como veículo de reconhecimento e ligação à célula.

- R E I V I N D I C A Ç Õ E S -

1. Processo de construção de uma estirpe geneticamente estável de Vibrio cholera Ogawa 395 que tem uma mutação de deleção em ambas as cópias do gene que codifica para o peptídeo A_1 (ctxA₁), resultando na perda de uma sequência genética necessária à expressão de um peptídeo tóxico A_1 .

2. Processo de construção da estirpe da reivindicação 1 em que ambas as cópias do gene ctxA₁ estão ausentes, pelo menos a porção de sequência genética que codifica para os resíduos aminoácidos de 41 até 101.

3. Processo de construção da estirpe da reivindicação 1 em que ambas as cópias do gene ctxA₁ estão ausentes, pelo menos a porção da sequência genética que codifica para os resíduos aminoácidos de 10 até 101.

4. Processo de construção da estirpe da reivindicação 1 em que ambas as cópias do referido gene ctxA₁ não possuem pelo menos 80% da sequência necessária à expressão do peptídeo A_1 .

5. Processo de construção da estirpe da reivindicação 1 em que a sequência do gene ctxB está intacta.

6. Processo de construção da estirpe da reivindicação 1 em que a sequência genética selvagem está em tudo o resto intacta, excepto no que diz respeito à referida mutação de deleção.

7. Processo de construção da estirpe da reivindicação 1 em que a referida mutação de deleção inclui uma porção do gene que codifica para a subunidade B (ctx B) necessária à expressão de uma subunidade B eficaz.

8. Processo de construção de uma forma geneticamente estável de Vibrio cholera que é incapaz de expressar um peptídeo tóxico A_1 incluindo

fornecer uma estirpe selvagem de Vibrio cholera com, pelo menos, duas cópias do gene ctxA₁ no seu cromossoma e que se sabe colonizar o intestino e ser imunogénica; provocar uma mutação de deleção em uma das có



-12-

pias do gene ctxA de uma sequência genética da referida estirpe necessá-
ria à expressão de um peptídeo tóxico A_1 ; e fazer crescer o resultante
Vibrio cholera alterado durante várias gerações para permitir a trans-
ferência espontânea da alteração para a segunda cópia do gene ctxA do re-
ferido cromossoma.

9. Processo da reivindicação 8 em que o referido passo de delec-
ção inclui as seguintes etapas

fornecer DNA de uma estirpe selvagem de Vibrio cholera; isolar
a partir dessa estirpe um primeiro plasmídeo que contém os genes ctxA e
ctxB e segmentos de DNA que ladeiam ambos os lados desses genes na refe-
rida estirpe; construir um segundo plasmídeo a partir do primeiro, sendo
o segundo plasmídeo alterado, pelo facto de pelo menos um segmento do ge-
ne ctxA necessário à expressão de um peptídeo tóxico A_1 ter sofrido de-
leção; e recombinar um segmento do segundo plasmídeo que inclui os re-
feridos segmentos que ladeiam os referidos genes no cromossoma de uma es-
tirpe de Vibrio cholera que se sabe colonizar o intestino e ser imunogé-
nico, substituindo deste modo uma cópia do gene ctxA do referido cromos-
soma.

10. Processo da reivindicação 9 em que o segundo plasmídeo possui
uma marca para verificar o referido passo de recombinação.

11. Processo da reivindicação 9 em que a referida estirpe usada
para recombinação com o segundo plasmídeo é Ogawa 395.

12. Processo da reivindicação 9 em que o segmento delectado do re-
ferido gene ctxA inclui pelo menos a porção da sequência genética que co-
difica para os resíduos aminoácidos de 41 até 101.

13. Processo da reivindicação 9 em que o segmento delectado do re-
ferido gene ctxA inclui pelo menos a porção da sequência genética que co-
difica para os resíduos aminoácidos 10 a 164.

14. Processo da reivindicação 9 em que o segmento delectado do re-
ferido gene ctxA inclui pelo menos 80% da sequência necessária à expres-
são do peptídeo A_1 .

15. Processo de construção de um plasmídeo que inclui uma sequên-
cia de DNA que corresponde a um segmento do cromossoma que ladeia o gene
ctxA - ctxB de uma estirpe de Vibrio cholera em que o referido plasmídeo
não possui pelo menos um segmento do gene ctxA necessário à expressão de
um plasmídeo tóxico A_1 .

62 574
SKB CASE 14208

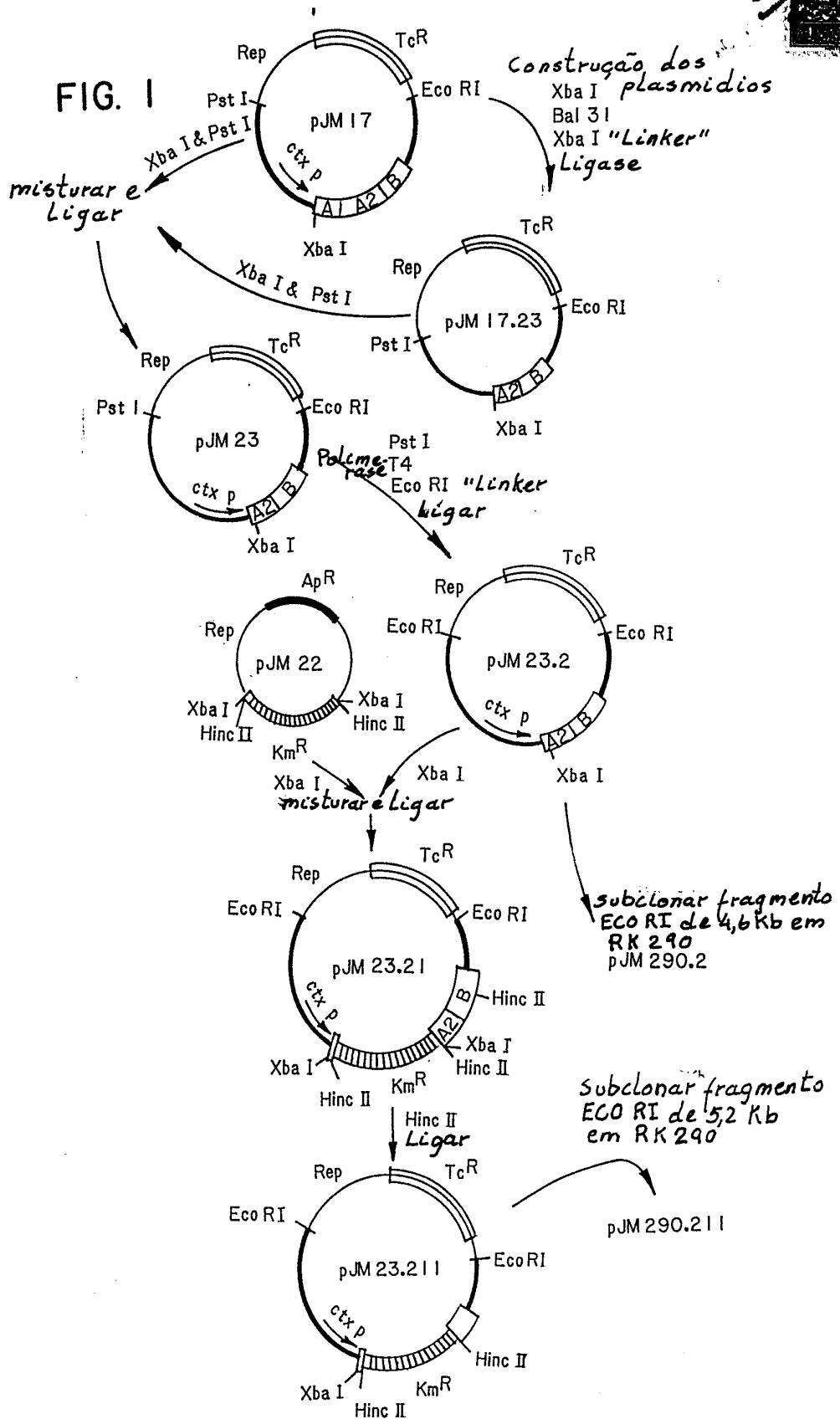
-13-

Lisboa, 24 MAR 1984

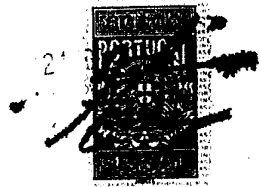
PELA PRESIDENT AND FELLOWS OF
HARVARD COLLEGE

- O AGENTE OFICIAL -

A handwritten signature in black ink is written over a rectangular stamp. The stamp is dark and has the word "PORTUGAL" printed at the top. The signature is a cursive name, possibly "J. J. ...", with a long horizontal stroke extending to the right.



President and Fellows of Hayward College



substituição de marcas FIG. 2A

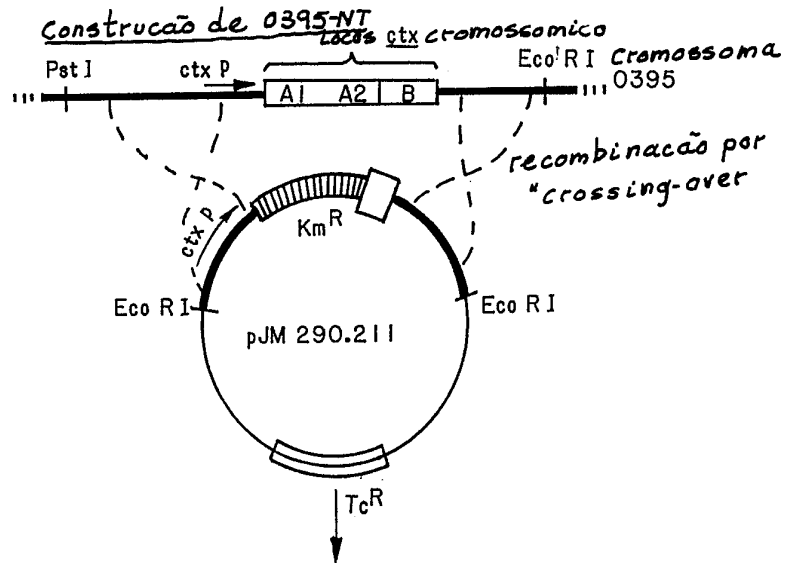
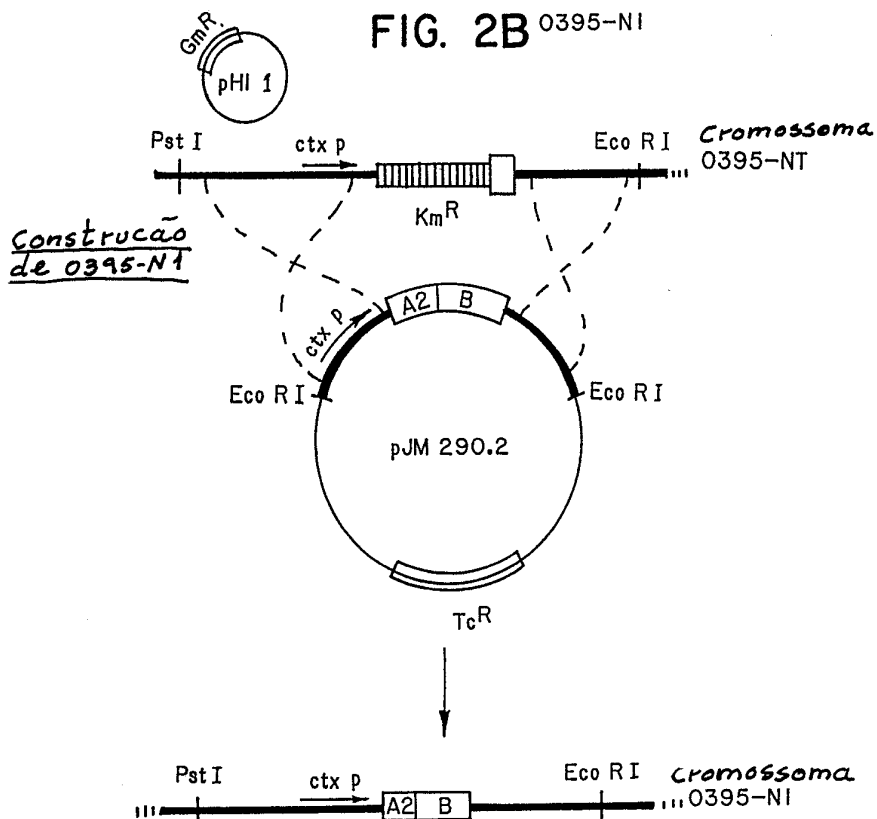


FIG. 2B 0395-N1



President and Fellows of Harvard College

Três folhas (III)



FIG. 3



N1
O395 A₁



N1
O395 B

President and Fellows of Harvard College