

(11) *Número de Publicação:* PT 88362 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)
C12N015/86 A

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i>	1988.08.26	(73) <i>Titular(es):</i> THE WELLCOME FOUNDATION LTD. 183-193, EUSTON ROAD LONDRES NW1 2BP GB
(30) <i>Prioridade:</i>	1988.05.06 GB 8810808	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i>	1989.11.30	(72) <i>Inventor(es):</i> BRIAN COLIN RODGERS MARTIN JOHN PAGE GB GB
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i>	01/94 1994.01.10	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT
(54) <i>Epígrafe:</i>	PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE VECTORES DE BACULOVIRUS	
(57) <i>Resumo:</i>		

[Fig.]

Descrição referente à patente de invenção de THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED, britânica, industrial e comercial, com sede em 183-193 Euston Road, London NW1, Inglaterra, (inventores: Martin John Page e Brian Colin Rodgers, residentes na Inglaterra), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE VECTORES DE BACULOVIRUS".

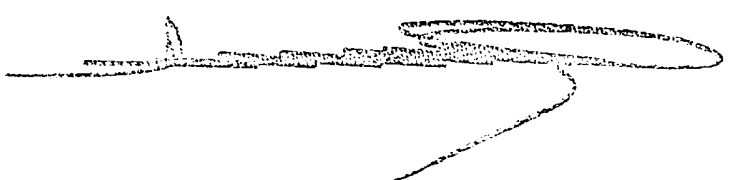
Descrição

A presente invenção diz respeito a vectores de transferência de baculovírus e à sua utilização.

Tem-se utilizado o sistema de vectores de baculovírus para expressar genes procarióticos e eucarióticos. A expressão destes genes é controlada pelo promotor de poliedrina de um baculovírus, em particular do vírus de poliedrose nuclear Autographa californica (AcNPV). Os genes estranhos são expressos em células de insectos em cultura, as quais são infectadas com baculovírus recombinantes incorporando o gene estranho.

A fim de se obter um baculovírus recombinante, utiliza-se um vector de transferência de baculovírus. Este vector contém o promotor de poliedrina. Proporciona-se o ADN de baculovírus adjacente ao gene de poliedrina. O resto do vector é normalmente formado por ADN de um plasmídeo bacteriano. Inse-re-se um gene estranho no vector de transferência a jusante do promotor de poliedrina de modo a que a sua expressão seja regulada por este promotor.

Células de insectos susceptíveis a infecção por

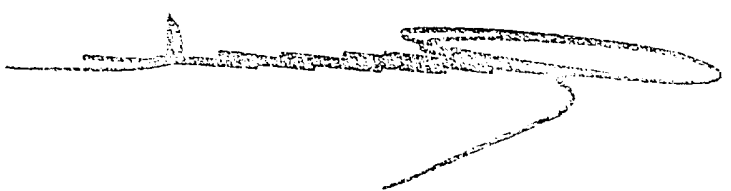


baculovírus são então co-transfectadas pelo vector de transferência contendo o gene estranho e um baculovírus. Normalmente utilizam-se culturas de células de Spodoptera frugiperda. Ocorre então uma recombinação homóloga envolvendo o ADN viral no vector de transferência a montante e a jusante do gene estranho e o ADN correspondente do baculovírus. O gene estranho e o seu promotor de poliedrina são, portanto, transferidos para o baculovírus. O baculovírus recombinante é cultivado para expressar o gene estranho.

Há dois tipos de vectores de transferência de baculovírus. Em primeiro lugar, há vectores de transferência que contêm um local de restrição no qual se pode clonar um gene estranho a jusante do codão de início de poliedrina ATG para tradução. Estes vectores de transferência dão como resultado proteínas de fusão nas quais o produto do gene estranho se encontra fundido a uma porção N-terminal do peptídeo de poliedrina.

Em segundo lugar, há vectores de transferência cujo guia 5' não traduzido do gene de poliedrina termina antes do codão de tradução ATG natural para poliedrina e é então proporcionado um local de restrição. Um vector de transferência como este é pAc373 no qual o guia 5' não traduzido acaba 8 bases a montante do ATG de poliedrina natural. Genes clonados no local de restrição são expressos como proteínas maduras se contiverem um ATG seguido por um quadro de leitura livre que codifique para o produto desejado.

De acordo com a presente invenção, é proporcionado um vector de transferência de baculovírus que contém um local de restrição no qual se pode clonar um gene estranho a uma curta distância a jusante da extremidade N-terminal do corpo do gene de poliedrina e no qual o codão de início de tradução ATG natural para o gene de poliedrina não é fornecido, de tal modo que a sequência que codifica para a poliedrina N-terminal antes do local de restrição é conservada mas não é capaz de ser traduzida.



No vector de transferência do baculovírus da presente invenção é, portanto, proporcionada uma sequência não-codificante em substituição do codão de tradução ATG natural para poliedrina. O corpo N-terminal da sequência de codificação de poliedrina não é agora traduzido mas desempenha o papel de uma sequência guia aumentada. É, portanto, proporcionado um vector de transferência de baculovírus alternativo útil, conservando a informação da sequência de ADN, o que pode ser benéfico para expressão de proteínas maduras, atribuível ao corpo N-terminal da sequência de codificação de poliedrina. Chegamos à conclusão de que um gene estranho proporcionado com um codão de início de tradução ATG pode ser expresso em elevados rendimentos quando clonado no local de restrição do vector de transferência. Constitui uma vantagem o facto de que o produto expresso não está na forma de uma proteína de fusão incorporando ácidos aminados residuais de poliedrina N-terminal.

É proporcionado um local de restrição no vector de transferência de baculovírus a jusante e a uma curta distância da extremidade N-terminal do corpo do gene de poliedrina. O local de restrição pode ser proporcionado após as primeiras 24 a 50 bases, por exemplo após as primeiras 27 a 39 bases, da região N-terminal do gene de poliedrina. De preferência, o local é proporcionado aproximadamente após as primeiras 33 bases. Por exemplo, pode ser inserido um adaptador BamH1.

O codão de início de tradução de poliedrina ATG natural é alterado para informação não-codificante. O codão de início pode ser substituído por qualquer outro conjunto de três nucleótidos. De preferência há uma única mudança de base no codão ATG natural, de modo especialmente preferido na terceira base do codão. O codão ATG pode, portanto, ser alterado para ATA, ATT ou especialmente ATC. Assim, a expressão do corpo N-terminal do gene de poliedrina não ocorrerá mas, em vez disso, começará no primeiro ATG encontrado dentro de uma sequência introduzida no local de restrição. Deste modo, a informação da

sequência de ADN presente dentro do corpo N-terminal do próprio gene de poliedrina pode contribuir para expressão elevada de um gene estranho.

Um vector de transferência preferido é o plasmídeo pAc360. Este plasmídeo foi construído a partir do vector de transferência pAc360 (Summers and Smith, 1987, "A Manual of Methods for Baculovirus vectors and Insect cell culture procedure" (Um Manual de Métodos para Vectores de Baculovírus e Procedimento de cultura de células de Insectos)) por mutagénese dirigida, na qual o codão de tradução ATG para poliedrina dentro de pAc360 foi convertido para ATC.

pAc360

TATAAAT ATG CCG GAT TAT TCA TAC CGT CCC ACC ATC GGG (Bam H1)
Corpo N-terminal traduzido de gene de poliedrina

pAc36C

TATAAAT ATC CCG GAT TAT TCA TAC CGT CCC ACC ATC GGG (Bam H1).

De acordo com a presente invenção, pode-se construir um vector de transferência de baculovírus por mutação para uma sequência não-codificante do codão de início de tradução ATG natural para poliedrina de um vector de transferência de baculovírus no qual se proporciona a uma curta distância a jusante da extremidade N-terminal do corpo do gene de poliedrina um local de restrição em que se pode clonar um gene estranho. Isto é normalmente conseguido através de mutagénese dirigida para determinado local. Uma mutação, de preferência uma mutação pontual, pode ser introduzida usando um oligonucleótido sintético compreendendo a sequência desejada.

Um baculovírus recombinante incorporando um gene estranho deriva do vector de transferência por:

(a) clonagem de um gene estranho contendo um codão de início de tradução no vector de transferência de baculovírus

no local de restrição proporcionado; e

(b) co-transfectando células de insectos susceptíveis a infecção por baculovírus com o vector de transferência de baculovírus recombinante da fase (a) e com ADN de baculovírus de tipo selvagem intacto.

O gene estranho é clonado no vector de transferência de baculovírus na fase (a) de modo a estar sob o comando de transcrição do promotor de poliedrina. Normalmente, co-transfectam-se na fase (b) células da linha de células de insectos de Spodoptera frugiperda. A seguir a uma recombinação homóloga, o gene estranho e porções adjacentes de ADN viral são transferidos para o baculovírus AcNPV. Seleccionam-se, por exemplo por análise de placa, e purificam-se os baculovírus recombinantes.

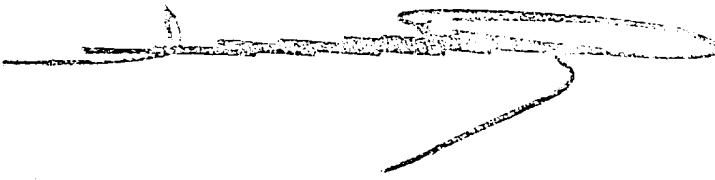
A fim de obter o produto codificado pelo gene estranho, infectam-se células susceptíveis a infecção por baculovírus com o baculovírus recombinante e cultivam-se. De novo, utilizam-se normalmente células da linha de células de insectos de Spodoptera frugiperda. Uma vez que o gene estranho está sob o comando de transcrição do promotor de poliedrina, é possível conseguir elevados rendimentos do produto do gene.

Qualquer gene estranho, procariótico ou eucariótico, pode ser expresso desta forma. Por exemplo, pode-se expressar uma forma madura intracelular de interferão-gama humano ou da proteína precoce imediata de citomegalovírus. Expressá-mos igualmente com sucesso proteínas quiméricas constituídas essencialmente por:

(i) na extremidade N-terminal da proteína quimérica, uma sequência de sinal do precursor aos principais antígenos de superfície merozóitos (PMMSA) de P. falciparum;

(ii) opcionalmente, pelo menos um epítipo da proteína do circumsporozóito (CSP) de P. falciparum; e

(iii) um fragmento C-terminal do PMMSA de P. falciparum com ou sem a sequência de fixação C-terminal.



Podem-se proporcionar, entre estes componentes, pequenas sequências de ligação de mais de 30 resíduos de ácidos aminados. Estas proteínas quiméricas, úteis como vacinas, foram expressas com a configuração correcta. O(s) epítipo(s) CSP (ii) compunha(m)-se de preferência de desde 3 a 50, por exemplo desde 16 a 30, repetições da sequência tetrapeptídica Asn-Ala-Asn-Pro.

Os seguintes exemplos ilustram a invenção. Nos desenhos que os acompanham:

A Figura 1 mostra os genes PMMSA e CSP, as porções deles empregues nos exemplos e os adaptadores sintéticos empregues nos exemplos. Os seguintes locais de restrição estão marcados: A-AluI, B-BamHI, H-HindIII, P-PstI, T-TthIII e X-XhoII. "A" representa a sequência de fixação. "S" representa a sequência de sinal.

A Figura 2 mostra os genes estruturais empregues na obtenção dos vectores de transferência recombinantes e cada baculovírus recombinante dos Exemplos 2 e 3.

A Figura 3 mostra as autoradiografias produzidas por marcação por ³⁵S-metionina no Exemplo 5.

A Figura 4 mostra os resultados da coloração por Azul de Coomassie no Exemplo 5.

A Figura 5 mostra os resultados da coloração por Azul de Coomassie no Exemplo 6.

Exemplo 1: Construção de vector de transferência pAc360

O vector de transferência pAc360 foi derivado do pAc360 (Summers and Smith, 1987, "A Manual of Methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures") por mutagénesis dirigida usando "kits" obtidos de Anglian Biotech e Amersham International. Subclonou-se um ADNc de 852 pb para interferência gama humano sob a forma de um fragmento BamHI no local BamHI de pAc360. A partir deste subclonou-se no local SmaI de M13K19 (Anglian Biotech) um fragmento DraI de 1 kb, o qual se estende



desde cerca de 700 pb a montante do codão de tradução ATG de poliedrina até 300 pb dentro da extremidade 5' da inserção de ADNc do interferão gama. Usou-se a forma RF da construção para confirmar a ligação e derivou-se o molde de cadeia única e mutou-se com o fragmento de 19 bases:

GAATAATCCGGGATATTTA

O G sublinhado teve o efeito de converter o ATG do codão de tradução de poliedrina em ATC. A mutação foi confirmada por sequenciação de ADN e usou-se um fragmento EcoRV-BamH1 de 136 pb contendo a mutação para substituir o mesmo fragmento em pAc360 pelo fragmento mutado para obter o pAc36C por derivação.

Exemplo 2: Construção de vectores de transferência recombinantes derivados de pAc36C

O vector de transferência recombinante pS42 foi construído em três fases. Em primeiro lugar preparou-se pAc36C42 por clonagem do fragmento XhoII/BglIII de 1,46 kb de pPfc1028 (Holder et al., Nature, 317, 270-273, 1985) no local BamH1 de pAc36C. Em segundo lugar, um fragmento de 120 pares de bases da extremidade N-terminal de PMMSA foi cortado de pPfc1017 (Holder et al., 1985) por digestão com HindIII e AluI. Este fragmento contém um guia curto de 12 pares de bases, um codão de início de tradução, o peptídeo de sinal PMMSA de 16 ácidos aminados e 15 ácidos aminados adicionais da extremidade N-terminal de PMMSA. Este fragmento foi subclonado em pUC9 digerido com HindIII e HindII e foi seguidamente cortado sob a forma de um fragmento HindIII/BamH1, tendo o local BamH1 sido proporcionado pelo poliadaptador pUC9. Na fase final de clonagem, este fragmento BamH1/HindIII de 120 pares de bases foi clonado no local singular BamH1 de p36-C42 com um adaptador HindIII/BamH1 de 10 pares de bases sintético, o qual colocou igualmente a fusão no quadro de leitura correcto. O adaptador é apresentado na Figura 1. O gene

incorporado em pS42 sob a regulação do promotor de poliedrina é apresentado na Figura 2.

Construiu-se um segundo vector de transferência recombinante pSC₂₆42 por ligação de três fragmentos: o fragmento BamH1/Pst1 de 1,5 kb usado para construção de pPC₂₆42, um fragmento Xho1/BamH1 de 2,2 kb e um fragmento Xho1/Pst1 de 7 kb cortado a partir de pS42 por digestão com Pst1 e XhoI e digestão parcial com BamH1. O vector pPC₂₆42 foi construído como se segue: (i) construiu-se um vector de transferência recombinante pP42 por conversão do local HindIII de pPfc1028 em BglIII por digestão com HindIII, alinhamento das extremidades com polimerase de Klenow e ligação de adaptadores BglII. Por digestão com XhoII obteve-se um fragmento XhoII/BglII de 1,46 kb o qual se clonou no local BamH1 singular de pAc360, obtendo-se uma fusão em quadro dos primeiros 10 ácidos aminados de poliedrina com os 293 ácidos aminados da extremidade C-terminal de PMMSA. O gene incorporado em pP42 encontra-se apresentado na Figura 2. Este gene está sob a regulação do promotor de poliedrina.

(ii) Para construir o vector pPC₂₆42, clonaram-se 26 cópias da repetição do tetrapeptídeo CSP na junção de poliedrina/PMMSA de pP42 por substituição do fragmento menor BamH1/Pst1 de pP42 com um fragmento de 1,15 kb obtido por digestão com Pst1 e digestão parcial com BamH1 do vector bacteriano de expressão p750/CSPa/P195 (EP-A-0250261).

Outros dois vectores recombinantes de transferência foram construídos com um oligonucleótido sintético a fim de evitar a expressão da sequência de fixação C-terminal de PMMSA. Estas construções com a sequência de fixação suprimida pS42ΔA e pSC₂₆42ΔA, foram feitas pela construção de um adaptador Pst1 de 26 pares de bases sintético contendo códons de paragem de tradução bidireccional em todos os quadros de leitura. Este adaptador está apresentado na Figura 1. Clonou-se o adaptador no local Pst1 singular de pP42 e de pSC₂₆42 logo a montante das presumíveis sequências de fixação à membrana. Os genes em pS42ΔA e em pSC₂₆42ΔA sob a regulação do promotor de poliedrina estão apre-

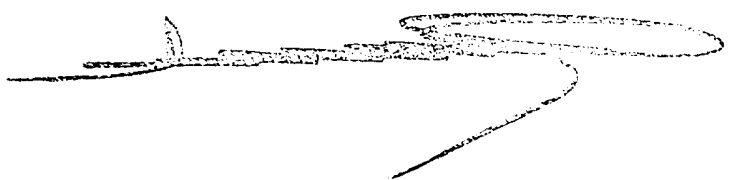
sentados na Figura 2.

Todas as fases de clonagem foram levadas a cabo usando processos normais (Maniatis et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Analisou-se a correcção da ligação e da orientação dos fragmentos por mapeamento pormenorizado da restrição por enzimas. Os plasmídeos usados para transfecção foram purificados a partir de culturas bacterianas por centrifugação com gradiente de cloreto de cézio.

Exemplo 3: Reprodução de vírus recombinantes

Cultivaram-se células (IPLB Sf 21) de Spodoptera frugiperda (Sf) (Vaughn et al, In vitro, 13, 213-217, 1977) em culturas de suspensão a 22°C ou 27°C em meio TC100 (Flow Labs) acrescentado com 10% de soro fetal de bovino (Gibco). Propagou-se AcNPV (estirpe E2) em células Sf cultivadas a 27°C em culturas de suspensão. Geraram-se vírus recombinantes contendo as sequências de gene de P. falciparum, apresentadas na Figura 2, por cotransfecção de uma porção molar de 20:1 dos vectores de transferência recombinantes preparados no Exemplo 2 com ADN de AcNPV purificado a partir de culturas de vírus extracelulares (ECV) em células Sf. O método de purificação do ADN de AcNPV foi conforme descrito (Summers e Smith, 1987) excepto quanto ao facto de as culturas serem infectadas a 1 pfu por célula e recolhidas após 6 dias e de a fase de gradiente de sacarose ter sido omitida. A cotransfecção foi conforme descrito (Summers e Smith, 1987, método 1).

Seleccionaram-se as ECV resultantes para identificação de recombinantes por análise de placa três dias após a transfecção. Foram levadas a cabo análises de placas essencialmente conforme descrito (Brown e Faulkener, J. Gen. Virol., 36, 361-364, 1977) usando diluições em série dos sobrenadantes da cultura de transfecção. Após coloração por vermelho neutro, seleccionaram-se visualmente as placas recombinantes potenciais quanto à ausência de poliedros, retomaram-se em 0,5 ml de meio



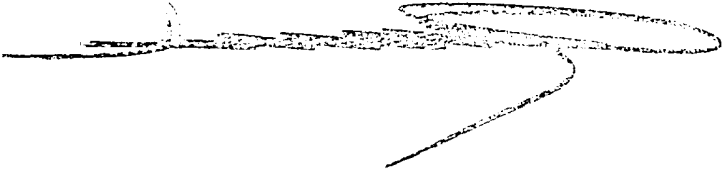
de cultura e purificaram-se por inoculações em placa repetidas. Levou-se a efeito um aumento de escala de culturas de vírus recombinantes a partir de placas ou de culturas em monocamadas e cultivaram-se em grande escala em suspensão ou em culturas em garrafas cilíndricas. O vírus recombinante obtido é apresentado na Figura 2.

Exemplo 4: Análise de Proteínas de Células Infectadas com os Vírus Recombinantes

Os vírus recombinantes potenciais gerados no Exemplo 3 foram inicialmente analisados no que respeita à expressão de sequências de P. falciparum por análise de mancha. Retomaram-se as placas negativas em relação à poliedrina em 0,5 ml de meio de cultura e deixaram-se propagar durante, pelo menos, uma hora. Usaram-se 100 µl desta cultura para infectar 2×10^5 células numa cápsula de Petri de 35 mm e incubou-se à temperatura ambiente durante uma hora. O inóculo foi em seguida substituído por 1 ml de meio de cultura e as placas foram seguidamente incubadas durante três ou quatro dias a 27°C. Lavaram-se em seguida as células uma vez em solução salina com tampão de fosfato (PBS) e separaram-se por centrifugação. Lisaram-se os agregados de células em sulfato de dodecilo e sódio a 1% (SDS) e aplicaram-se sobre filtros de nitrocelulose sob vácuo usando um aparelho de mancha.

Para detecção de proteínas segregadas, o meio foi substituído por 0,5 ml de meio isento de soro três dias depois da infecção e aplicaram-se directamente 100 µl à nitrocelulose após incubação durante vinte e quatro horas a 27°C. Sondaram-se os filtros com um anti-soro policlonal de coelho incitado contra PMMSA nativo seguido de um anticorpo IgG anti-coelho (Sigma) conjugado com fosfatase alcalina. A ligação dos anticorpos foi detectada com um substracto cromogénico.

Para análise mais pormenorizada de lisados celulares e de sobrenadantes de cultura, utilizou-se electroforese



de gel SDS/poliacrilamida (PAGE) sob condições redutoras e não-redutoras seguida por coloração com Azul de Coomassie ou por análise de mancha de Western utilizando uma série de anti-soros específicos e monoclonais. Estes anti-soros eram dois anti-soros policlonais de coelho, um (Pas PMMSA) incitado contra PMMSA nativo, e o outro (Pas NANP) incitado contra um peptídeo sintético correspondendo à repetição tetrapeptídica (NANP) de CSP, ligados a albumina de soro de bovino, e vários anticorpos monoclonais de rato incitados contra PMMSA nativo e reconhecendo epítopes sensíveis a redução conformacional na extremidade C terminal (Mab 111.4, Mab 117.2 e Mab 111.2).

A análise de mancha indicou que produtos antigénicos reconhecidos por Pas PMMSA eram expressos pelos vírus recombinantes vS42 e vSC₂₆₄₂ em células Sf infectadas. As células infectadas com vS42 produziram uma nova proteína que não era visível em geis coloridos por Azul de Coomassie, mas que foi facilmente detectada em mancha de Western como sendo uma proteína de 36 a 38 kd aparecendo sob a forma de três bandas distintas reconhecidas por Pas PMMSA e mais significativamente por Mab 111.4 sob condições não-redutoras. As células infectadas com vSC₂₆₄₂ produziram igualmente uma nova proteína de cerca de 50 kd, que migrava também sob a forma de três bandas pouco espaçadas. A proteína de 50 kd era claramente visível por coloração de Coomassie a níveis de expressão semelhantes aos verificados para o produto de vP42, e era fortemente reconhecida por Pas PMMSA, Pas NANP, Mab 111.4, Mab 111.2 e Mab 117.2. Como se esperava, os anti-soros monoclonais reconheciam a proteína apenas sob condições não redutoras e o reconhecimento de ambos por Pas PMMSA era mais forte com a proteína não-reduzida. Ambos os produtos recombinantes eram insolúveis em Nonidet P40 (NP40), em Rennex (RX) e em desoxicolato (DOC) mas eram solúveis em brometo de cetil-trimetilamónio (CTAB) e em SDS. Os rendimentos das proteínas de fusão foram <1 µg/ml e de 10 a 20 µg/ml para vS42 e vSC₂₆₄₂, respectivamente.

BAD ORIGINAL



Para ambos os vírus recombinantes vS42 Δ A e vSC₂₆42 Δ A as análises de mancha mostraram que as células e os sobrenadantes de culturas infectadas continham produtos anti-génicos reconhecidos por Pas PMMSA. Uma análise por SDS/PAGE revelou novas proteínas de 36 a 38 kD para vS42 Δ A e cerca de 50 kD para vSC₂₆42 Δ A expressas a níveis que eram facilmente visíveis quatro dias depois da infecção em geis coloridos por Azul de Coomassie no lisado celular (aproximadamente 1 a 2 μ g em 1×10^5 células) e igualmente no sobrenadante da cultura a níveis semelhantes.

Tanto as formas segregadas como as não-segregadas das proteínas recombinantes mostravam bandas múltiplas em PAGE, como se verificou para os produtos expressos por vS42 e por vSC₂₆42, e foram ambas reconhecidas por Pas PMMSA, Mab 111.4, Mab 111.2 e Mab 117.2, e o produto de 50 kD de vSC₂₆42 foi igualmente reconhecido por Pas NANP. O reconhecimento pelos ACMS foi verificado apenas sob condições não-redutoras e o reconhecimento por Pas PMMSA foi intensificado no estado não-reduzido. Ambos os produtos recombinantes foram encontrados na fracção solúvel do extracto celular e as formas segregadas foram completamente dissolvidas. Os rendimentos das proteínas de fusão foram de 7,5 μ g/ml e 10 μ g/ml para vS42 Δ A e vSC₂₆42 Δ A respectivamente.

Exemplo 5: Expressão do Gene Precoce Imediato (IE) Principal de Citomegalovírus Humano (HCMV) em Diferentes Vectores de Baculovírus

O gene precoce imediato principal de HCMV codifica para uma molécula em série de 1736 nucleótidos, compreendendo 4 exões e produz uma proteína de peso molecular 72 a 76 k por SDS-PAGE. Cortou-se ADNc precoce imediato clonado em pUC9 (Akrigg et al, 1985, Virus Research, 2 107-121) com Bam HI a fim de libertar um fragmento contendo toda a sequência de codificação mais cerca de 145 pb de sequência guia não traduzida 5'

e 90 pb da sequência não traduzida 3'. Este fragmento foi purificado em gel e clonado em ADN de fosfatase dos vectores de transferência de baculovírus pAc373 e pAc36C digerido por Bam HI.

Geraram-se recombinantes de baculovírus por cotransfecção de plasmídeo e ADN de AcNPV de tipo selvagem em células de Spodoptera frugiperda. Isolaram-se os baculovírus recombinantes resultantes por recombinante homólogo, por selecção visual para placas negativas de inclusão e, subsequentemente por purificação dupla de placas.

Analísaram-se níveis de expressão comparativa por marcação com ^{35}S -metionina, SDS-PAGE, análise de mancha de Western e ELISA.

i) Marcação com ^{35}S -metionina: Infectaram-se células de Spodoptera frugiperda (2×10^6 células/cápsula de 3 cm) numa m.d.i. (multiplicidade de infecção) de 2 e incubaram-se a 28°C . Após 24 horas, enxaguaram-se as células 2 x em PBS e marcaram-se, durante uma hora, em TC100 isento de metionina contendo 20 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -metionina. Após terem sido marcadas, as células foram lavadas 3 x em PBS e analisaram-se os lisados celulares totais por SDS-PAGE (10^6 células/pista) e autoradiografias.

Os resultados estão apresentados na Figura 3. Na Figura 3 os pontos de tempo 24, +4 e +24 referem-se a uma pulsação inicial de 24 horas com ^{35}S -metionina seguida por perseguição de 4 e 24 horas com metionina não marcada. O ponto de tempo 48 refere-se a um batimento às 48 horas com ^{35}S -metionina. "U" indica células não infectadas.

Uma análise densitométrica mostra os níveis de incorporação de metionina em produto recombinante, 4 a 5 vezes mais elevado com pAc36C (36C-IE) do que com pAc373 (373-IE).

(ii) Coloração por Azul de Coomassie/SDS-PAGE: O gel de (i) foi igualmente colorido para proteína total usando



Azul de Coomassie. Os resultados estão apresentados na Figura 4. Como se pode verificar, a quantidade de proteína recombinante na pista pAc36C (36C-IE) é muito mais elevada do que o da pista pAc373 (373-IE).

Exemplo 6: Expressão de uma Forma Intracelular Madura de Interferão Gama Humano

Cortou-se um fragmento AvaII-NcoI de 852 pb de pIFN -G4 (Nishi et al, J. Biochem. 97, 153-159, 1985) e ambas as extremidades foram modificadas com adaptadores BamHI. Este fragmento foi subclonado no local BamHI singular de pAc36C para gerar pAc36C-11. A partir deste último, o ADNc do interferão gama inteiro foi cortado obtendo-se um fragmento Sal I-Hind III de 2,74 kb e foi clonado nos locais homólogos no poliadaptador do RF M13mpl8. Os locais Sal I-Hind III de 2,74 kb eram do local Sal I aproximadamente 820 pb a montante do codão de iniciação de tradução ATG transformado para ATC para o gene de poliedrina para o local Hind III aproximadamente 500 pb a jusante do codão de terminação de tradução para o gene de poliedrina. Usou-se o clone M13 recombinante para gerar o molde de cadeia único. Este foi temperado dando um oligonucleótido de 33 bases com a sequência:-

TACATATGGGTCCCTGCATCCCGATGGTGGGACG

Este oligonucleótido foi utilizado para fundir com precisão a sequência 5' de poliedrina de pAc36C a um codão de início de tradução ATG, seguido da sequência para a forma não-segregada madura do interferão gama humano. Esta operação está ilustrada abaixo, com o oligonucleótido de supressão de 33 bases sublinhado:-

	Extremidade
Guia de	N-terminal do corpo de gene de poliedrina
poliedrina	

	agora como guia ampliado
• ACCTATAAAT	ATCCCGGATTATTTCATACCGTCCCA ^{CC} CATCGGG
•	
•	

Forma madura do
interferão gama

ATG CAG GAC CCA TAT GTA

Usou-se o "kit" de mutagênese comercializado por Amersham International para levar a cabo a mutagênese de supressão. Identificaram-se placas M13 recombinantes por hibridação com o oligonucleótido de 33 bases, o qual tinha sido tratado com quinase com (32 P)-ATP. Escolheram-se as placas positivas, purificaram-se e utilizaram-se para gerar um molde de cadeia única para sequenciação de ADN a fim de confirmar que tinha ocorrido a supressão correcta. Utilizou-se a forma RF de um clone positivo para cortar um fragmento EcoRV-Nde 1 de 135 pb contendo a supressão. Este foi usado subsequentemente numa ligação de três fragmentos, constituída pelo fragmento EcoRV-BamH1 maior de pAc373, o fragmento EcoRV-Nde 1 de 135 pb acima descrito e um fragmento Nde 1-Bam H1 de 585 pb, reconstituindo o restante do gene de interferão gama.

O vector de transferência recombinante assim gerado (chamado p181) foi utilizado para gerar um AcNPV recombinante como está delineado no Exemplo 3. A seguir a infecção de células Sf numa m.d.i. de 5 pfu por célula, as células foram separadas 48 horas após a infecção, lavadas em tampão de PBS, lisadas e purificadas num gel de poliacrilamida-SDS e em seguida coloridas com Azul de Coomassie. As pistas coloridas do gel estão apresentadas na Figura 5, sendo a pista 1: células não infectadas; a pista 2: células infectadas com AcNPV de tipo selvagem; a pista 3: células infectadas com AcNPV recombinante derivado de p181; e a pista 4: marcadores de peso molecular de proteínas. Uma análise por densitometria de exploração apresentou a faixa do interferão gama humano intracelular como 14% da proteína celular total nestas células.



REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a preparação de um baculovírus recombinante que incorpora um gene estranho por

(a) clonagem de um gene estranho contendo um codão de início de tradução num vector de transferência de baculovírus num local de restrição a uma curta distância a juzante da extremidade N-terminal do corpo do gene de poli-hedrina; e

(b) co-transfecção de células de insecto susceptíveis à infecção por baculovírus com o vector de transferência de baculovírus formado na fase (a) e com ADN de baculovírus de tipo selvagem intacto;

caracterizado por o codão natural de início da tradução ATG para o gene da poli-hedrina não estar presente de tal modo que a sequência N-terminal de codificação da poli-hedrina antes do local de restrição é conservada mas não é capaz de ser traduzida.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o local de restrição estar situado após as primeiras 27 a 39 bases da região N-terminal do gene da poli-hedrina.

- 3ª -

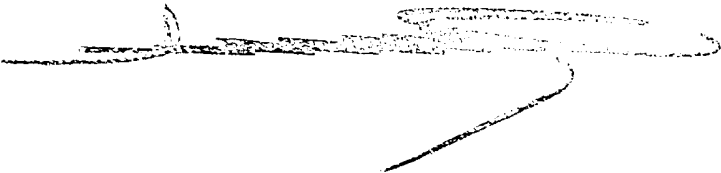
Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o local de restrição estar situado após as primeiras 33 bases.

- 4ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado por o local de restrição ser um local BamHI.

- 5ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado por haver uma alteração de uma única base na terceira base do codão natural de início da tradução ATG para o gene da poli-hedrina.


- 6ª -

Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o referido codão ATG ter sido alterado para ATC.

- 7ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado por o gene estranho ser um gene pro-cariótico.

- 8ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6, caracterizado por o gene estranho ser um gene eucariótico

- 9ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6, caracterizado por o gene estranho ser um gene que codifica para o interferon gama humano, para a proteína imediata precoce do citomegalovírus humano ou para uma proteína quimérica constituída essencialmente por:

(i) na extremidade N-terminal da proteína quimérica, uma sequência de sinal do precursor do antígeno de superfície do merozoíto maior (PASMM) de P. falciparum,

(ii) opcionalmente, pelo menos um epítipo da proteína do cicunsporozoíto de P. falciparum, e

(iii) um fragmento C-terminal do PASMM de P. falciparum com ou sem a sequência de fixação C-terminal.

- 10ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado por compreender adicionalmente uma fase de cultura das células susceptíveis à infecção pelo baculovírus que são infectadas pelo baculovírus recombinante produzido conforme descrito de modo a expressar o produto codificado pelo gene estranho.

A requerente declara que o primeiro pedido

— desta patente foi apresentado no Reino Unido em 6 de Maio de 1988, sob o nº 8810808.9.

Lisboa, 26 de Agosto de 1988
* AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and strokes, positioned below the typed text.

RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE VECTORES DE BACULOVÍRUS"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de um baculovírus recombinante que incorpora um gene estranho por

(a) clonagem de um gene estranho contendo um codão de início de tradução num vector de transferência de baculovírus num local de restrição a uma curta distância a jusante da extremidade N-terminal do corpo do gene de poli-hedrina; e

(b) co-transfecção de células de insecto susceptíveis à infecção por baculovírus com o vector de transferência de baculovírus formado na fase (a) e com ADN de baculovírus de tipo selvagem intacto em que o codão natural de início da tradução ATG para o gene da poli-hedrina não está presente de tal modo que a sequência N-terminal de codificação da poli-hedrina antes do local de restrição é conservada mas não é capaz de ser traduzida.

BAD ORIGINAL

[illegible]

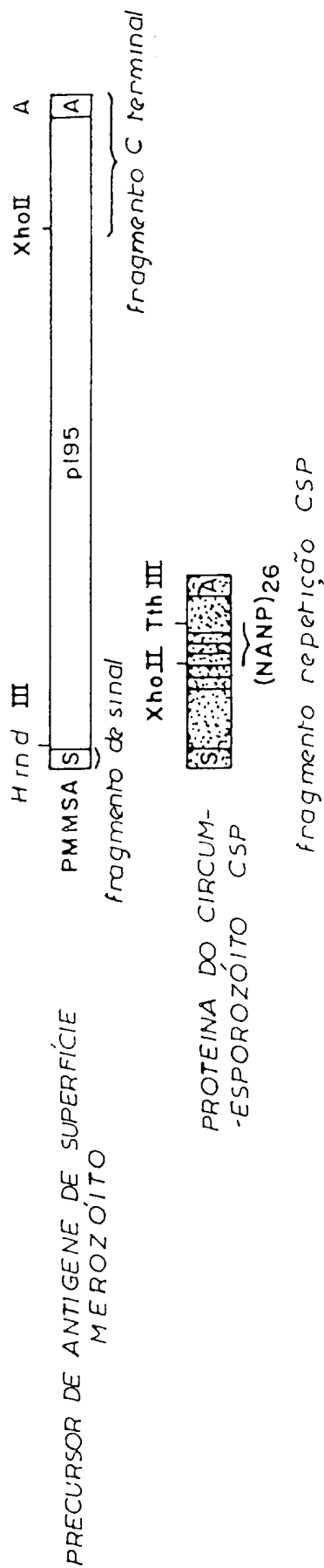
Adaptador para fusão
no quadro de HindIII
(575) com Xho II (666)
CSF ou XhoII (4458) PM

Pst I GTTAAGATCTGACTAGGTCAACTGCCA
 ACGTCAATTCTAGACTGATCCAGTTG Pst I

paragem 891 III paragem paragem

Adaptador de paragem multiquadro bidireccional
para supressão da sequência de fixação em
PstI (5267)

Fig. 2.



	Vector de transfe-rência	Vector de transferência recombinante	Baculovirus recombinante	Degradação	Estrutura terciária
Sinal p195/extremidade C-terminal de p195	pAc36C	pS42	S42	Intacto	Dobragem correcta
Sinal p195/repetição de CSP/extremidade C-terminal de p195	pAc36C	pSC2642	SC2642	Intacto	Dobragem correcta
Sinal p195/extremidade de C-terminal de p195/fixação suprimida	pAc36C	pS42ΔA	S42ΔA	Intacto	Dobragem correcta
Sinal p195/repetição de CSP/extremidade C-terminal de p195/fixação suprimida	pAc36C	pSC2642ΔA	SC2642ΔA	Intacto	Dobragem correcta

Fig. 3.

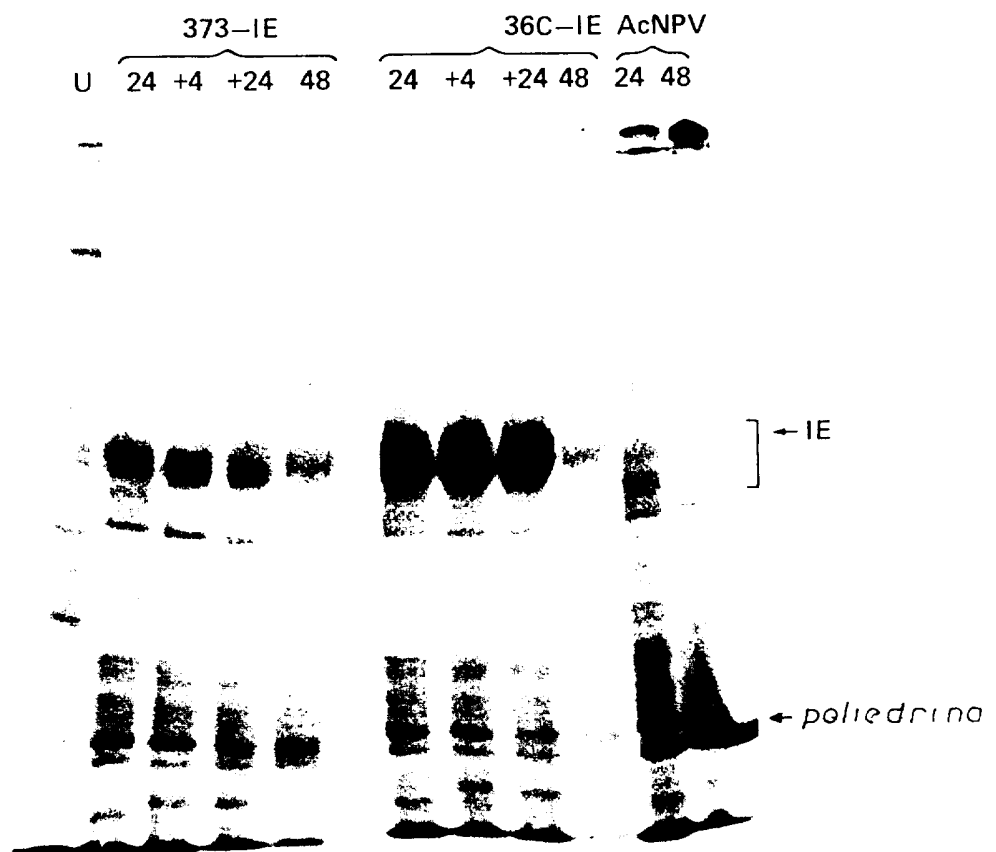
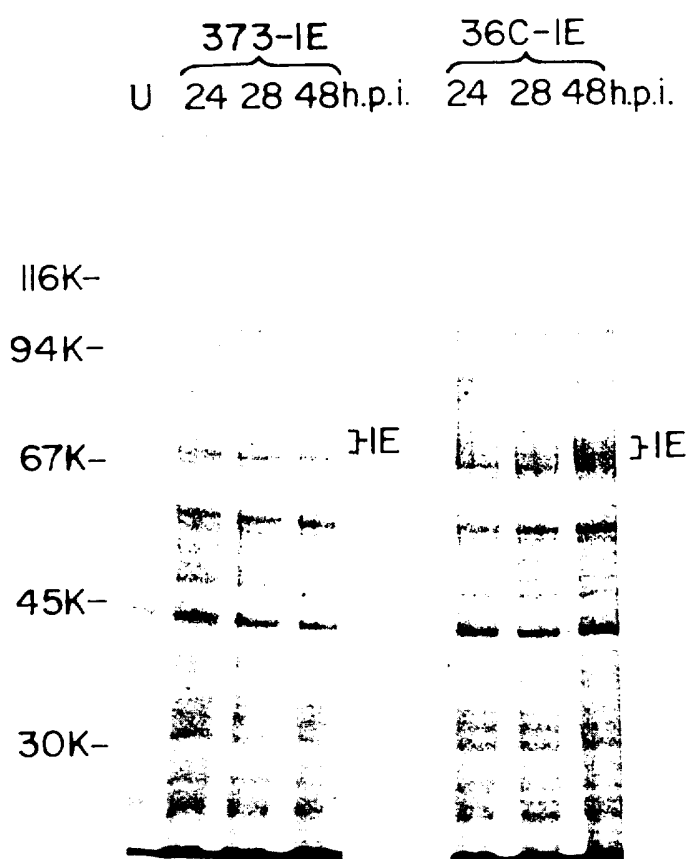


Fig.4.



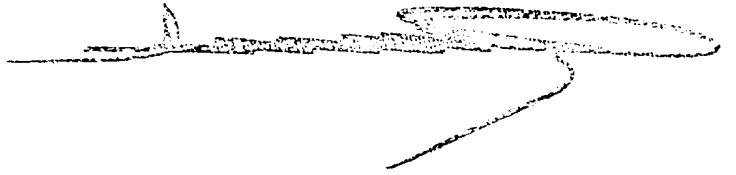


Fig. 5.

1 2 3 4

