



(11) Número de Publicação: PT 666751 E

(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)

C12N015/51 A C12N007/00 B
C12N007/04 B A61K039/29 B

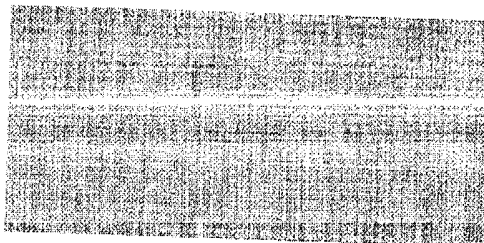
(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1993.09.17	(73) Titular(es): SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. RUE DE L INSTITUT 89 B-1330 RIXENSART BE
(30) Prioridade: 1992.09.18 US 947338	GOV.USA AS REP.BY SEC.D.HEALTH HUM.SERV.SUCCESSOR - WASHINGTON, DC 20231 US
(43) Data de publicação do pedido: 1995.08.16	(72) Inventor(es): ROBERT H. PURCELL SUZANNE U. EMERSON ANN W. FUNKHOUSER ERIC D'HONDT US US US BE
(45) Data e BPI da concessão: 2001.09.12	(74) Mandatário(s): ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) Epígrafe: MUTANTES DA ESTIRPE HM-175 DO VÍRUS DA HEPATITE A PARA UTILIZAÇÃO COMO VACINAS DA HEPATITE A

(57) Resumo:

MUTANTES DA ESTIRPE HM-175 DO VÍRUS DA HEPATITE A SUA UTILIZAÇÃO
COMO VACINAS DA HEPATITE A





DESCRIÇÃO

"Mutantes da estirpe HM-175 do vírus da hepatite A para utilização como vacinas da hepatite A"

A presente invenção foi realizada com apoio governamental ao abrigo de certos acordos *Collaborative Research e Development Agreements* concedidos pelo *Department of Health and Human Services*. O governo tem certos direitos na presente invenção.

Campo da invenção

A presente invenção refere-se genericamente ao campo de composições de vacina úteis na profilaxia de hepatite A. Mais especificamente, a invenção proporciona um novo vírus vivo de hepatite A (HAV), e HAV recombinantes e quiméricos, cujos genomas são modificados a partir do genoma da sua estirpe progenitora HM-175 para os proporcionar com a capacidade de se propagarem em células MRC-5 e reterem a atenuação apropriada para utilização como vacinas vivas em humanos e outros primatas.

Antecedentes da Invenção

Nos Estados Unidos, o vírus da hepatite A é a causa de aproximadamente 25% de todos os casos clínicos de hepatite, montando a aproximadamente 150 000 destes casos. As populações com alto risco de contrair hepatite A nos países industrializados incluem as socialmente desfavorecidas, pessoal médico, pessoal militar, empregados e adultos em contacto com crianças em centros de dia, homossexuais masculinos, viciados em drogas, e viajantes a áreas endémicas.

Nos países em desenvolvimento, virtualmente toda a população é infectada com o vírus da hepatite A numa idade precoce. Muitas destas infecções resultam em infecção subclínica e não aparente, mas, à medida que os países melhoram as suas condições de higiene, a infecção com o vírus da hepatite A ocorre em idades progressivamente mais avançadas, resultando numa maior proporção da doença clínica. Assim, existe um aumento paradoxal da hepatite A clínica à medida que a taxa de infecção global diminui. Para uma imunização bem sucedida contra a hepatite A nos Estados Unidos e em outros países industrializados bem como em países em desenvolvimento, será



necessário vacinar toda a população pediátrica. Haverá uma necessidade crescente de vacinas contra a hepatite A vacinas nestes países no futuro próximo.

A pesquisa relativa a vacinas de HAV focou-se em vírus inactivados, ou mortos. Contudo, na terapia de vacinas existem várias vantagens numa vacina viva, em vez de uma vacina inactivada. Com uma vacina viva, pode-se utilizar uma dosagem menor e menor número de doses, porque uma vacina viva replica nos vacinados para produzir mais antigénio e pode estimular o sistema imunitário do vacinado para gerar tanto IgA como IgM. As vacinas inactivadas, tais como a vacina polio Salk, que estimula a produção apenas de IgG em vacinados, não protege contra a infecção por vírus ingeridos, apenas contra a doença.

Um dos principais obstáculos ao desenvolvimento de uma vacina viva atenuada tem sido a dificuldade de adaptar o HAV a uma linha celular que suporte o rápido crescimento viral e esteja licenciada para a produção de vacinas. O vírus da hepatite A do tipo selvagem (HAV) cresce fracamente em cultura celular.

As patentes U.S. 4 532 215 e 4 636 469 descrevem, respectivamente, uma estirpe de HAV designada HM-175 inicialmente isolada de fezes humanas de um paciente em Melbourne, Austrália, e adaptada a passagem *in vitro* em culturas de células de rim de macaco verde africano (AGMK) e métodos para a obtenção das mesmas por passagens em série. A patente U.S. 4 620 978 descreve uma vacina que emprega o HAV HM-175, triplamente clonado em cultura de células AGMK e atenuado. A patente U.S. 4 894 228 descreve HM-175 de passagem 35, que difere do HM-175 do tipo selvagem por alterações nucleotídicas no genoma, é atenuado para chimpanzés, elicia anticorpos neutralizantes no soro, e é adequado para utilização como uma vacina de HAV atenuada. Revela a sequência nucleotídica completa do HAV, estirpe HM-175/7. Veja-se também B.C. Ross *et al*, *J. Gen. Virol.*, 70:2805-2810 (1989); R.W. Jansen *et al*, *Virol.*, 163:299-307 (1988); e Tedeschi *et al*, *J. Med. Virol.*, (no prelo). As descrições destas patentes e artigos são aqui incorporadas como referência.



N. Fineschi *et al*, *J. Hepatol.*, 13(4):S146-S151 (1991) descrevem um isolado de HAV, LSH/S, que é um candidato a uma vacina inactivada. Foi adaptado para crescer em células MRC-5 diplóides humanas, uma célula licenciada preferida para o desenvolvimento de vacinas. Este documento compara apenas uma pequena parte da sua sequência nucleotídica com a do HM-175 do tipo selvagem.

Provost *et al*, *J. Med. Virol.*, 20:165-175 (1986) descrevem as variantes F e F' da estirpe CR326 do vírus da hepatite A. Embora tenha sido reportada como sendo imunogénica em voluntários vacinados, a variante F causou também níveis de ALT no soro anormais numa proporção substancial dos indivíduos.

Outra publicação recente deste grupo de investigadores descreveu um trabalho adicional com a variante F' [K. Midthun *et al*, *J. Infect. Dis.*, 163:735-739 (1991)]. Observaram que a imunogenicidade do produto de vacina F' depende da dose, *i.e.*, uma TCID₅₀ de 10^{7.3} evocou uma resposta de anticorpos em 100% dos voluntários em 9 semanas após imunização enquanto doses inferiores foram imunogénicas numa menor percentagem de voluntários, e observou-se anti-HAV 4 a 6 meses após a imunização. Investigadores chineses descreveram recentemente estudos de uma potencial vacina viva atenuada contra a hepatite A preparada a partir da estirpe H2 de HAV [J.S. Mao *et al*, *J. Infect. Dis.*, 159:621-624 (1989)]. Doze voluntários receberam a vacina por via subcutânea.

Uma vacina viva atenuada contra a hepatite A teria um impacto significativo na erradicação da doença. Pode-se prever que uma vacina viva atenuada que requeira uma purificação mínima e não requeira adjuvantes seria menos onerosa do que as vacinas inactivadas contra a hepatite A correntemente disponíveis.

Existe uma necessidade na arte de métodos e composições para a vacinação eficaz de humanos e animais contra a hepatite A.

Sumário da Invenção

Num aspecto, a presente invenção proporciona um vírus vivo de hepatite A adaptado para crescer em células MRC-5. Este vírus é preferivelmente



caracterizado por atenuação. O vírus atenuado pode ser recombinante ou quimérico. Mais preferivelmente, o HAV é caracterizado por atenuação adequada para a administração eficaz da vacina a primatas, preferivelmente humanos, sem inactivação. O HAV pode ser caracterizado por conter pelo menos quatro de catorze nucleótidos específicos que diferem dos nucleótidos na mesma posição no genoma do HAV HM175, Passagem 35 [SEQ ID NO:1], em que pelo menos as posições de nucleótidos 591 e 687 estão alteradas para guanina, a 646 está alterada para adenina e a 669 está alterada para timina.

Noutro aspecto, a invenção proporciona uma vacina útil para proteger humanos ou outros primatas contra a hepatite A, vacina esta que contém pelo menos um dos HAV atrás descritos adaptado para crescer em células MRC-5. Preferivelmente, a vacina é eficaz para induzir uma resposta protectora de anticorpos sem adjuvantes.

Em ainda outro aspecto, a invenção proporciona um método para a protecção de humanos contra a infecção pelo vírus da hepatite A que compreende a administração ao paciente humano de uma quantidade eficaz de uma composição de vacina da presente invenção.

Num aspecto adicional, a invenção proporciona um método para a preparação de um HAV vivo adaptado para crescer em células MRC-5 incorporando numa área seleccionada do genoma de um HAV pelo menos quatro de catorze nucleótidos específicos, em que pelo menos as posições de nucleótidos 591 e 687 estão alteradas para guanina, a 646 está alterada para adenina e a 669 está alterada para timina. O genoma de HAV assim modificado é HAV HM-175, Passagem 35.

Noutra concretização, o HAV pode ser construído utilizando outro clone de ADNc de HAV e inserindo os nucleótidos apropriados no seu genoma. De acordo com este método, proporciona-se um HAV atenuado, adaptado para MRC-5 sem necessidade de mais passagens em MRC-5 ou outras linhas celulares de primata.

Em ainda outro aspecto, a invenção proporciona sequências polinucleotídicas codificando os HAV recombinantes ou quiméricos atrás

descritos. Preferivelmente estas sequências são ADNc úteis como sementes principais para a preparação de vacinas.

Outros aspectos e vantagens da presente invenção estão descritos na seguinte descrição detalhada das suas concretizações preferidas.

Breve descrição dos desenhos

A Fig. 1 é um gráfico que representa a produção de anticorpos anti-HAV vs. Tempo (semanas) vs. níveis de ALT e ICD para estudos com chimpanzés com o Vírus 4380 e subsequente desafio com HAV do tipo selvagem, como descrito no Exemplo 1. Estes resultados foram obtidos de um chimpanzé que foi infectado com o HAV atenuado no tempo 0 e desafiado com vírus virulento na semana 28.

A Fig. 2 é um gráfico que representa a produção de anticorpos anti-HAV vs. tempo (semanas) vs. níveis de ALT e ICD para estudos com chimpanzés com Vírus 4380 e subsequente desafio com HAV do tipo selvagem, como descrito no Exemplo 1. As condições foram as mesmas que para a Fig. 1.

A Fig. 3 é um gráfico que representa a produção de anticorpos anti-HAV vs. tempo (semanas) vs. níveis de ALT e ICD para estudos com chimpanzés com Vírus 4380 e subsequente desafio com HAV do tipo selvagem, como descrito no Exemplo 1. As condições foram as mesmas que para a Fig. 1.

A Fig. 4 é um gráfico que representa a produção de anticorpos anti-HAV vs. tempo (semanas) vs. níveis de ALT e ICD para estudos com chimpanzés com Vírus 4380 e subsequente desafio com HAV do tipo selvagem, como descrito no Exemplo 1. Estes resultados foram obtidos a partir do chimpanzé que não foi infectado com o HAV atenuado, e portanto desenvolveu hepatite após o desafio com o vírus virulento. As condições foram as mesmas que para a Fig. 1.

A Fig. 5 é um gráfico de barras das diluições no ponto final de vários dos vírus quiméricos, Vírus #2, 3, 4, 5, e 6, listados na Tabela VI.



Descrição detalhada da invenção

A presente invenção proporciona vírus da hepatite A (HAV) adaptado para crescer na linha celular humana semelhante a fibroblastos, MRC-5, um substrato celular adequado para a produção comercial e licenciamento de vacinas contra a hepatite A vivas atenuadas e inativadas. Em adição a estes HAV adaptados, a invenção proporciona um método para a adaptação de um HAV seleccionado para crescer nessa linha celular humana e preparação de um HAV atenuado, adaptado para MRC-5, sem passagens em outras células de primata. O HAV da presente invenção e o método de preparação proporcionam também preferivelmente o HAV com suficiente atenuação para permitir a sua eficácia como uma vacina para humanos e animais.

Embora a arte anterior revele outras estirpes de vacina candidatas do vírus da hepatite A que foram adaptadas para crescer em fibroblastos diplóides humanos, as alterações genéticas no genoma do vírus necessárias e suficientes para esta adaptação não foram caracterizadas. Assim, estas estirpes não podem ser manipuladas *in vitro* para assegurar um produto de vacina reprodutível e completamente caracterizado.

A presente invenção baseia-se no HAV do tipo selvagem, estirpe HM-175, que está descrito em detalhe na arte atrás citada e aqui incorporada [Cohen *et al.*, *J. Virol.*, 61:50-59 (1987); SEQ ID NO:1 e 2]. Descrito resumidamente, o vírus HAV HM-175 infeccioso do tipo selvagem foi previamente adaptado para crescer em células de rim de macaco verde africano (AGMK) a 37°C. Após 26 passagens em AGMK, o vírus foi clonado três vezes em células AGMK por diluição em série, depois foi passado mais três vezes para proporcionar a passagem 32 (P-32). Verificou-se que P-32 estava atenuado como descrito em R.A. Karron *et al*, *J. Infec. Dis.*, 157:338-345 (1988).

O vírus P-32 descrito atrás foi passado mais três vezes em AGMK, e molecularmente clonado. O vírus que foi clonado foi denominado P-35 e o clone de comprimento completo foi referido como pHAV/7. O pHAV/7 é um clone de ADNc infeccioso do vírus que pode ser mantido num estado monoclonal e amplificado à vontade com risco diminuído de mutações espontâneas. O vírus P-35 resultante cresceu bem em células de rim de macaco Rhesus fetal (FRhK) e minimamente em células de pulmão fibroblastóides humanas (MRC-5).



A patente U.S. 4 894 228 e Cohen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84:2497-2501 (1987) proporcionam as sequências nucleotídicas do HAV do tipo selvagem, estirpe HM-175 (veja-se, Fig. 1 da patente; SEQ ID NO:1 e 2) e as diferenças nucleotídicas entre o clone pHAV/7 de HAV HM-175, Passagem 35, e a sequência do tipo selvagem [SEQ ID NO:1]. Assim, estes documentos, aqui incorporados como referência, proporcionam a sequência de pHAV/7, P-35 [SEQ ID NO:1 e 2]. Os números de nucleótidos aqui utilizados aos quais correspondem as mutações da presente invenção (Tabelas I e VI adiante) são dos números de nucleótidos atribuídos às posições da sequência do tipo selvagem da Fig. 1 [SEQ ID NO:1 e 2] da patente U.S. 4 894 228 contendo as mutações para P-35. Note-se que aos nucleótidos delecionados em P-35 são atribuídas a posição de nucleótido da sequência do tipo selvagem [SEQ ID NO:1]. Assim, por exemplo, a posição de nucleótido 131 representa um nucleótido que foi delecionado entre o tipo selvagem e P-35. O ADNc de P-35, *i.e.*, HAV/HM-175/7, está depositado na *American Type Culture Collection*, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland com o número de acesso 67495, depositado em 7 de Agosto, 1987. Um perito na arte pode prontamente construir as sequências nucleotídica e de aminoácidos de P-35 utilizando a arte anterior citada.

Posteriormente, o vírus P-32 adaptado a células AGMK e atenuado foi adicionalmente manipulado para permitir que este se adaptasse a crescer em células MRC-5, de modo a ficar disponível para a produção de vacinas em larga escala. A Passagem 32 foi duplamente clonada em placas fágicas em MRC-5 para formar a Passagem 37. A Passagem 37 foi passada uma vez em MRC-5 de um clone selecionado, 25-4-21. A Passagem 38 resultante foi passada três vezes em células MRC-5, resultando a Passagem 41, a semente principal, designada 87J19. Esta reserva de vírus semente principal foi também denominada o vírus 4380, e é referida em toda a descrição por este último nome.

O vírus vivo atenuado HAV 4380, foi depositado em 4 de Abril, 1990 na *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes*, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75724, Paris CEDEX 15 com o N°. de acesso I-936. Este depósito foi realizado nos termos do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos e não foi publicamente divulgado. O HAV 4380 é uma estirpe adaptada a cultura de



células e atenuada do vírus da hepatite A, estirpe HM-175, adaptada para crescer numa linha celular de fibroblastos humanos (MRC-5) adequada para o desenvolvimento de vacinas por incubação a uma temperatura reduzida de 32-35°C. O crescimento do vírus é determinado por detecção de antígeno viral num ensaio serológico. O vírus adaptado é purificado por purificação de placas fágicas utilizando um método aceite (ensaio de radioimunofocagem).

Após um total de nove passagens em células MRC-5 a temperatura reduzida, o vírus resultante foi caracterizado pelas suas características biológicas em cultura celular e em duas espécies de primatas que são consideradas como sendo sub-rogadas em relação ao homem, *i.e.*, saguins e chimpanzés. Veja-se, *e.g.*, o Exemplo 1 adiante. Verificou-se que o vírus HAV 4380 é sensível à temperatura (*i.e.*, apenas cresceu a temperaturas reduzidas) em células MRC-5 mas foi ainda capaz de crescer a 37°C em células primárias de rim de macaco verde africano. O vírus estava adicionalmente atenuado em virulência, em comparação com o vírus progenitor, HM-175, P-32, quando testado em chimpanzés e macacos saguim, espécies em que o vírus replicou fracamente ou não replicou mesmo. Esta reduzida capacidade de replicação em primatas foi adicionalmente confirmada em voluntários humanos, como descrito no Exemplo 2.

Preparou-se uma vacina inactivada candidata contra a hepatite A a partir do HAV 4380 e demonstrou-se que era segura (*i.e.*, não produzia hepatite ou outros efeitos adversos graves) e imunogénica em humanos. Verificou-se também que induzia produção de anticorpos sem adjuvantes. O HAV 4380, como existe correntemente, cresce bem num substrato celular adequado para a produção comercial de vacinas. Também não infecta seres humanos quando administrada por via oral ou intravenosa em doses até 10^7 doses infecciosas para cultura de tecidos, mesmo quando não inactivado. O HAV 4380 é adequado para utilização como uma vacina viva de HAV em humanos. Contudo, tal como indicado no Exemplo 2, crê-se que a vacina de 4380 é algo sobre-atenuada, porque não é infecciosa, característica que reduz a sua eficiência quando utilizada como uma vacina atenuada.

Para produzir outros candidatos a vacina que são maximizados para níveis desejados de atenuação e bom crescimento em células MRC-5, os inventores identificaram alterações genéticas que ocorriam no genoma do vírus HAV 4380



adaptado para MRC-5 que alteravam as suas características de crescimento e o tornavam mais adequado para a produção de vacinas do que o vírus HM-175, Passagem 35, relacionado, adaptado para AGMK. A identificação das seguintes mutações nas sequências nucleotídicas em 4380, em comparação com HM-175, Passagem 35 [Cohen *et al*, atrás citado; e patente U.S. 4 894 228, Fig. 1; SEQ ID NO:1 e 2], permite a manipulação do genoma de HAV por técnicas de engenharia genética.

Assim, o conhecimento das diferenças genómicas entre as passagens de HM-175 adaptado para AGMK e o 4380 mais atenuado, permite a construção de vírus quimérico possuindo as características de crescimento melhoradas, *i.e.*, crescimento rápido e eficiente em cultura de células MRC-5, mas com um nível de atenuação de virulência para espécies de primatas, incluindo o homem, que permitirá que o vírus replique eficientemente sem produzir hepatite ou outros efeitos inconvenientes. A presente invenção permite o desenho de um HAV quimérico que pode alcançar as características óptimas para um candidato a vacina viva atenuada contra a hepatite A. Um tal vírus permitirá também o desenho de candidatos preferidos a vacinas inactivadas, se desejado. A presente invenção identifica as mutações que se crê terem ocorrido durante a adaptação ao crescimento do HAV, Passagem 32, estirpe HM-175, em células MRC-5. Uma combinação destas mutações é responsável pela adaptação às células MRC-5 e à sobre-atenuação no HAV 4380. A sequência nucleotídica do vírus HAV 4380 adaptado para células MRC-5 foi comparada com a do vírus HM-175, passagem 35, clone 7, adaptado para AGMK. Determinaram-se as sequências nucleotídicas de consenso directamente de produtos de reacção em cadeia com polimerase.

Os inventores verificaram que existem pelo menos catorze diferenças de um único nucleótido entre a passagem 35 do vírus HM-175/7 [SEQ ID NO:1] e o vírus 4380 adaptado para MRC-5, mutações das quais pelo menos doze ocorreram aparentemente durante o período de adaptação da Passagem 32 do vírus da hepatite A (HAV), estirpe HM-175 [SEQ ID NO:1], ao crescimento em células MRC-5. A Tabela I apresenta estas doze mutações por diferenças de nucleótidos e as resultantes diferenças de aminoácidos (AA) diferenças, se algumas, adquiridas pelo vírus HAV 4380 adaptado para MRC-5. As outras duas mutações parecem ser mutações inversas para a sequência do tipo selvagem, ou mais provavelmente, representam mutações que ocorreram entre as passagens 32 e 35 em células AGMK, e que portanto representam diferenças entre o vírus P-32 biologicamente caracterizado e o vírus P-35



molecularmente clonado. Note-se que a sequência parcial de LSH/S de HAV de Fineschi *et al*, acima citado, se sobrepõe apenas na mutação observada na posição 5145.

Na Tabela, A representa adenina, G representa guanina, C representa citosina, e U representa uridina ou timina; Leu representa leucina, Phe representa fenilalanina, Ile representa isoleucina, Val representa valina e Ser representa serina.

Tabela I

Alterações de nucleótidos que ocorrem durante a adaptação de HM-175 em células MRC-5: Comparação com a sequência de HM-175/7 (P-35)

<u>Alteração de Nucleótido</u>	<u>Região do Genoma</u>	<u>Alteração de AA</u>
591 A para G	5' nc	NA
646 G para A	5' nc	NA
669 C para U	5' nc	NA
687 U para G	5' nc	NA
2864 U para A	VP1	Sem alteração
3934 A para G	2B	Sem alteração
4418 A para U	2C	Leu para Phe
4643 A para U	2C	Sem alteração
5145 A para G	3A	Ile para Val
5745 A para U	3C	Thr para Ser
6216 U para C	3D	Sem alteração
6908 U para C	3D	Sem alteração

Desenham-se novos candidatos a vacina de HAV introduzindo pelo menos quatro destes nucleótidos num HAV numa posição de nucleótido homóloga à posição de nucleótido na sequência genómica do vírus HM-175, Passagem 35 [SEQ ID NO:1] adaptado para AGMK, em que pelo menos as posições de nucleótido 591 e 687 estão alteradas para guanina, a 646 está alterada para adenina e a 669 está alterada para timina. Estes nucleótidos identificados na Tabela I podem ser introduzidos em posições de nucleótido análogas e/ou homólogas às de P-35 nas sequências genómicas de outras estirpes e variantes de HAV para produzir um HAV recombinante ou quimérico da presente



invenção. Com a frase "posição de nucleótido análoga ou homóloga" pretende-se designar um nucleótido num HAV que não o HAV HM-175, Passagem 35 [SEQ ID NO:1] que está presente na mesma região viral, *e.g.*, 2C, 3D e semelhantes, numa posição na região similar à do nucleótido da Tabela I. Por outras palavras, a posição de nucleótido pode diferir no número de posição devido a deleções em outras regiões do vírus; mas um perito na arte pode prontamente determinar a sua semelhança funcional à posição de nucleótido em HM-175, Passagem 35 [SEQ ID NO:1].

Embora estas posições de nucleótidos possam não ter os números de posição de nucleótido idênticos correspondentes ao HM-175 do tipo selvagem [SEQ ID NO:1], prevê-se que estas posições análogas e/ou homólogas podem ser prontamente identificadas para permitir que HAV que não derivados da estirpe HM-175 sejam modificados para criar novos HAV de acordo com a presente invenção.

De modo semelhante, os inventores são capazes de manipular o genoma de um progenitor ou intermediário de HAV 4380 recorrendo a este conhecimento e podem assim 'inverter' certas mutações em 4380 para criar novos vírus HAV quiméricos. Um ou mais destes nucleótidos, ou várias suas combinações, podem ser incorporados, por formação de quimeras ou mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, numa estirpe de HAV, mais prontamente o clone de ADNc de HAV/HM-175/7, para produzir novos vírus viáveis que adquiriram a capacidade de crescer em células MRC-5. Outros derivados de HAV HM-175 estão disponíveis de *American Type Culture Collection* com os números de acesso na ATCC, VR 2089, VR 2090, VR 2091, VR 2092, VR 2093, VR 2097, VR 2098, e VR 2099. Estes e outros HAV podem ser empregues para obter derivados desejados de HAV da presente invenção. Uma vez que há indicações de que o vírus 4380 adaptado para MRC-5 pode ser sobre-atenuado para humanos, é importante ser capaz de remover ou introduzir mutações seleccionadas em HM-175. A construção de nove vírus quiméricos exemplificativos contendo uma ou mais destas mutações está descrita em detalhe no Exemplo 3 adiante.

As técnicas mutagénicas e de engenharia genética empregues para construir os HAV quiméricos ou recombinantes que incorporam uma ou mais destas mutações são os convencionais e conhecidos dos peritos na arte



[veja-se, por exemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, (1989)). Outras técnicas convencionais, incluindo as reacções em cadeia com polimerase e técnicas de síntese química, podem também ser utilizadas para desenhar HAV de acordo com a presente invenção. De modo semelhante, prevê-se que possam ser realizadas mutações homólogas utilizando outras passagens com HM-175.

Os vírus quiméricos e recombinantes da presente invenção podem ser desenhados por aplicação de técnicas semelhantes e selecção de uma ou mais diferentes combinações dos nucleótidos (mutações) que aparecem nas Tabelas I e VI. Por exemplo, os dados das análises de crescimento dos vírus quiméricos do Exemplo 3 demonstram que as quatro mutações específicas de MRC-5 na região não codificante a 5' (mutações nas posições de nucleótido 591, 646, 669, e 687 de HM-175/7) e uma ou ambas as mutações específicas de MRC-5 na região 2C (mutações nas posições de nucleótido 4418 e 4643 de HM-175/7) são desejáveis para o crescimento óptimo do vírus em células MRC-5. Podem também estar envolvidas outras mutações. Os HAV quiméricos específicos exemplificativos da presente invenção são caracterizados pelas mutações no genoma de HAV HM-175/7 que aparecem em vírus designados #2 a #10 na Tabela VI do Exemplo 3 adiante.

Os HAV da presente invenção podem ser caracterizados pela presença de pelo menos quatro destes nucleótidos das Tabelas I ou VI em posições genómicas análogas dos derivados de HAV HM175, caracterizados por pelo menos as posições de nucleótido 591 e 687 estarem alteradas para guanina, a 646 estar alterada para adenina e a 669 estar alterada para timina.

Prevê-se ainda que possam aparecer mutações adicionais em algumas regiões do HAV que têm ainda que ser sequenciadas. As mutações que aparecem na Tabela I podem ser incorporadas em qualquer combinação, e/ou com outras mutações ainda a identificar, para construir vários HAV quiméricos ou recombinantes com características desejadas para utilização como vacinas vivas de HAV.

Quimeras e vírus recombinantes adicionais construídos por mutagénesse dirigida por oligonucleótidos podem ser desenhados e avaliados quanto à



determinação dos efeitos individuais das mutações e suas combinações sobre o crescimento viral em células MRC-5 e na adaptação ao crescimento em culturas celulares seleccionadas. O fenótipo de atenuação destes vírus quiméricos pode ser avaliado em saguins ou chimpanzés por técnicas tais como as descritas adiante no Exemplo 1 para HAV 4380.

São também proporcionadas pela presente invenção as sequências polinucleotídicas que codificam os HAV da presente invenção. Estas sequências polinucleotídicas são preferivelmente sequências de ADNc, que podem formar uma semente principal para a vacina de HAV. Uma sequência de ADNc da presente invenção compreende uma sequência de ADN que codifica um genoma de um HAV seleccionado caracterizada pela presença de um ou mais dos nucleótidos identificados como as doze mutações na Tabela I em qualquer combinação desejada que infira as características desejadas ao novo HAV. Estes ADNc podem ser obtidos por técnicas convencionais conhecidas dos peritos na arte. Veja-se, *e.g.*, Sambrook *et al*, atrás citado, e a patente U.S. 4 894 228.

Assim, a presente invenção proporciona uma composição de vacina viva útil na protecção contra infecção por HAV e um método profiláctico que acarreta a administração a um primata, preferivelmente um humano, de uma quantidade eficaz de uma tal composição. Esta composição de vacina pode conter um ou mais dos HAV da invenção, incluindo o HAV 4380, bem como os HAV quiméricos e recombinantes aqui descritos. A composição de vacina pode também conter misturas de dois ou mais dos HAV, se desejado.

Uma composição de vacina pode ser formulada para conter um transportador ou diluente e um ou mais dos HAV da invenção. Os transportadores farmacêuticamente aceitáveis adequados facilitam a administração dos vírus mas são fisiologicamente inertes e/ou não prejudiciais. Os transportadores podem ser seleccionados por um perito na arte. Os transportadores exemplificativos incluem solução salina estéril, lactose, sacarose, fosfato de cálcio, gelatina, dextrina, ágar, pectina, óleo de amendoim, azeite, óleo de sésamo e água. Adicionalmente, o transportador ou diluente pode incluir um material retardador no tempo, tal como monoestearato de glicerol ou diestearato de glicerol, sozinhos ou com uma cera. Em adição, podem-se utilizar formulações de polímeros de libertação lenta.



Opcionalmente, a composição de vacina pode ainda conter conservantes, estabilizantes químicos, outras proteínas antigénicas, e ingredientes farmacêuticos convencionais. Os ingredientes adequados que podem ser utilizados numa composição de vacina em conjunto com o vírus incluem, por exemplo, casaminoácidos, sacarose, gelatina, vermelho de fenol, N-Z amina, difosfato monopotássico, lactose, hidrolisado de lactalbumina, e leite seco. Tipicamente, os estabilizantes, adjuvantes, e conservantes, são optimizados para determinar a melhor formulação quanto a eficácia no alvo humano ou animal. Os conservantes adequados incluem clorobutanol, sorbato de potássio, ácido sórbico, dióxido de enxofre, galato de propilo, os parabenos, etilvanilina, glicerina, fenol, para-clorofenol.

A composição de vacina da presente invenção é mais preferivelmente produzida sem um adjuvante. Contudo, quando necessário, um ou mais dos componentes de vacina atrás descritos podem ser misturados ou adsorvidos com um adjuvante convencional. O adjuvante é utilizado como um irritante não específico para atrair os leucócitos ou melhorar uma resposta imunitária. Estes adjuvantes incluem, entre outros, óleo mineral e água, hidróxido de alumínio, Amphigen, Avridine, L121/esqualeno, D-lactido-polilactido/glicósido, pliois plurónicos, dipéptido de muramilo, *Bordetella* morta, saponinas, e Quil A.

Alternativamente, ou em adição ao HAV da invenção, espera-se que outros agentes úteis no tratamento de infecção por HAV, *e.g.*, agentes imunoestimulantes, sejam úteis na redução e na eliminação de sintomas da doenças. O desenvolvimento de composições de vacina ou terapêuticas contendo estes agentes está dentro das atribuições de um perito na arte tendo em conta os ensinamentos da presente invenção.

De acordo com o método da invenção, um humano ou um animal podem ser vacinados contra infecção por HAV através da administração de uma quantidade eficaz de uma composição de vacina atrás descrita. Uma quantidade eficaz é definida como a quantidade de vacina de HAV capaz de induzir protecção no vacinado contra a infecção por HAV e/ou contra hepatite. A vacina pode ser administrada através de qualquer via adequada. Uma tal composição pode ser administrada parentericamente, preferivelmente intramuscularmente ou subcutaneamente. Contudo, pode também ser formulada para ser administrada por qualquer via adequada, incluindo oralmente.



As quantidades eficazes adequadas dos HAV da presente invenção podem ser determinadas por um perito na arte com base no nível de resposta imunitária desejado. Uma tal composição pode ser administrada uma vez, e/ou pode também ser administrado um reforço. Contudo, podem ser feitos ajustamentos à dosagem adequada pelo médico ou veterinário assistente dependendo da idade, sexo, peso e saúde geral do paciente humano ou animal.

De modo semelhante, doses adequadas da composição de vacina da invenção podem ser prontamente determinadas por um perito na arte. A dosagem pode ser ajustada dependendo do paciente humano ou da espécie animal a tratar, *i.e.* do seu peso, idade e saúde geral.

Os exemplos que se seguem ilustram os métodos preferidos para obter os HAV da invenção e a sua utilização como composições de vacina. Estes exemplos não se pretendem limitantes do âmbito da invenção.

Exemplo 1: Teste de Vacina de HAV 4380 adaptada para MRC-5 em Saguins e Chimpanzés

A atenuação de vírus da hepatite A (HAV), estirpe HM-175, por passagem em série em cultura de células foi previamente demonstrada. Após 32 passagens em células AGMK primárias, o vírus foi completamente atenuado para chimpanzés e quase completamente atenuado para saguins. Subsequentemente, de acordo com a presente invenção, o vírus foi adaptado para crescer em células MRC-5 e novamente clonado por purificação de placas fágicas.

O HAV 4380 foi preparado a partir do lote 87J19 de voluntários, passagem de nível 41 da estirpe HM-175 de HAV que foi derivada dos níveis de passagem previamente caracterizados do vírus que foram também preparados na forma de bancos de voluntários. Mostrou-se que dois destes bancos de passagens anteriores eram atenuados para chimpanzés e saguins. Contudo, nenhum deles foi administrado a voluntários porque se reconheceu que células primárias de rim de macaco verde africano, o substrato para esses bancos de voluntários, não estariam disponíveis em quantidades suficientes para produzir uma vacina economicamente viável. Portanto, o vírus foi adaptado para células MRC-5 e adicionalmente submetido a passagem para preparar o lote 87J19 de voluntários ou HAV 4380.

A finalidade desta experiência é testar o nível de atenuação deste vírus para saguins e chimpanzés, antes dos ensaios de fase I em voluntários. O lote 87J19 foi testado quanto a segurança e imunogenicidade em quatro chimpanzés e quatro saguins *Saguinus mystax*. Dois saguins adicionais serviram como controlos não inoculados. Os chimpanzés utilizados neste estudo foram criados e crescidos em cativeiro; os saguins eram animais selvagens capturados. Administrou-se um inóculo de 10^4 TCID₅₀ de vacina candidata do lote 87J19, intravenosamente, a cada animal. O inóculo residual foi congelado e subsequentemente reconfirmou-se o título em dois laboratórios diferentes.

De acordo com o protocolo experimental, os saguins identificados pelos números ID arbitrários 570, 572, 566 e 575 e os chimpanzés identificados pelos números ID arbitrários 1300, 1333, 1309 e 1313 receberam um inóculo de HAV 4380 do Clone 25-4-21, Lote 87 J 19575, 17/11/87 numa dose e via de administração de diluição de 10^{-3} /1ml/I.V. Os saguins n.ºs. 541 e 578 receberam um diluente numa dose e via de 1ml/I.V.

A. Infecção: Três de quatro chimpanzés e um de quatro saguins, foram infectados, como determinado pelo desenvolvimento de anti-HAV detectável por um radioimunoensaio comercial (HAVAB, Abbott Laboratories, Chicago, IL). Os chimpanzés seroconverteram dez a onze semanas após a inoculação; a única seroconversão em saguim ocorreu oito semanas após a inoculação. Este saguim morreu subsequentemente na semana onze do estudo e outro saguim, não infectado, morreu subsequentemente na semana catorze, mas nenhuma morte foi atribuível ao inóculo.

Os três chimpanzés que seroconverteram desenvolveram também IgM anti-HAV. Dois destes, os Chimp 1309 e Chimp 1313, desenvolveram IgM anti-HAV nas semanas dez e onze, respectivamente, quando testados por HAVAB-M *standard* (Abbott Laboratories, Chicago, IL) a uma diluição final do soro de 1:4 000. Quando os soros foram testados a uma diluição de 1:40, o Chimp 1313 e o Chimp 1333 seroconverteram nas semanas nove e cinco, respectivamente. O teste HAVAB-M é um ensaio de captura que utiliza IgM anti-humana e não foi normalizado para utilização com soros de primatas menos estreitamente relacionados com o homem do que o chimpanzé. Por esta razão, os saguins não foram testados quanto a IgM anti-HAV.



B. Bioquímica: A evidência bioquímica de hepatite foi monitorizada através de determinações semanais da alanina-aminotransferase (ALT) e de desidrogenase isocítrica (ICD) séricas. A primeira constitui o meio indirecto mais fiável para o diagnóstico da hepatite no chimpanzé e a última é comparavelmente sensível para a avaliação em saguins. Nenhum dos chimpanzés ou dos saguins teve uma elevação das enzimas do fígado atribuível ao inóculo. Todos os valores para os chimpanzés estavam dentro dos limites normais. O único saguim infectado, o número 582, teve as enzimas hepáticas normais até ao momento da sua morte. Os saguins 566, 570, e 578 tinham, cada um, um ou mais valores de enzimas hepáticas anormais, mas os primeiros dois destes animais não foram infectados pelo inóculo, conforme avaliado pela falha na seroconversão, e o terceiro era um controlo negativo não inoculado.

Os saguins têm frequentemente valores menos estáveis das enzimas hepáticas do que os chimpanzés, em parte porque são, por natureza, animais relativamente frágeis e porque são capturados na selva e portanto normalmente estão infectados com vários endo- e ecto-parasitas, incluindo microfilária.

C. Histologia: Secções histológicas preparadas a partir de biópsias semanais do fígado em série obtidas dos chimpanzés e dos saguins foram avaliadas segundo o código para alterações histopatológicas. Embora alguns animais tivessem uma linha de base elevada de alterações histopatológicas, nenhum dos animais tinha evidência de alterações histopatológicas mais graves do que aquelas que se observaram em biópsias antes da inoculação. De modo igualmente importante, não existiam alterações histológicas que fossem temporariamente relacionadas com a seroconversão em animais infectados. Os dois saguins que morreram foram submetidos a avaliação mais extensiva. Ambos os animais tinham evidência de doença sistémica que estava provavelmente etiologicamente relacionada com as suas mortes, mas as alterações histológicas no fígado foram diagnosticadas como doença crónica, e não aguda, e portanto não relacionada com o inóculo.

Realizou-se uma comparação de alterações histopatológicas observadas em chimpanzés e saguins com estes vários bancos de voluntários e vírus do tipo selvagem. Vejam-se as Tabelas II e III adiante.

Tabela II
HISTOPATOLOGIA: CHIMPANZÉS

				<u>Histopatologia do fígado</u>
<u>Inóculo*</u>	<u># Inoc.</u>	<u># Infectados</u>	<u>#</u>	<u>Gama de Gravidade**</u>
T.S.	4	4	4	± - 3 +
P-21	6	6	1	0 - 3 +
P-32	6	6	0	0
MRC-5	4	3	0	0

* Dose : $10^3 - 10^5$ ID₅₀ IV

** Escala de 0-3 +

Tabela III
HISTOPATHOLOGIA: SAGUINS

				<u>Histopatologia do fígado</u>
<u>Inóculo*</u>	<u># Inoc.</u>	<u># Infectados</u>	<u>#</u>	<u>Gama de Gravidade**</u>
T.S.	4	4	4	1 + - 2 +
P-21	8	8	8	1 + - 3 +
P-32	5	5	3	0 - 2 +
MRC-5	4	1	0	0

* Dose: $10^3 - 10^5$ ID₅₀ IV

** Escala de 0-3 +

O lote 87J19 parece estar mais atenuado do que outros bancos de voluntários ou vírus do tipo selvagem, com base na infectividade e na gravidade das alterações histopatológicas.

D. Imunofluorescência: Avaliaram-se biópsias de fígado congeladas de modo instantâneo, em série, obtidas de animais infectados, quanto à expressão de antígeno viral, por imunofluorescência. Apenas um animal, o Chimp 1313, foi sem dúvida, mas fracamente, positivo para o antígeno viral intra-hepático. Este animal foi positivo durante apenas uma semana. Estes resultados foram

comparados com os que foram obtidos no estudo anterior de outros bancos de voluntários e vírus do tipo selvagem. Tal como observado nas Tabelas IV e V, a replicação intra-hepática diminuiu adicionalmente tanto nos chimpanzés como nos saguins quando comparada com o vírus crescido em AGMK e o vírus do tipo selvagem.

Tabela IV				
REPLICAÇÃO VIRAL NO FÍGADO:				
SAGUINS (IMUNOFLUORESCÊNCIA)				
Inóculo*	# Inoc.	# Infectados	Pico Médio	Duração Média (sem.)
T.S.	4	4	2,5 +	12,2
P-21	8	8	1 +	3,5
P-32	5	5	<1 +	2,4
MRC-5	4	1	0	0

*Dose: 10^3 - 10^5 ID₅₀ I.V.

Tabela V				
REPLICAÇÃO VIRAL NO FÍGADO:				
CHIMPANZÉS (IMUNOFLUORESCÊNCIA)				
Inóculo*	# Inoc.	# Infectados	Pico Médio	Duração Média (sem.)
T.S.	4	4	1 +	1,8
P-21	6	6	<1 +	0,5
P-32	6	6	<1 +	0,6
MRC-5	4	3	<1 +	0,3

*Dose: 10^3 - 10^5 ID₅₀ I.V.

E. Protecção: Embora o único saguim infectado no estudo tivesse morrido, todos os quatro chimpanzés estavam disponíveis para desafio com HAV do tipo selvagem progenitor para determinar se os níveis de anti-HAV presentes nos animais infectados eram protectores. Consequentemente, os três animais infectados e um animal não infectado foram desafiados com aproximadamente 10^3 doses infecciosas para chimpanzé da estirpe HM-175 de



HAV do tipo selvagem (suspensão de fezes humanas), administradas intravenosamente (Fig. 1 a 4).

Todos os três chimpanzés previamente infectados estavam protegidos contra a hepatite do tipo A, conforme medido pelos valores persistentemente normais de enzimas séricas (Fig. 1 a 3). Todos os três animais protegidos tiveram uma resposta de anticorpos anamnésticos ao vírus de desafio, sugerindo que havia replicação limitada. Em contraste, o chimpanzé não infectado previamente desenvolveu elevados valores de enzimas, diagnóstico de hepatite após o desafio com vírus do tipo selvagem (Fig. 4). Assim, o banco de voluntários 87J19 produziu uma infecção não aparente em chimpanzés que estimulou proteção contra o subsequente desafio com vírus virulento do tipo selvagem.

Os resultados destas porções da experiência demonstram que o banco de voluntários 87J19 de HAV 4380, estirpe HM-175 (adaptada para células MRC-5) estava significativamente mais atenuado para chimpanzés e saguins do que a sua estirpe progenitora, HAV, estirpe HM-175 (AGMK, Passagem-32). É evidente destes estudos que o HAV 4380, estirpe HM-175 do banco de voluntários 87J19, é altamente atenuado para chimpanzés e saguins que são sub-rogados aceites para o homem no estudo de vírus da hepatite A.

Exemplo 2: Estudo clínico de voluntários.

Neste ensaio clínico, voluntários receberam títulos crescentes da vacina viva atenuada de hepatite A, 4380, banco de voluntários 87J19, que foi previamente testada em chimpanzés e saguins como descrito no Exemplo 1. Estes estudos pré-clínicos demonstraram que a vacina era segura, imunogênica e eficaz em modelos animais experimentais.

Admitiram-se voluntários numa enfermaria isolada do *United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases*, Fort Detrick, Maryland. Oito voluntários receberam a vacina viva atenuada de hepatite A (1 ml) pela via oral e da seguinte maneira: dois receberam uma dose de 10^4 TCID₅₀, dois uma dose de 10^5 TCID₅₀, dois uma dose de 10^6 TCID₅₀, e dois uma dose de 10^7 TCID₅₀. Seis voluntários receberam a vacina pela via intramuscular na área deltóide e da



seguinte maneira: 2 receberam uma dose de 10^5 TCID₅₀, 2 uma dose de 10^6 TCID₅₀ e 2 uma dose de 10^7 TCID₅₀.

Cada voluntário permaneceu na enfermaria durante três dias após a imunização. Monitorizaram-se efeitos locais ou sistêmicos durante o período de admissão e durante 12 semanas após a imunização. Pediu-se aos voluntários para voltarem aos 6 e aos 12 meses para seguimento serológico.

Os soros foram obtidos antes da imunização e uma vez por semana durante as 12 semanas seguintes. Em voluntários que completaram o tempo de seguimento apropriado, obtiveram-se também soros aos 6 e aos 12 meses após a administração inicial da vacina. Testaram-se os espécimes séricos quanto a alanina-aminotransferase (ALT) e anticorpos para a hepatite A. A ALT foi testada com um analisador Kodak EKTA Chem 700XR (Rochester, NY); os valores normais eram de 0 a 50 UI/ml. Os anticorpos para a hepatite A foram testados por quatro métodos diferentes, incluindo um radioimunoensaio comercial (HAVAB, Abbott Laboratories, N. Chicago, IL). Em segundo lugar, um imunoensaio com ligação de enzimas desenvolvido por SmithKline Beecham (SKB-ELISA), que foi mais sensível do que o HAVAB *standard*, em que um nível ≥ 20 miliunidades internacionais (mUI) era considerado positivo. Os soros seleccionados foram testados por RIFIT (radioimunofocagem) quanto a anticorpos neutralizantes para a hepatite A. Com este teste, um título sérico $\geq 1:10$ era considerado positivo [S.M. Lemon *et al*, *J. Infect. Dis.*, 148:1033-1039 (1983)]. Finalmente, os soros foram testados quanto a IgM anti-HAV por um radioimunoensaio comercial (HAVAB-M, Abbott Laboratories, N. Chicago, IL).

Recolheram-se fezes dos voluntários duas a três vezes por semana durante as primeiras 12 semanas que foram testadas quanto à presença de vírus da hepatite A por radioimunoensaio [R.H. Purcell *et al*, *J. Immunol.*, 116:349-356 (1976)] e técnicas de biologia molecular [J. Ticehurst *et al*, *J. Clin. Microbiol.*, 25:1822-1829 (1987)].

Todos os voluntários permaneceram saudáveis durante o período de seguimento (14 semanas a um ano). Não houveram queixas sistêmicas imediatamente após a imunização ou durante o seguimento a longo prazo. Os



níveis de séricos de alanina-aminotransferase permaneceram normais em todos os 14 indivíduos durante o período de observação.

Não foi observado anticorpo para a hepatite A em nenhum dos oito voluntários que receberam a vacina por via oral ou nos dois voluntários que receberam a dose de 10^5 TCID₅₀ pela via intramuscular. Os quatro voluntários que receberam maiores doses de vacina (10^6 TCID₅₀ ou 10^7 TCID₅₀) tinham todos anticorpo detectável pelo ELISA da SKB logo 3 semanas após a imunização. Os níveis detectáveis persistiram durante as 12 semanas de observação. Soros seleccionados testados quanto a anticorpo neutralizante tinham títulos que variavam de 1:10 a 1:40 num voluntário que tinha recebido uma dose de 10^6 e 1:40 a 1:2560 num voluntário que tinha recebido uma dose de 10^7 TCID₅₀. O ensaio HAVAB comercial detectou anti-HAV apenas num dos voluntários, que tinha recebido a dose de 10^7 . A IgM anti-HAV não foi detectada em nenhum dos voluntários que tinham recebido a vacina oralmente. Os soros de voluntários que tinham recebido 10^7 TCID₅₀ I.M. tinham IgM anti-HAV detectável.

As fezes de todos os voluntários que receberam a vacina oral foram negativas para o vírus da hepatite A, enquanto que as de voluntários que tinham recebido a vacina por via intramuscular estão a ser testadas.

Embora apenas um pequeno número de voluntários tenha recebido a vacina oralmente, pareceu que a vacina não é imunogénica por esta via. Isto deve-se provavelmente a sobre-atenuação do vírus, embora devam ser consideradas outras causas, tais como inactivação no tracto gastrointestinal ou um inóculo demasiado pequeno. A vacina foi segura e imunogénica pela via intramuscular em doses de 10^6 e 10^7 TCID₅₀. A resposta de anticorpos foi pronta: observou-se anti-HAV em 3 semanas após a imunização, persistiu durante o período de observação, e não diminuiu em título. Uma tal resposta a uma única inoculação de uma preparação a que faltava um adjuvante, é notável. Se realmente, o anti-HAV persistir durante muito tempo após uma dose, as logísticas de administração deste produto seriam muito mais simples e mais bem sucedidas do que com as vacinas actuais contra a hepatite A. A presença de IgM anti-HAV em voluntários que receberam 10^7 TCID₅₀ sem evidência de hepatite é sugestiva de replicação assintomática do vírus.

Exemplo 3: Construção de Vírus Quiméricos

Geraram-se vários vírus quiméricos exemplificativos para avaliar o efeito de várias das mutações da Tabela I num gama de hospedeiros e/ou atenuação em primatas. A sequência do vírus 4380 adaptado para MRC-5 foi obtida utilizando reacção em cadeia com polimerase: transcriptase inversa (RT:PCR) para amplificar regiões do vírus como ADNc antes da sequenciação (por isso T em vez de U na Tabela VI adiante). Os números 2-10 na Tabela VI designam vírus quimérico preparados por inserção de mutações encontradas no vírus 4380 adaptado para MRC-5 no clone pHAV/7 de ADNc que codifica o vírus HM-175, Passagem 35, atenuado, de Cohen *et al.*, *J. Virol.*, **61**:3035-3039 (1987) [SEQ ID NO:1 e 2]. Mutações introduzidas por "quimera" significa que uma porção do genoma do vírus 4380 foi amplificada por RT:PCR, digerida com enzimas de restrição específicas e que o fragmento foi utilizado para substituir o fragmento homólogo no clone pHAV/7 de ADNc. As mutações introduzidas por mutagénese foram inseridas por mutagénese dirigida por oligonucleótidos do clone pHAV/7 de ADNc utilizando o protocolo de mutagénese da Amersham.

Os ADNc quiméricos foram transcritos em ARN *in vitro* e os ácidos nucleicos (tanto ARN como ADN) foram transfectados em células FRhK-4 para gerar vírus quiméricos. A quantificação do crescimento do vírus quimérico para as quimeras exemplificativas foi realizada por ensaio "slot-blot".

A Tabela VI apresenta os resultados da construção e teste dos nove vírus quiméricos. Tal como se utiliza na Tabela VI, definem-se os seguintes termos: Cultura celular refere-se a vírus contendo as mutações indicadas seleccionado por crescimento em células MRC-5. Mutagénese refere-se a mutagénese dirigida por oligonucleótidos dos clones de ADNc de P-35 ou HM-175. Um genoma viral quimérico refere-se à construção de um genoma viral quimérico utilizando porções do clone de ADNc de P-35 e fragmentos gerados por PCR do vírus 4380 adaptado para células MRC-5. ND significa que este estudo não foi ainda realizado. O símbolo + refere-se a vírus que apresenta algum crescimento nesse tipo de célula. O símbolo - refere-se a vírus que apresenta pouco, ou não apresenta, crescimento nesse tipo de célula. Os dois tipos de células empregues para testar o crescimento dos vírus quiméricos são a linha de células semelhantes a fibroblastos de pulmão humano, MRC-5, e a linha de células semelhantes a epiteliais de rim de macaco Rhesus fetal, FRhK-4. Note-se que Vírus #1 na Tabela refere-se a HAV 4380 adaptado para MRC-5. Os vírus #2 a 10 são vírus quiméricos da presente invenção.



Tabela VI

Diferenças na sequência de Nucleótidos de vírus da hepatite A adaptado para MRC-5: Comparação com Vírus P-35 HM-175

Diferenças de nucleótidos de P-35 HM-175	Método de mutação introduzida	Crescimento de vírus mutado em culturas celulares	
		FRhK-4	MRC-5
Vírus #1 (adaptado para MRC-5)	Cultura celular	+	+
591 A para G			
646 G para A			
669 C para T			
687 T para G			
2864 T para A			
3196 G para A			
3934 A para G			
4418 A para T			
4643 A para T			
5145 A para G			
5745 A para T			
6216 T para C			
6908 T para C			
7032 C para T			
Vírus #2	Quimera	+	+
591 A para G			
646 G para A			
669 C para T			
687 T para G			
Vírus #3	Quimera	+	+
124 C para T			
131 d para T			
132 d para T			
133 d para T			
134 d para G			
152 G para A			
203-207 d para T			
591 A para G			
646 G para A			
669 C para T			
687 T para G			

d = Base nesta posição deletada em P-35 em comparação com o tipo selvagem



TABELA VI (cont)
Diferenças na sequência de Nucleótidos de vírus da hepatite A adaptado para
MRC-5: Comparação com Vírus P-35 HM-175

Diferenças de nucleótidos de P-35 HM-175	Método de mutação introduzida	Crescimento de vírus mutado em culturas celulares	
		FRhK-4	MRC-5
Vírus #4	Quimera	+	+
591 A para G			
646 G para A			
669 C para T			
687 T para G			
4418 A para T			
4643 A para T			
Vírus #5	Quimera	+	+
124 C para T			
131 d para T			
132 d para T			
133 d para T			
134 d para T			
152 G para A			
203-207 d para T			
591 A para G			
646 G para A			
669 C para T			
687 T para G			
4418 A para T			
4643 A para T			
d = Base nesta posição deletada em P-35 em comparação com o tipo selvagem			

A introdução de quatro mutações encontradas na região não codificante a 5', nas posições de nucleótido 591, 646, 669, e 687 do genoma de P-35, parece ser importante para a gama de hospedeiros de HAV em cultura celular. Estas permitem algum crescimento do vírus transfectado em células MRC-5, mas não são inteiramente responsáveis pela adaptação em cultura de células



MRC-5. A introdução de duas mutações, nos nucleótidos 4418 e 4643 na região 2C do vírus adaptado para MRC-5, com as mutações a 5' permite o completo crescimento em células MRC-5. Assim as quatro mutações na região não codificante a 5' e as duas mutações na região 2C do genoma do vírus adaptado para células MRC-5 parecem actuar sinergicamente na adaptação deste vírus ao eficiente crescimento em células MRC-5.

Exemplo 4: Comparação da diluição no ponto final dos vírus quiméricos em células FRhK-4 versus células MRC-5

Vírus quiméricos com a composição descrita na Tabela VI foram diluídos em série em incrementos de dez vezes, e plaqueou-se uma alíquota igual de cada diluição em células FRhK-4 e MRC-5. Após 21 dias de incubação a 34,5°C para permitir o crescimento do vírus, lisaram-se as células por adição de uma solução tampão contendo dodecilsulfato de sódio. Extraíu-se o ARN viral com fenol e quantificou-se por hibridação "slot blot" utilizando uma ribossonda marcada com [32p] específica para o vírus da hepatite A. Uma autorradiografia do "slot blot" obtido de células FRhK-4 e de células MRC-5 ilustra que a diluição no ponto final do vírus adaptado para MRC-5 foi o mesmo em ambas as linhas de células, indicando que este vírus pode crescer em qualquer das linhas de células. Em contraste, o vírus P35 HM-175 tinha uma diluição no ponto final de 10^{-5} em células FRhK-4 e $<10^{-1}$ em células MRC-5, demonstrando que este vírus é incapaz de crescer com sucesso em células MRC-5. Como ilustra a Fig. 5, o vírus #4 foi mais provavelmente o vírus adaptado para MRC-5 e os vírus #2, 3 e 5 eram intermediários. Estes resultados mostram que certas mutações do vírus adaptado para MRC-5 podem ser introduzidas no clone pHAV/7 de ADNc para gerar novos vírus que também adquiriram a capacidade de crescer em células MRC-5.

Numerosas modificações e variações da presente invenção estão incluídas no fascículo acima identificado e espera-se que sejam óbvias para um perito na arte. Estas modificações e alterações às composições e processos da presente invenção crêem-se abrangidos no âmbito das reivindicações anexas.



LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: SmithKline Beecham, Biologicals, s.a.
Government of USA, Dept. Health & Human Services
Funkhouser, Ann W.
Emerson, Suzanne U.
Purcell, Robert H.
D'Hondt, Eric

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Vacinas de vírus da hepatite A

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 2

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

- (A) DESTINATÁRIO: Howson and Howson
- (B) RUA: PO Box 457 Spring House Corporate Cntr
- (C) CIDADE: Spring House
- (D) ESTADO: Pennsylvania
- (E) PAÍS: EUA
- (F) ZIP: 19477

(v) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

- (A) TIPO DE MEIO: Disquete
- (B) COMPUTADOR: Compatível com PC da IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SUPORTE LÓGICO: PatentIn Release #1.0, Versão #1.25

(vi) DADOS DO PEDIDO ACTUAL:

- (A) NÚMERO DO PEDIDO: PCT/US93/08610
- (B) DATA DE APRESENTAÇÃO: 17-Set-1993
- (C) CLASSIFICAÇÃO:

(vii) DADOS DE PEDIDO ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DO PEDIDO: US 07/947,338
- (B) DATA DE APRESENTAÇÃO: 18-Set-1992

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE REPRESENTANTE/AGENTE:

- (A) NOME: Bak, Mary E.



- (B) NÚMERO DE REGISTO: 31 215
- (C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/CERTIFICADO: SBCP50110

(ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:

- (A) TELEFONE: 215-540-9206
- (B) TELEFAX: 215-540-5818

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 7493 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOME/CHAVE: CDS
- (B) LOCALIZAÇÃO: 735...7415

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

TTCAAGAGGG GTCTCCGGGA ATTTCCGGAG TCCCTCTTGG AAGTCCATGG	50
TGAGGGGACT TGATACCTCA CCGCCGTTTG CCTAGGCTAT AGGCTAAATT	100
TTCCCTTTCC CTTTCCCTT TCTATTCCC TTTGTTTGC TTGTAAATAT	150
TAATTCCTGC AGGTTTCAGGG TTCTTAAATC TGTTCCTCTA TAAGAACACT	200
CATTTTTTAC GCTTCTGTC TTCTTTCTTC CAGGGCTCTC CCCTTGCCCT	250
AGGCTCTGGC CGTTGCGCCC GCGGGGTCA ACTCCATGAT TAGCATGCAG	300
CTGTAGGAGT CTAAATTGGG GACACAGATG TTTGGAACGT CACCTTGCAG	350
TGTTAACTTG GCTTTCATGA ATCTCTTTGA TCTCCACAA GGGGTAGGCT	400
ACGGGTGAAA CCTCTTAGGC TAATACTTCT ATGAAGAGAT GCCTTGATA	450
GGGTAACAGC GCGGATATT GGTGAGTTGT TAAGACAAA ACCATTCAAC	500
GCCGGAGGAC TGA CTCTCAT CCAGTGGATG CATTGAGTGG ATTGACTGTC	550
AGGGCTGTCT TTAGGCTTAA TTCCAGACCT CTCTGTGCTT AGGGCAAACA	600
TCATTTGGCC TTAAATGGGA TTCGTGAGA GGGGATCCCT CCATTGACAG	650
CTGGACTGTT CTTTGGGGCC TTATGTGGTG TTTGCCTCTG AGGTACTCAG	700
GGGCATTTAG GTTTTCCTC ATTCTTAAAT AATA ATG AAC ATG TCT AGA	749
	Met Asn Met Ser Arg
	1 5
CAA GGT ATT TTC CAG ACT GTT GGG AGT GGT CTT GAC CAC ATC	791
Gln Gly Ile Phe Gln Thr Val Gly Ser Gly Leu Asp His Ile	
	10 15

CTG TCT TTG GCA GAC ATT GAG GAA GAG CAA ATG ATT CAA TCA Leu Ser Leu Ala Asp Ile Glu Glu Glu Gln Met Ile Gln Ser 20 25 30	833
GTT GAT AGG ACT GCA GTG ACT GGT GCT TCT TAT TTT ACT TCT Val Asp Arg Thr Ala Val Thr Gly Ala Ser Tyr Phe Thr Ser 35 40 45	875
GTG GAT CAA TCT TCA GTT CAT ACA GCT GAG GTT GGA TCA CAC Val Asp Gln Ser Ser Val His Thr Ala Glu Val Gly Ser His 50 55 60	917
CAG GTT GAA CCT TTG AGA ACC TCT GTT GAT AAA CCC GGT TCA Gln Val Glu Pro Leu Arg Thr Ser Val Asp Lys Pro Gly Ser 65 70 75	959
AAG AAG ACT CAG GGA GAG AAA TTT TTC TTG ATT CAT TCT GCA Lys Lys Thr Gln Gly Glu Lys Phe Phe Leu Ile His Ser Ala 80 85	1001
GAT TGG CTT ACT ACA CAT GCT CTT TTC CAT GAA GTT GCA AAA Asp Trp Leu Thr Thr His Ala Leu Phe His Glu Val Ala Lys 90 95 100	1043
TTG GAT GTG GTG AAA TTA TTA TAC AAT GAG CAG TTT GCT GTT Leu Asp Val Val Lys Leu Leu Tyr Asn Glu Gln Phe Ala Val 105 110 115	1085
CAA GGG TTG TTG AGA TAC CAT ACA TAT GCA AGA TTT GGC ATT Gln Gly Leu Leu Arg Tyr His Thr Tyr Ala Arg Phe Gly Ile 120 125 130	1127
GAA ATT CAA GTT CAG ATA AAC CCT ACA CCT TTC CAA CAG GCG Glu Ile Gln Val Gln Ile Asn Pro Thr Pro Phe Gln Gln Gly 135 140 145	1169
GGA TTG ATC TGT GCT ATG GTT CCT GGT GAC CAG AGC TAT GGT Gly Leu Ile Cys Ala Met Val Pro Gly Asp Gln Ser Tyr Gly 150 155	1211
TCT ATA GCA TCA TTG ACT GTT TAT CCT CAT GGT TTG TTA AAT Ser Ile Ala Ser Leu Thr Val Tyr Pro His Gly Leu Leu Asn 160 165 170	1253
TGC AAT ATT AAC AAT GTG GTT AGA ATA AAG GTT CCA TTT ATT Cys Asn Ile Asn Asn Val Val Arg Ile Lys Val Pro Phe Ile 175 180 185	1295
TAC ACA AGA GGT GCT TAC CAC TTT AAA GAT CCA CAA TAC CCA Tyr Thr Arg Gly Ala Tyr His Phe Lys Asp Pro Gln Tyr Pro 190 195 200	1337

GTT TGG GAA TTG ACA ATT AGA GTT TGG TCA GAA TTA AAT ATT	1379
Val Trp Glu Leu Thr Ile Arg Val Trp Ser Glu Leu Asn Ile	
205 210 215	
GGG ACA GGA ACT TCA GCT TAT ACT TCA CTC AAT GTT TTA GCT	1421
Gly Thr Gly Thr Ser Ala Tyr Thr Ser Leu Asn Val Leu Ala	
220 225	
AGA TTT ACA GAT TTG GAG TTG CAT GGA TTA ACT CCT CTT TCT	1463
Arg Phe Thr Asp Leu Glu Leu His Gly Leu Thr Pro Leu Ser	
230 235 240	
ACA CAA ATG ATG AGA AAT GAA TTT AGG GTC AGT ACT ACT GAG	1505
Thr Gln Met Met Arg Asn Glu Phe Arg Val Ser Thr Thr Glu	
245 250 255	
AAT GTG GTG AAT CTG TCA AAT TAT GAA GAT GCA AGA GCA AAG	1547
Asn Val Val Asn Leu Ser Asn Tyr Glu Asp Ala Arg Ala Lys	
260 265 270	
ATG TCT TTT GCT TTG GAT CAG GAA GAT TGG AAA TCT GAT CCG	1589
Met Ser Phe Ala Leu Asp Gln Glu Asp Trp Lys Ser Asp Pro	
275 280 285	
TCC CAG GGT GGT GGG ATC AAA ATT ACT CAT TTT ACT ACT TGG	1631
Ser Gln Gly Gly Gly Ile Lys Ile Thr His Phe Thr Thr Trp	
290 295	
ACA TCT ATT CCA ACT TTG GCT GCT CAG TTT CCA TTT AAT GCT	1673
Thr Ser Ile Pro Thr Leu Ala Ala Gln Phe Pro Phe Asn Ala	
300 305 310	
TCA GAC TCA GTT GGT CAA CAA ATT AAA GTT ATT CCA GTT GAC	1715
Ser Asp Ser Val Gly Gln Gln Ile Lys Val Ile Pro Val Asp	
315 320 325	
CCA TAT TTT TTC CAA ATG ACA AAT ACG AAT CCT GAC CAA AAA	1757
Pro Tyr Phe Phe Gln Met Thr Asn Thr Asn Pro Asp Gln Lys	
330 335 340	
TGT ATA ACT GCT TTG GCT TCT APT TGT CAG ATG TTT TGT TTT	1799
Cys Ile Thr Ala Leu Ala Ser Ile Cys Gln Met Phe Cys Phe	
345 350 355	
TGG AGA GGA GAT CTT GTC TTT GAT TTT CAA GTT TTT CCC ACC	1841
Trp Arg Gly Asp Leu Val Phe Asp Phe Gln Val Phe Pro Thr	
360 365	
AAA TAT CAT TCA GGT AGA TTA CTG TTT TGT TTT GTT CCT GGC	1883
Lys Tyr His Ser Gly Arg Leu Leu Phe Cys Phe Val Pro Gly	
370 375 380	

AAT GAG CTA ATA GAT GTT TCT GGA ATC ACA TTA AAG CAA GCA Asn Glu Leu Ile Asp Val Ser Gly Ile Thr Leu Lys Gln Ala 385 390 395	1925
ACT ACT GCT CCT TGT GCA GTA ATG GAT ATT ACA GGA GTG CAG Thr Thr Ala Pro Cys Ala Val Met Asp Ile Thr Gly Val Gln 400 405 410	1967
TCA ACT TTG AGA TTT CGT GTT CCC TGG ATT TCT GAC ACT CCT Ser Thr Leu Arg Phe Arg Val Pro Trp Ile Ser Asp Thr Pro 415 420 425	2009
TAC AGA GTG AAC AGG TAT ACA AAG TCA GCA CAT CAG AAA GGT Tyr Arg Val Asn Arg Tyr Thr Lys Ser Ala His Gln Lys Gly 430 435	2051
GAG TAC ACT GCC ATT GGG AAG CTT ATT GTG TAT TGT TAT AAC Glu Tyr Thr Ala Ile Gly Lys Leu Ile Val Tyr Cys Tyr Asn 440 445 450	2093
AGA TTG ACC TCT CCT TCT AAC GTT GCT TCC CAT GTC AGA GTG Arg Leu Thr Ser Pro Ser Asn Val Ala Ser His Val Arg Val 455 460 465	2135
AAT GTT TAT CTT TCA GCA ATT AAC TTG GAA TGT TTT GCT CCT Asn Val Tyr Leu Ser Ala Ile Asn Leu Glu Cys Phe Ala Pro 470 475 480	2177
CTT TAT CAT GCT ATG GAT GTT ACT ACA CAA GTT GGA GAT GAT Leu Tyr His Ala Met Asp Val Thr Thr Gln Val Gly Asp Asp 485 490 495	2219
TCT GGA GGT TTT TCA ACA ACA GTT TCT ACA GAA CAG AAT GTT Ser Gly Gly Phe Ser Thr Thr Val Ser Thr Glu Gln Asn Val 500 505	2261
CCA GAT CCC CAA GTT GGT ATA ACA ACC ATG AAA GAT TTG AAA Pro Asp Pro Gln Val Gly Ile Thr Thr Met Lys Asp Leu Lys 510 515 520	2303
GGA AAA GCT AAC AGA GGG AAA ATG GAT GTT TCA GGA GTA CAA Gly Lys Ala Asn Arg Gly Lys Met Asp Val Ser Gly Val Gln 525 530 535	2345
GCA CCT GTG GGA GCT ATC ACA ACA ATT GAG GAT CCA GTT TTA Ala Pro Val Gly Ala Ile Thr Thr Ile Glu Asp Pro Val Leu 540 545 550	2387
GCA AAG AAA GTA CCT GAG ACA TTT CCT GAA TTG AAA CCT GGA Ala Lys Lys Val Pro Glu Thr Phe Pro Glu Leu Lys Pro Gly 555 560 565	2429

GAA TCC AGA CAT ACA TCA GAT CAT ATG TCC ATC TAC AAG TTT Glu Ser Arg His Thr Ser Asp His Met Ser Ile Tyr Lys Phe 570 575	2471
ATG GGA AGG TCT CAT TTC TTG TGC ACT TTT ACA TTC AAT TCA Met Gly Arg Ser His Phe Leu Cys Thr Phe Thr Phe Asn Ser 580 585 590	2513
AAT AAT AAA GAG TAC ACA TTT CCT ATA ACC TTG TCT TCA ACC Asn Asn Lys Glu Tyr Thr Phe Pro Ile Thr Leu Ser Ser Thr 595 600 605	2555
TCT AAT CCT CCT CAT GGT TTG CCA TCA ACA CTG AGG TGG TTT Ser Asn Pro Pro His Gly Leu Pro Ser Thr Leu Arg Trp Phe 610 615 620	2597
TTC AAC TTG TTT CAG TTG TAT AGA GGG CCT TTA GAT CTG ACA Phe Asn Leu Phe Gln Leu Tyr Arg Gly Pro Leu Asp Leu Thr 625 630 635	2639
ATT ATT ATT ACA GGA GCA ACT GAT GTA GAT GGC ATG GCC TGG Ile Ile Ile Thr Gly Ala Thr Asp Val Asp Gly Met Ala Trp 640 645	2681
TTC ACT CCA GTA GGT CTT GCC GTT GAT ACT CCT TGG GTA GAG Phe Thr Pro Val Gly Leu Ala Val Asp Thr Pro Trp Val Glu 650 655 660	2723
AAG GAG TCA GCT TTG TCT ATT GAC TAC AAA ACT GCT CTT GGA Lys Glu Ser Ala Leu Ser Ile Asp Tyr Lys Thr Ala Leu Gly 665 670 675	2765
GCT GTC AGA TTT AAC ACA AGG AGA ACA GGG AAC ATT CAG ATT Ala Val Arg Phe Asn Thr Arg Arg Thr Gly Asn Ile Gln Ile 680 685 690	2807
AGA TTA CCA TGG TAT TCT TAT TTA TAT GCT GTG TCT GGA GCA Arg Leu Pro Trp Tyr Ser Tyr Leu Tyr Ala Val Ser Gly Ala 695 700 705	2849
CTG GAT GGT TTG GGT GAC AAG ACA GAT TCT ACA TTT GGA TTG Leu Asp Gly Leu Gly Asp Lys Thr Asp Ser Thr Phe Gly Leu 710 715	2891
GTT TCT ATT CAG ATT GCA AAT TAC AAT CAT TCT GAT GAA TAC Val Ser Ile Gln Ile Ala Asn Tyr Asn His Ser Asp Glu Tyr 720 725 730	2933
TTG TCT TTT AGT TGT TAT TTG TCT GTC ACA GAA CAA TCA GAG Leu Ser Phe Ser Cys Tyr Leu Ser Val Thr Glu Gln Ser Glu 735 740 745	2975

TTT TAT TTT CCC AGA GCT CCA TTG AAC TCA AAT GCC ATG TTA Phe Tyr Phe Pro Arg Ala Pro Leu Asn Ser Asn Ala Met Leu 750 755 760	3017
TCC ACT GAA TCA ATG ATG AGC AGA ATT GCA GCT GGA GAC TTG Ser Thr Glu Ser Met Met Ser Arg Ile Ala Ala Gly Asp Leu 765 770 775	3059
GAG TCA TCA GTG GAT GAT CCT AGA TCA GAG GAA GAT AAA AGA Glu Ser Ser Val Asp Asp Pro Arg Ser Glu Glu Asp Lys Arg 780 785	3101
TTT GAG AGT CAT ATA GAA TGC AGG AAG CCA TAT AAA GAA CTG Phe Glu Ser His Ile Glu Cys Arg Lys Pro Tyr Lys Glu Leu 790 795 800	3143
AGA TTA GAA GTT GGG AAA CAA AGA CTC AAG TAT GCT CAG GAA Arg Leu Glu Val Gly Lys Gln Arg Leu Lys Tyr Ala Gln Glu 805 810 815	3185
GAA TTG TCA AAT GAA GTA CTT CCA CCC CCT AGG AAA ATG AAG Glu Leu Ser Asn Glu Val Leu Pro Pro Pro Arg Lys Met Lys 820 825 830	3227
GGA CTG TTT TCA CAA GCC AAA ATT TCT CTT TTT TAT ACT GAG Gly Leu Phe Ser Gln Ala Lys Ile Ser Leu Phe Tyr Thr Glu 835 840 845	3269
GAG CAT GAA ATA ATG AAG TTT TCC TGG AGA GGT GTG ACT GCT Glu His Glu Ile Met Lys Phe Ser Trp Arg Gly Val Thr Ala 850 855	3311
GAT ACT AGA GCT TTA AGG AGG TTT GGA TTC TCT TTG GCC GCA Asp Thr Arg Ala Leu Arg Arg Phe Gly Phe Ser Leu Ala Ala 860 865 870	3353
GGC AGA AGT GTG TGG ACT CTT GAA ATG GAT GCT GGG GTT CTT Gly Arg Ser Val Trp Thr Leu Glu Met Asp Ala Gly Val Leu 875 880 885	3395
ACT GGG AGA CTG ATT AGA TTG AAT GAT GAG AAA TGG ACA GAA Thr Gly Arg Leu Ile Arg Leu Asn Asp Glu Lys Trp Thr Glu 890 895 900	3437
ATG AAG GAT GAC AAG ATT GTT TCA TTC ATT GAA AAG TTT ACA Met Lys Asp Asp Lys Ile Val Ser Leu Ile Glu Lys Phe Thr 905 910 915	3479
AGT AAC AAA TAT TGG TCC AAA GTG AAT TTC CCA CAT GGG ATG Ser Asn Lys Tyr Trp Ser Lys Val Asn Phe Pro His Gly Met 920 925	3521

TTG GAT CTT GAA GAA ATT GCT GCC AAT TCT AAG GAT TTT CCT Leu Asp Leu Glu Glu Ile Ala Ala Asn Ser Lys Asp Phe Pro 930 935 940	3563
AAC ATG TCT GAA ACG GAT TTG TGT TTC TTG CTG CAT TGG TTA Asn Met Ser Glu Thr Asp Leu Cys Phe Leu Leu His Trp Leu 945 950 955	3605
AAT CCA AAG AAA ATT AAT TTA GCA GAT AGA ATG CTT GGA TTG Asn Pro Lys Lys Ile Asn Leu Ala Asp Arg Met Leu Gly Leu 960 965 970	3647
TCT GGA GTT CAG GAA ATT AAA GAA CAA GGT GTT GGA TTA ATA Ser Gly Val Gln Glu Ile Lys Glu Gln Gly Val Gly Leu Ile 975 980 985	3689
GCA GAG TGT AGA ACT TTC TTA GAT TCT ATT GCT GGA ACT TTA Ala Glu Cys Arg Thr Phe Leu Asp Ser Ile Ala Gly Thr Leu 990 995	3731
AAA TCT ATG ATG TTT GGA TTT CAT CAT TCT GTG ACT GTT GAA Lys Ser Met Met Phe Gly Phe His His Ser Val Thr Val Glu 1000 1005 1010	3773
ATT ATA AAC ACT GTG CTC TGT TTT GTT AAG AGT GGA ATT TTG Ile Ile Asn Thr Val Leu Cys Phe Val Lys Ser Gly Ile Leu 1015 1020 1025	3815
CTT TAT GTA ATA CAA CAA TTG AAT CAG GAT GAA CAT TCT CAC Leu Tyr Val Ile Gln Gln Leu Asn Gln Asp Glu His Ser His 1030 1035 1040	3857
ATA ATT GGT TTG TTG AGA GTC ATG AAT TAT GCA GAT ATT GGT Ile Ile Gly Leu Leu Arg Val Met Asn Tyr Ala Asp Ile Gly 1045 1050 1055	3899
TGT TCA GTT ATT TCA TGT GCC AAA GTT TTT TCC AAA ATG CTG Cys Ser Val Ile Ser Cys Gly Lys Val Phe Ser Lys Met Leu 1060 1065	3941
GAA ACA GTC TTT AAT TGG CAA ATG GAC TCC AGA ATG ATG GAG Glu Thr Val Phe Asn Trp Gln Met Asp Ser Arg Met Met Glu 1070 1075 1080	3983
TTA AGG ACT CAG AGT TTT TCC AAC TGG TTA AGA GAT ATT TGT Leu Arg Thr Gln Ser Phe Ser Asn Trp Leu Arg Asp Ile Cys 1085 1090 1095	4025
TCT GGG ATC ACC ATT TTT AAA AAC TTC AAG GAT GCA ATT TAT Ser Gly Ile Thr Ile Phe Lys Asn Phe Lys Asp Ala Ile Tyr 1100 1105 1110	4067

TGG CTT TAT ACA AAA TTA AAG GAC TTT TAT GAA GTG AAT TAT	4109
Trp Leu Tyr Thr Lys Leu Lys Asp Phe Tyr Glu Val Asn Tyr	
1115 1120 1125	
GGC AAG AAG AAG GAC ATT TTA AAT ATT CTT AAA GAT AAC CAA	4151
Gly Lys Lys Lys Asp Ile Leu Asn Ile Leu Lys Asp Asn Gln	
1130 1135	
CAA AAA ATA GAG AAA GCC ATT GAG GAA GCC GAT GAA TTT TGC	4193
Gln Lys Ile Glu Lys Ala Ile Glu Glu Ala Asp Glu Phe Cys	
1140 1145 1150	
ATT TTG CAA ATC CAA GAT GTG GAA AAA TTT GAA CAG TAT CAG	4235
Ile Leu Gln Ile Gln Asp Val Glu Lys Phe Glu Gln Tyr Gln	
1155 1160 1165	
AAA GGG GTT GAC TTG ATA CAA AAA TTG AGA ACT GTT CAT TCA	4277
Lys Gly Val Asp Leu Ile Gln Lys Leu Arg Thr Val His Ser	
1170 1175 1180	
ATG GCT CAG GTT GAT CCA AAT TTA ATG GTT CAT TTG TCA CCT	4319
Met Ala Gln Val Asp Pro Asn Leu Met Val His Leu Ser Pro	
1185 1190 1195	
TTG AGA GAT TGT ATA GCA AGA GTT CAT CAG AAA CTT AAA AAC	4361
Leu Arg Asp Cys Ile Ala Arg Val His Gln Lys Leu Lys Asn	
1200 1205	
CTT GGA TCT ATA AAT CAG GCA ATG GTA ACG AGA TGT GAG CCA	4403
Leu Gly Ser Ile Asn Gln Ala Met Val Thr Arg Cys Glu Pro	
1210 1215 1220	
GTT GTT TGT TAT TTA TAT GGC AAA AGA GGG GGA GGA AAG AGC	4445
Val Val Cys Tyr Leu Tyr Gly Lys Arg Gly Gly Gly Lys Ser	
1225 1230 1235	
TTA ACA TCA ATT GCA TTG CCA ACC AAA ATT TGT AAA CAT TAT	4487
Leu Thr Ser Ile Ala Leu Ala Thr Lys Ile Cys Lys His Tyr	
1240 1245 1250	
GGT GTT GAG CCT GAA AAG AAT ATC TAT ACT AAA CCT GTG GCT	4529
Gly Val Glu Pro Glu Lys Asn Ile Tyr Thr Lys Pro Val Ala	
1255 1260 1265	
TCA GAT TAC TGG GAT GGA TAT AGT GGA CAA TTA GTT TGC ATC	4571
Ser Asp Tyr Trp Asp Gly Tyr Ser Gly Gln Leu Val Cys Ile	
1270 1275	
ATT GAT GAT ATT GGC CAA AAC ACA ACA GAT GAG GAT TGG TCA	4613
Ile Asp Asp Ile Gly Gln Asn Thr Thr Asp Glu Asp Trp Ser	
1280 1285 1290	

GAT TTT TGT CAG TTA GTG TCA GGA TGT CCA ATG AGA TTA AAC Asp Phe Cys Gln Leu Val Ser Gly Cys Pro Met Arg Leu Asn 1295 1300 1305	4655
ATG GCC TCT CTT GAG GAG AAG GGT AGG CAT TTT TCT TCT CCT Met Ala Ser Leu Glu Glu Lys Gly Arg His Phe Ser Ser Pro 1310 1315 1320	4697
TTT ATA ATA GCA ACT TCA AAT TGG TCA AAT CCA AGT CCA AAA Phe Ile Ile Ala Thr Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ser Pro Lys 1325 1330 1335	4739
ACA GTT TAT GTT AAG GAA GCA ATT GAC CGC AGA CTC CAT TTC Thr Val Tyr Val Lys Glu Ala Ile Asp Arg Arg Leu His Phe 1340 1345	4781
AAG GTT GAA GTT AAA CCT GCT TCA TTT TTC AAA AAT CCT CAC Lys Val Glu Val Lys Pro Ala Ser Phe Phe Lys Asn Pro His 1350 1355 1360	4823
AAT GAT ATG TTG AAT GTT AAT TTA GCT AAA ACA AAT GAT GCA Asn Asp Met Leu Asn Val Asn Leu Ala Lys Thr Asn Asp Ala 1365 1370 1375	4865
ATC AAA GAT ATG TCT TGT GTT GAT TTG ATA ATG GAT GGA CAT Ile Lys Asp Met Ser Cys Val Asp Leu Ile Met Asp Gly His 1380 1385 1390	4907
AAT GTT TCA TTG ATG GAT TTG CTC AGT TCT TTA GTC ATG ACA Asn Val Ser Leu Met Asp Leu Leu Ser Ser Leu Val Met 1395 1400 1405	4949
GTT GAA ATT AGA AAA CAA AAC ATG ACT GAA TTC ATG GAG TTG Val Glu Ile Arg Lys Gln Asn Met Thr Glu Phe Met Glu Leu 1410 1415	4991
TGG TCT CAG GGA ATT TCA GAT GAT GAT AAT GAT AGT GCA GTA Trp Ser Gln Gly Ile Ser Asp Asp Asp Asn Asp Ser Ala Val 1420 1425 1430	5033
GCT GAG TTT TTC CAG TCT TTT CCA TCT GGT GAA CCA TCG AAC Ala Glu Phe Phe Gln Ser Phe Pro Ser Gly Glu Pro Ser Asn 1435 1440 1445	5075
TCT AAA TTA TCT GGC TTT TTC CAA TCT GTT ACT AAT CAC AAG Ser Lys Leu Ser Gly Phe Phe Gln Ser Val Thr Asn His Lys 1450 1455 1460	5117
TGG GTT GCT GTG GGA GCT GCA GTT GGC ATT CTT GGA GTG CTC Trp Val Ala Val Gly Ala Ala Val Gly Ile Leu Gly Val Leu 1465 1470 1475	5159

GTT GGA GGA TGG TTT GTG TAT AAG CAT TTC TCC CGC AAA GAG Val Gly Gly Trp Phe Val Tyr Lys His Phe Ser Arg Lys Glu 1480 1485	5201
GAG GAA CCA ATC CCA GCT GAA GGG GTA TAT CAT GGT GTA ACT Glu Glu Pro Ile Pro Ala Glu Gly Val Tyr His Gly Val Thr 1490 1495 1500	5243
AAG CCC AAG CAA GTG ATT AAA TTA GAT GCA GAT CCA GTA GAA Lys Pro Lys Gln Val Ile Lys Leu Asp Ala Asp Pro Val Glu 1505 1510 1515	5285
TCT CAG TCA ACT TTG GAA ATA GCA GGA CTG GTT AGG AAG AAC Ser Gln Ser Thr Leu Glu Ile Ala Gly Leu Val Arg Lys Asn 1520 1525 1530	5327
TTG GTT CAG TTT GGA GTT GGA GAG AAG AAT GGA TGT GTG AGA Leu Val Gln Phe Gly Val Gly Glu Lys Asn Gly Cys Val Arg 1535 1540 1545	5369
TGG GTT ATG AAT GCC TTG GGA GTG AAA GAT GAT TGG CTG CTT Trp Val Met Asn Ala Leu Gly Val Lys Asp Asp Trp Leu Leu 1550 1555	5411
GTG CCT TCC CAT GCT TAT AAA TTT GAG AAA GAT TAT GAA ATG Val Pro Ser His Ala Tyr Lys Phe Glu Lys Asp Tyr Glu Met 1560 1565 1570	5453
ATC CAG TTT TAT TTT AAT AGA GGT GGA ACT TAC TAT TCA ATT Met Glu Phe Tyr Phe Asn Arg Gly Gly Thr Tyr Ser Ile 1575 1580 1585	5495
TCA GCT GGT AAT GTT GTT ATT CAA TCT TTG GAT GTG GGA TTC Ser Ala Gly Asn Val Val Ile Gln Ser Leu Asp Val Gly Phe 1590 1595 1600	5537
CAG GAT GTT GTT CTG ATG AAG GTT CCT ACA ATT CCT AAG TTT Gln Asp Val Val Leu Met Lys Val Pro Thr Ile Pro Lys Phe 1605 1610 1615	5579
AGA GAT ATT ACT CAG CAT TTT ATT AAG AAA GGG GAT GTG CCT Arg Asp Ile Thr Gln His Phe Ile Lys Lys Gly Asp Val Pro 1620 1625	5621
AGA GCT TTG AAT CGC CTG GCA ACA TTA GTG ACA ACT GTA AAT Arg Ala Leu Asn Arg Leu Ala Thr Leu Val Thr Thr Val Asn 1630 1635 1640	5663
GGA ACC CCT ATG TTA ATT TCT GAG GGC CCA CTA AAG ATG GAA Gly Thr Pro Met Leu Ile Ser Glu Gly Pro Leu Lys Met Glu 1645 1650 1655	5705

GAG AAA GCT ACT TAT GTT CAT AAG AAA AAT GAT GGT ACA ACA Glu Lys Ala Thr Tyr Val His Lys Lys Asn Asp Gly Thr Thr 1660 1665 1670	5747
GTT GAT TTA ACT GTG GAT CAG GCA TGG AGA GGA AAA GGC GAA Val Asp Leu Thr Val Asp Gln Ala Trp Arg Gly Lys Gly Glu 1675 1680 1685	5789
GGT CTT CCT GGA ATG TGT GGT GGG GCC TTG GTT TCA TCG AAT Gly Leu Pro Gly Met Cys Gly Gly Ala Leu Val Ser Ser Asn 1690 1695	5831
CAA TCT ATA CAG AAT GCA ATC TTG GGC ATC CAT GTT GCT GGA Gln Ser Ile Gln Asn Ala Ile Leu Gly Ile His Val Ala Gly 1700 1705 1710	5873
GGA AAT TCA ATT CTT GTT GCA AAA TTG GTT ACT CAA GAA ATG Gly Asn Ser Ile Leu Val Ala Lys Leu Val Thr Gln Glu Met 1715 1720 1725	5915
TTC CAA AAT ATT GAT AAG AAA ATT GAA AGT CAG AGA ATT ATG Phe Gln Asn Ile Asp Lys Lys Ile Glu Ser Gln Arg Ile Met 1730 1735 1740	5957
AAA GTG GAG TTT ACT CAG TGT TCA ATG AAT GTG GTC TCC AAA Lys Val Glu Phe Thr Gln Cys Ser Met Asn Val Val Ser Lys 1745 1750 1755	5999
ACG CTT TTT AGA AAG AGT CCC ATT TAT CAT CAC ATT GAT AAA Thr Leu Phe Arg Lys Ser Pro Ile Tyr His His Ile Asp Lys 1760 1765	6041
ACC ATG ATT AAT TTT CCT GCA GCT ATG CCC TTT TCT AAA GCT Thr Met Ile Asn Phe Pro Ala Ala Met Pro Phe Ser Lys Ala 1770 1775 1780	6083
CAA ATT GAT CCA ATG GCT GTG ATG TTA TCT AAG TAT TCA TTA Glu Ile Asp Pro Met Ala Val Met Leu Ser Lys Tyr Ser Leu 1785 1790 1795	6125
CCT ATT GTA GAA GAA CCA GAG GAT TAT AAA GAG GCT TCA ATT Pro Ile Val Glu Glu Pro Glu Asp Tyr Lys Glu Ala Ser Ile 1800 1805 1810	6167
TTT TAT CAA AAT AAA ATA GTG GGT AAG ACT CAG TTA GTT GAT Phe Tyr Gln Asn Lys Ile Val Gly Lys Thr Gln Leu Val Asp 1815 1820 1825	6209
GAT TTT TTA GAT CTT GAT ATG GCC ATT ACA GGG GCC CCA GGA Asp Phe Leu Asp Leu Asp Met Ala Ile Thr Gly Ala Pro Gly 1830 1835	6251

ATT GAT GCT ATC AAC ATG GAT TCA TCT CCT GGA TTT CCT TAT Ile Asp Ala Ile Asn Met Asp Ser Ser Pro Gly Phe Pro Tyr 1840 1845 1850	6293
GTC CAG GAG AAG TTG ACC AAA AGA GAT TTA ATT TGG TTG GAT Val Gln Glu Lys Leu Thr Lys Arg Asp Leu Ile Trp Leu Asp 1855 1860 1865	6335
GAA AAT GGT TTA TTG CTG GGA GTT CAT CCA AGA TTG GCT CAG Glu Asn Gly Leu Leu Leu Gly Val His Pro Arg Leu Ala Gln 1870 1875 1880	6377
AGA ATC TTA TTC AAT ACT GTC ATG ATG GAA AAT TGT TCT GAT Arg Ile Leu Phe Asn Thr Val Met Met Glu Asn Cys Ser Asp 1885 1890 1895	6419
TTG GAT GTT GTT TTT ACA ACC TGT CCA AAA GAT GAA TTG AGA Leu Asp Val Val Phe Thr Thr Cys Pro Lys Asp Glu Leu Arg 1900 1905	6461
CCA TTA GAG AAA GTG TTG GAA TCA AAA ACA AGA GCT ATT GAT Pro Leu Glu Lys Val Leu Glu Ser Lys Thr Arg Ala Ile Asp 1910 1915 1920	6503
GCT TGT CCT CTG GAT TAC TCA ATT TTG TGC CGA ATG TAT TGG Ala Cys Pro Leu Asp Tyr Ser Ile Leu Cys Arg Met Tyr Trp 1925 1930 1935	6545
GGT CCA GCT ATT AGT TAT TTT CAT TTG AAT CCA GGT TTC CAT Gly Pro Ala Ile Ser Tyr Phe His Leu Asn Pro Gly Phe His 1940 1945 1950	6587
ACA GGT GTT GCT ATT GGC ATA GAT CCT GAT AGA CAG TGG GAT Thr Gly Val Ala Ile Gly Ile Asp Pro Asp Arg Gln Trp Asp 1955 1960 1965	6629
GAA TTA TTT AAA ACA ATG ATA AGA TTC CGA GAT GTT GGT CTT Glu Leu Phe Lys Thr Met Ile Arg Phe Gly Asp Val Gly Leu 1970 1975	6671
GAT TTA GAT TTC TCT GCT TTT GAT GCT AGT CTT AGT CCA TTT Asp Leu Asp Phe Ser Ala Phe Asp Ala Ser Leu Ser Pro Phe 1980 1985 1990	6713
ATG ATT AGA GAA GCA GGT AGA ATC ATG ACT GAA CTA TCT GGA Met Ile Arg Glu Ala Gly Arg Ile Met Ser Glu Leu Ser Gly 1995 2000 2005	6755
ACT CCA TCC CAT TTT GGC ACA GCT CTT ATC AAT ACT ATC ATT Thr Pro Ser His Phe Gly Thr Ala Leu Ile Asn Thr Ile Ile 2010 2015 2020	6797

TAT TCC AAG CAT TTG CTG TAT AAC TGT TGT TAC CAT GTC TGT	6839
Tyr Ser Lys His Leu Leu Tyr Asn Cys Cys Tyr His Val Cys	
2025 2030 2035	
GGT TCA ATG CCC TCT GGG TCT CCT TGT ACA GCT TTG CTA AAT	6881
Gly Ser Met Pro Ser Gly Ser Pro Cys Thr Ala Leu Leu Asn	
2040 2045	
TCA ATT ATT AAT AAT GTC AAT TTG TAT TAT GTG TTT TCC AAG	6923
Ser Ile Ile Asn Asn Val Asn Leu Tyr Tyr Val Phe Ser Lys	
2050 2055 2060	
ATA TTT GGA AAG TCT CCA GTT TTC TTT TGT CAG GCT TTG AAG	6965
Ile Phe Gly Lys Ser Pro Val Phe Phe Cys Gln Ala Leu Lys	
2065 2070 2075	
ATT CTC TGT TAT GGA GAT GAT GTT TTA ATA GTT TTC TCT CGA	7007
Ile Leu Cys Tyr Gly Asp Asp Val Leu Ile Val Phe Ser Arg	
2080 2085 2090	
GAT GTT CAG ATT GAT AAT CTT GAT TTG ATT GGA CAA AAA ATT	7049
Asp Val Gln Ile Asp Asn Leu Asp Leu Ile Gly Gln Lys Ile	
2095 2100 2105	
GTA GAT GAG TTT AAG AAA CTT GGC ATG ACA GCT ACT TCT GCT	7091
Val Asp Glu Phe Lys Lys Leu Gly Met Thr Ala Thr Ser Ala	
2110 2115	
GAC AAG AAT GTA CCT CAG CTG AAA ECA GTT TCG GAA TTG ACT	7133
Asp Lys Asn Val Pro Gln Leu Lys Pro Val Ser Glu Leu Thr	
2120 2125 2130	
TTT CTC AAA AGA TCT TTC AAT TTG GTA GAG GAT AGA ATT AGA	7175
Phe Leu Lys Arg Ser Phe Asn Leu Val Glu Asp Arg Ile Arg	
2135 2140 2145	
CCT CCA ATT TCG GAA AAA ACA ATT TGG TCT TTA ATA GCA TGG	7217
Pro Ala Ile Ser Glu Lys Thr Ile Trp Ser Leu Ile Ala Trp	
2150 2155 2160	
CAG AGA AGT AAC GCT GAG TTT GAG CAG AAT TTA GAA AAT GCT	7259
Gln Arg Ser Asn Ala Glu Phe Glu Gln Asn Leu Glu Asn Ala	
2165 2170 2175	
CAG TGG TTT GCT TTT ATG CAT GGC TAT GAG TTT TAT CAG AAA	7301
Gln Trp Phe Ala Phe Met His Gly Tyr Glu Phe Tyr Gln Lys	
2180 2185	
TTT TAT TAT TTT GTT CAG TCC TGT TTG GAG AAA GAG ATG ATA	7343
Phe Tyr Tyr Phe Val Gln Ser Cys Leu Glu Lys Glu Met Ile	
2190 2195 2200	

GAA TAC AGA CTT AAA TCT TAT GAT TGG TGG AGA ATG AGA TTT 7385
Glu Tyr Arg Leu Lys Ser Tyr Asp Trp Trp Arg Met Arg Phe
2205 2210 2215

TAT GAC CAG TGT TTC ATT TGT GAC CTT TCA TGATTTGTTT 7425
Tyr Asp Gln Cys Phe Ile Cys Asp Leu Ser
2220 2225

AAACAAATTT TCTTAAAATT TCTGAGGTTT GTTTATTTCT TTTATCAGTA 7475

AATAAAAAAA AAAAAAAA 7493

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 2227 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

Met Asn Met Ser Arg Gln Gly Ile Phe Gln Thr Val Gly Ser Gly Leu
1 5 10 15

Asp His Ile Leu Ser Leu Ala Asp Ile Glu Glu Glu Gln Met Ile Gln
20 25 30

Ser Val Asp Arg Thr Ala Val Thr Gly Ala Ser Tyr Phe Thr Ser Val
35 40 45

Asp Gln Ser Ser Val His Thr Ala Glu Val Gly Ser His Gln Val Glu
50 55 60

Pro Leu Arg Thr Ser Val Asp Lys Pro Gly Ser Lys Lys Thr Gln Gly
65 70 75 80

Glu Lys Phe Phe Leu Ile His Ser Ala Asp Trp Leu Thr Thr His Ala
85 90 95

Leu Phe His Glu Val Ala Lys Leu Asp Val Val Lys Leu Leu Tyr Asn
100 105 110

Glu Gln Phe Ala Val Gln Gly Leu Leu Arg Tyr His Thr Tyr Ala Arg
115 120 125

Phe Gly Ile Glu Ile Gln Val Gln Ile Asn Pro Thr Pro Phe Gln Gln
130 135 140

Gly Gly Leu Ile Cys Ala Met Val Pro Gly Asp Gln Ser Tyr Gly Ser
145 150 155 160

Ile Ala Ser Leu Thr Val Tyr Pro His Gly Leu Leu Asn Cys Asn Ile
165 170 175

Asn Asn Val Val Arg Ile Lys Val Pro Phe Ile Tyr Thr Arg Gly Ala
180 185 190

Tyr His Phe Lys Asp Pro Gln Tyr Pro Val Trp Glu Leu Thr Ile Arg
195 200 205

Val Trp Ser Glu Leu Asn Ile Gly Thr Gly Thr Ser Ala Tyr Thr Ser
210 215 220

Leu Asn Val Leu Ala Arg Phe Thr Asp Leu Glu Leu His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Leu Ser Thr Gln Met Met Arg Asn Glu Phe Arg Val Ser Thr Thr
245 250 255

Glu Asn Val Val Asn Leu Ser Asn Tyr Glu Asp Ala Arg Ala Lys Met
260 265 270

Ser Phe Ala Leu Asp Gln Glu Asp Trp Lys Ser Asp Pro Ser Gln Gly
275 280 285

Gly Gly Ile Lys Ile Thr His Phe Thr Thr Trp Thr Ser Ile Pro Thr
290 295 300

Leu Ala Ala Gln Phe Pro Phe Asn Ala Ser Asp Ser Val Gly Gln Gln
305 310 315 320

Ile Lys Val Ile Pro Val Asp Pro Tyr Phe Phe Gln Met Thr Asn Thr
325 330 335

Asn Pro Asp Gln Lys Cys Ile Thr Ala Leu Ala Ser Ile Cys Gln Met
340 345 350

Phe Cys Phe Trp Arg Gly Asp Leu Val Phe Asp Phe Gln Val Phe Pro
355 360 365

Thr Lys Tyr His Ser Gly Arg Leu Leu Phe Cys Phe Val Pro Gly Asn
370 375 380

Glu Leu Ile Asp Val Ser Gly Ile Thr Leu Lys Gln Ala Thr Thr Ala
385 390 395 400

Pro Cys Ala Val Met Asp Ile Thr Gly Val Gln Ser Thr Leu Arg Phe
405 410 415



Arg Val Pro Trp Ile Ser Asp Thr Pro Tyr Arg Val Asn Arg Tyr Thr
420 425 430

Lys Ser Ala His Gln Lys Gly Glu Tyr Thr Ala Ile Gly Lys Leu Ile
435 440 445

Val Tyr Cys Tyr Asn Arg Leu Thr Ser Pro Ser Asn Val Ala Ser His
450 455 460

Val Arg Val Asn Val Tyr Leu Ser Ala Ile Asn Leu Glu Cys Phe Ala
465 470 475 480

Pro Leu Tyr His Ala Met Asp Val Thr Thr Gln Val Gly Asp Asp Ser
485 490 495

Gly Gly Phe Ser Thr Thr Val Ser Thr Glu Gln Asn Val Pro Asp Pro
500 505 510

Gln Val Gly Ile Thr Thr Met Lys Asp Leu Lys Gly Lys Ala Asn Arg
515 520 525

Gly Lys Met Asp Val Ser Gly Val Gln Ala Pro Val Gly Ala Ile Thr
530 535 540

Thr Ile Glu Asp Pro Val Leu Ala Lys Lys Val Pro Glu Thr Phe Pro
545 550 555 560

Glu Leu Lys Pro Gly Glu Ser Arg His Thr Ser Asp His Met Ser Ile
565 570 575

Tyr Lys Phe Met Gly Arg Ser His Phe Leu Cys Thr Phe Thr Phe Asn
580 585 590

Ser Asn Asn Lys Glu Tyr Thr Phe Pro Ile Thr Leu Ser Ser Thr Ser
595 600 605

Asn Pro Pro His Gly Leu Pro Ser Thr Leu Arg Trp Phe Phe Asn Leu
610 615 620

Phe Gln Leu Tyr Arg Gly Pro Leu Asp Leu Thr Ile Ile Ile Thr Gly
625 630 635 640

Ala Thr Asp Val Asp Gly Met Ala Trp Phe Thr Pro Val Gly Leu Ala
645 650 655

Val Asp Thr Pro Trp Val Glu Lys Glu Ser Ala Leu Ser Ile Asp Tyr
660 665 670

Lys Thr Ala Leu Gly Ala Val Arg Phe Asn Thr Arg Arg Thr Gly Asn
675 680 685

Ile	Gln	Ile	Arg	Leu	Pro	Trp	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Gly
690						695					700				
Ala	Leu	Asp	Gly	Leu	Gly	Asp	Lys	Thr	Asp	Ser	Thr	Phe	Gly	Leu	Val
705					710					715					720
Ser	Ile	Gln	Ile	Ala	Asn	Tyr	Asn	His	Ser	Asp	Glu	Tyr	Leu	Ser	Phe
				725					730					735	
Ser	Cys	Tyr	Leu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Ser	Glu	Phe	Tyr	Phe	Pro	Arg
			740					745					750		
Ala	Pro	Leu	Asn	Ser	Asn	Ala	Met	Leu	Ser	Thr	Glu	Ser	Met	Met	Ser
		755					760					765			
Arg	Ile	Ala	Ala	Gly	Asp	Leu	Glu	Ser	Ser	Val	Asp	Asp	Pro	Arg	Ser
	770					775					780				
Glu	Glu	Asp	Lys	Arg	Phe	Glu	Ser	His	Ile	Glu	Cys	Arg	Lys	Pro	Tyr
785					790					795					800
Lys	Glu	Leu	Arg	Leu	Glu	Val	Gly	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Tyr	Ala	Gln
				805					810					815	
Glu	Glu	Leu	Ser	Asn	Glu	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Arg	Lys	Met	Lys	Gly
			820					825					830		
Leu	Phe	Ser	Gln	Ala	Lys	Ile	Ser	Leu	Phe	Tyr	Thr	Glu	Glu	His	Glu
		835					840					845			
Ile	Met	Lys	Phe	Ser	Trp	Arg	Gly	Val	Thr	Ala	Asp	Thr	Arg	Ala	Leu
	850					855					860				
Arg	Arg	Phe	Gly	Phe	Ser	Leu	Ala	Ala	Gly	Arg	Ser	Val	Trp	Thr	Leu
865					870					875					880
Glu	Met	Asp	Ala	Gly	Val	Leu	Thr	Gly	Arg	Leu	Ile	Arg	Leu	Asn	Asp
				885					890					895	
Glu	Lys	Trp	Thr	Glu	Met	Lys	Asp	Asp	Lys	Ile	Val	Ser	Leu	Ile	Glu
			900					905					910		
Lys	Phe	Thr	Ser	Asn	Lys	Tyr	Trp	Ser	Lys	Val	Asn	Phe	Pro	His	Gly
		915					920					925			
Met	Leu	Asp	Leu	Glu	Glu	Ile	Ala	Ala	Asn	Ser	Lys	Asp	Phe	Pro	Asn
	930					935					940				
Met	Ser	Glu	Thr	Asp	Leu	Cys	Phe	Leu	Leu	His	Trp	Leu	Asn	Pro	Lys
945					950					955					960

Lys Ile Asn Leu Ala Asp Arg Met Leu Gly Leu Ser Gly Val Gln Glu
965 970 975

Ile Lys Glu Gln Gly Val Gly Leu Ile Ala Glu Cys Arg Thr Phe Leu
980 985 990

Asp Ser Ile Ala Gly Thr Leu Lys Ser Met Met Phe Gly Phe His His
995 1000 1005

Ser Val Thr Val Glu Ile Ile Asn Thr Val Leu Cys Phe Val Lys Ser
1010 1015 1020

Gly Ile Leu Leu Tyr Val Ile Gln Gln Leu Asn Gln Asp Glu His Ser
1025 1030 1035 1040

His Ile Ile Gly Leu Leu Arg Val Met Asn Tyr Ala Asp Ile Gly Cys
1045 1050 1055

Ser Val Ile Ser Cys Gly Lys Val Phe Ser Lys Met Leu Glu Thr Val
1060 1065 1070

Phe Asn Trp Gln Met Asp Ser Arg Met Met Glu Leu Arg Thr Gln Ser
1075 1080 1085

Phe Ser Asn Trp Leu Arg Asp Ile Cys Ser Gly Ile Thr Ile Phe Lys
1090 1095 1100

Asn Phe Lys Asp Ala Ile Tyr Trp Leu Tyr Thr Lys Leu Lys Asp Phe
1105 1110 1115 1120

Tyr Glu Val Asn Tyr Gly Lys Lys Lys Asp Ile Leu Asn Ile Leu Lys
1125 1130 1135

Asp Asn Gln Gln Lys Ile Glu Lys Ala Ile Glu Glu Ala Asp Glu Phe
1140 1145 1150

Cys Ile Leu Gln Ile Gln Asp Val Glu Lys Phe Glu Gln Tyr Gln Lys
1155 1160 1165

Gly Val Asp Leu Ile Gln Lys Leu Arg Thr Val His Ser Met Ala Gln
1170 1175 1180

Val Asp Pro Asn Leu Met Val His Leu Ser Pro Leu Arg Asp Cys Ile
1185 1190 1195 1200

Ala Arg Val His Gln Lys Leu Lys Asn Leu Gly Ser Ile Asn Gln Ala
1205 1210 1215

Met Val Thr Arg Cys Glu Pro Val Val Cys Tyr Leu Tyr Gly Lys Arg
1220 1225 1230

Gly Gly Gly Lys Ser Leu Thr Ser Ile Ala Leu Ala Thr Lys Ile Cys
1235 1240 1245

Lys His Tyr Gly Val Glu Pro Glu Lys Asn Ile Tyr Thr Lys Pro Val
1250 1255 1260

Ala Ser Asp Tyr Trp Asp Gly Tyr Ser Gly Gln Leu Val Cys Ile Ile
1265 1270 1275 1280

Asp Asp Ile Gly Gln Asn Thr Thr Asp Glu Asp Trp Ser Asp Phe Cys
1285 1290 1295

Gln Leu Val Ser Gly Cys Pro Met Arg Leu Asn Met Ala Ser Leu Glu
1300 1305 1310

Glu Lys Gly Arg His Phe Ser Ser Pro Phe Ile Ile Ala Thr Ser Asn
1315 1320 1325

Trp Ser Asn Pro Ser Pro Lys Thr Val Tyr Val Lys Glu Ala Ile Asp
1330 1335 1340

Arg Arg Leu His Phe Lys Val Glu Val Lys Pro Ala Ser Phe Phe Lys
1345 1350 1355 1360

Asn Pro His Asn Asp Met Leu Asn Val Asn Leu Ala Lys Thr Asn Asp
1365 1370 1375

Ala Ile Lys Asp Met Ser Cys Val Asp Leu Ile Met Asp Gly His Asn
1380 1385 1390

Val Ser Leu Met Asp Leu Leu Ser Ser Leu Val Met Thr Val Glu Ile
1395 1400 1405

Arg Lys Gln Asn Met Thr Glu Phe Met Glu Leu Trp Ser Gln Gly Ile
1410 1415 1420

Ser Asp Asp Asp Asn Asp Ser Ala Val Ala Glu Phe Phe Gln Ser Phe
1425 1430 1435 1440

Pro Ser Gly Glu Pro Ser Asn Ser Lys Leu Ser Gly Phe Phe Gln Ser
1445 1450 1455

Val Thr Asn His Lys Trp Val Ala Val Gly Ala Ala Val Gly Ile Leu
1460 1465 1470

Gly Val Leu Val Gly Gly Trp Phe Val Tyr Lys His Phe Ser Arg Lys
1475 1480 1485

Glu Glu Glu Pro Ile Pro Ala Glu Gly Val Tyr His Gly Val Thr Lys
1490 1495 1500

Pro Lys Gln Val Ile Lys Leu Asp Ala Asp Pro Val Glu Ser Gln Ser
1505 1510 1515 1520

Thr Leu Glu Ile Ala Gly Leu Val Arg Lys Asn Leu Val Gln Phe Gly
1525 1530 1535

Val Gly Glu Lys Asn Gly Cys Val Arg Trp Val Met Asn Ala Leu Gly
1540 1545 1550

Val Lys Asp Asp Trp Leu Leu Val Pro Ser His Ala Tyr Lys Phe Glu
1555 1560 1565

Lys Asp Tyr Glu Met Met Glu Phe Tyr Phe Asn Arg Gly Gly Thr Tyr
1570 1575 1580

Tyr Ser Ile Ser Ala Gly Asn Val Val Ile Gln Ser Leu Asp Val Gly
1585 1590 1595 1600

Phe Gln Asp Val Val Leu Met Lys Val Pro Thr Ile Pro Lys Phe Arg
1605 1610 1615

Asp Ile Thr Gln His Phe Ile Lys Lys Gly Asp Val Pro Arg Ala Leu
1620 1625 1630

Asn Arg Leu Ala Thr Leu Val Thr Thr Val Asn Gly Thr Pro Met Leu
1635 1640 1645

Ile Ser Glu Gly Pro Leu Lys Met Glu Glu Lys Ala Thr Tyr Val His
1650 1655 1660

Lys Lys Asn Asp Gly Thr Thr Val Asp Leu Thr Val Asp Gln Ala Trp
1665 1670 1675 1680

Arg Gly Lys Gly Glu Gly Leu Pro Gly Met Cys Gly Gly Ala Leu Val
1685 1690 1695

Ser Ser Asn Gln Ser Ile Gln Asn Ala Ile Leu Gly Ile His Val Ala
1700 1705 1710

Gly Gly Asn Ser Ile Leu Val Ala Lys Leu Val Thr Gln Glu Met Phe
1715 1720 1725

Gln Asn Ile Asp Lys Lys Ile Glu Ser Gln Arg Ile Met Lys Val Glu
1730 1735 1740

Phe Thr Gln Cys Ser Met Asn Val Val Ser Lys Thr Leu Phe Arg Lys
1745 1750 1755 1760

Ser Pro Ile Tyr His His Ile Asp Lys Thr Met Ile Asn Phe Pro Ala
1765 1770 1775

Ala Met Pro Phe Ser Lys Ala Glu Ile Asp Pro Met Ala Val Met Leu
1780 1785 1790

Ser Lys Tyr Ser Leu Pro Ile Val Glu Glu Pro Glu Asp Tyr Lys Glu
1795 1800 1805

Ala Ser Ile Phe Tyr Gln Asn Lys Ile Val Gly Lys Thr Gln Leu Val
1810 1815 1820

Asp Asp Phe Leu Asp Leu Asp Met Ala Ile Thr Gly Ala Pro Gly Ile
1825 1830 1835 1840

Asp Ala Ile Asn Met Asp Ser Ser Pro Gly Phe Pro Tyr Val Gln Glu
1845 1850 1855

Lys Leu Thr Lys Arg Asp Leu Ile Trp Leu Asp Glu Asn Gly Leu Leu
1860 1865 1870

Leu Gly Val His Pro Arg Leu Ala Gln Arg Ile Leu Phe Asn Thr Val
1875 1880 1885

Met Met Glu Asn Cys Ser Asp Leu Asp Val Val Phe Thr Thr Cys Pro
1890 1895 1900

Lys Asp Glu Leu Arg Pro Leu Glu Lys Val Leu Glu Ser Lys Thr Arg
1905 1910 1915 1920

Ala Ile Asp Ala Cys Pro Leu Asp Tyr Ser Ile Leu Cys Arg Met Tyr
1925 1930 1935

Trp Gly Pro Ala Ile Ser Tyr Phe His Leu Asn Pro Gly Phe His Thr
1940 1945 1950

Gly Val Ala Ile Gly Ile Asp Pro Asp Arg Gln Trp Asp Glu Leu Phe
1955 1960 1965

Lys Thr Met Ile Arg Phe Gly Asp Val Gly Leu Asp Leu Asp Phe Ser
1970 1975 1980

Ala Phe Asp Ala Ser Leu Ser Pro Phe Met Ile Arg Glu Ala Gly Arg
1985 1990 1995 2000

Ile Met Ser Glu Leu Ser Gly Thr Pro Ser His Phe Gly Thr Ala Leu
2005 2010 2015

Ile Asn Thr Ile Ile Tyr Ser Lys His Leu Leu Tyr Asn Cys Cys Tyr
2020 2025 2030

His Val Cys Gly Ser Met Pro Ser Gly Ser Pro Cys Thr Ala Leu Leu
2035 2040 2045

Asn Ser Ile Ile Asn Asn Val Asn Leu Tyr Tyr Val Phe Ser Lys Ile
2050 2055 2060

Phe Gly Lys Ser Pro Val Phe Phe Cys Gln Ala Leu Lys Ile Leu Cys
2065 2070 2075 2080

Tyr Gly Asp Asp Val Leu Ile Val Phe Ser Arg Asp Val Gln Ile Asp
2085 2090 2095

Asn Leu Asp Leu Ile Gly Gln Lys Ile Val Asp Glu Phe Lys Lys Leu
2100 2105 2110

Gly Met Thr Ala Thr Ser Ala Asp Lys Asn Val Pro Gln Leu Lys Pro
2115 2120 2125

Val Ser Glu Leu Thr Phe Leu Lys Arg Ser Phe Asn Leu Val Glu Asp
2130 2135 2140

Arg Ile Arg Pro Ala Ile Ser Glu Lys Thr Ile Trp Ser Leu Ile Ala
2145 2150 2155 2160

Trp Gln Arg Ser Asn Ala Glu Phe Glu Gln Asn Leu Glu Asn Ala Gln
2165 2170 2175

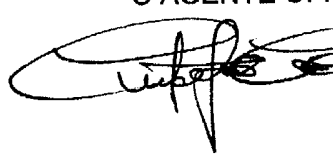
Trp Phe Ala Phe Met His Gly Tyr Glu Phe Tyr Gln Lys Phe Tyr Tyr
2180 2185 2190

Lisboa,

21 JUL 1971

Por SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. e GOVERNMENT
OF THE UNITED STATES OF AMERICA, representado pelo
THE SECR. OF THE DEPT. OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES AND HIS SUCCESSORS

- O AGENTE OFICIAL -


ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74-4.º
1200-195 LISBOA



REIVINDICAÇÕES

1. Mutante da estirpe HM-175 do vírus da hepatite A, possuindo o ADN de SEQ ID NO:1, em que pelo menos as posições de nucleótido 591 e 687 estão alteradas para guanina, a 646 está alterada para adenina e a 669 está alterada para timina.

2. Mutante de acordo com a reivindicação 1 em que adicionalmente os nucleótidos nas posições 4418 e 4643 estão alteradas para timina.

3. Mutante de acordo com a reivindicação 1 e 2, em que pelo menos as posições de nucleótido 3934 e 5145 estão alteradas para guanina, a 5745 está alterada para timina e a 6908 está alterada para citosina.

4. Mutante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 possuindo as características de identificação da estirpe HAV 4380, depositada no CNCM com o número de acesso I-936.

5. Estirpe HAV 4380 de acordo com a reivindicação 4 adaptada para crescer na linha celular de fibroblastos humanos, MRC-5, por incubação de 32°C a 35°C, e capaz de crescer a 37°C em células primárias de rim de macaco verde africano (células AGMK).

6. Vacina de vírus da hepatite A compreendendo um mutante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5.

7. Método de preparação de um mutante da estirpe HM-175 do vírus da hepatite A possuindo o ADN de SEQ ID NO:1, compreendendo o passo de modificação da referida estirpe do vírus da hepatite A, em que pelo menos as posições de nucleótido 591 e 687 no ADN de SEQ ID NO:1 estão alteradas para guanina, a 646 está alterada para adenina e a 669 está alterada para timina.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que adicionalmente os nucleótidos nas posições 4418 e 4643 estão alteradas para timina.

9. Método de acordo com a reivindicação 7 ou 8, em que pelo menos as posições de nucleótido 3934 e 5145 estão alteradas para guanina, a 5745 está alterada para timina e a 6908 está alterada para citosina.

10. Utilização de um mutante do vírus HAV de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 para a preparação de uma vacina para a imunização de um humano ou primata contra a hepatite A.

11. Molécula de ácido nucleico que codifica o mutante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5.

Lisboa, 20 JUL 2001

Por SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. e GOVERNMENT
OF THE UNITED STATES OF AMERICA, representado pelo
THE SECR. OF THE DEPT. OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES AND HIS SUCCESSORS

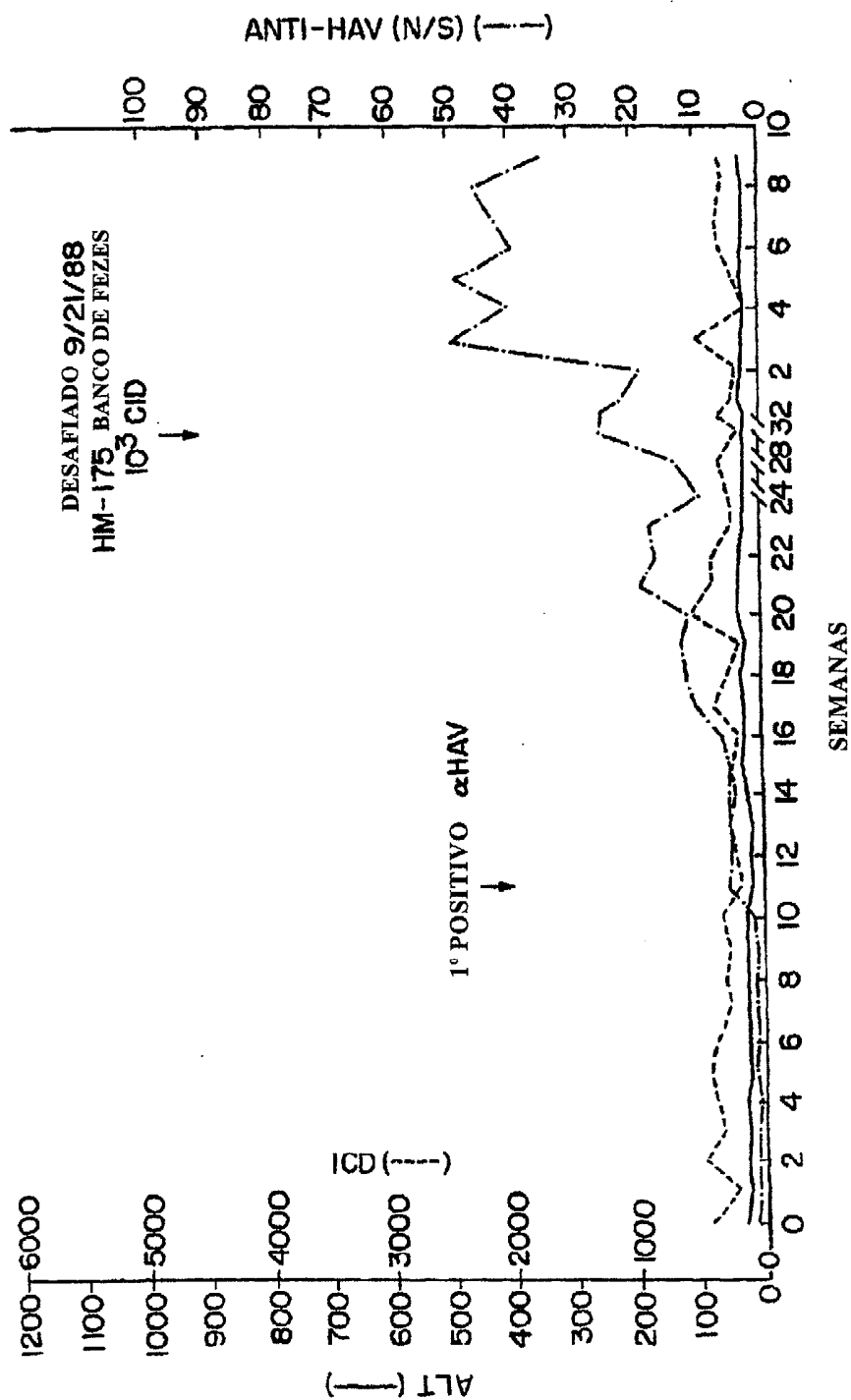
- O AGENTE OFICIAL -

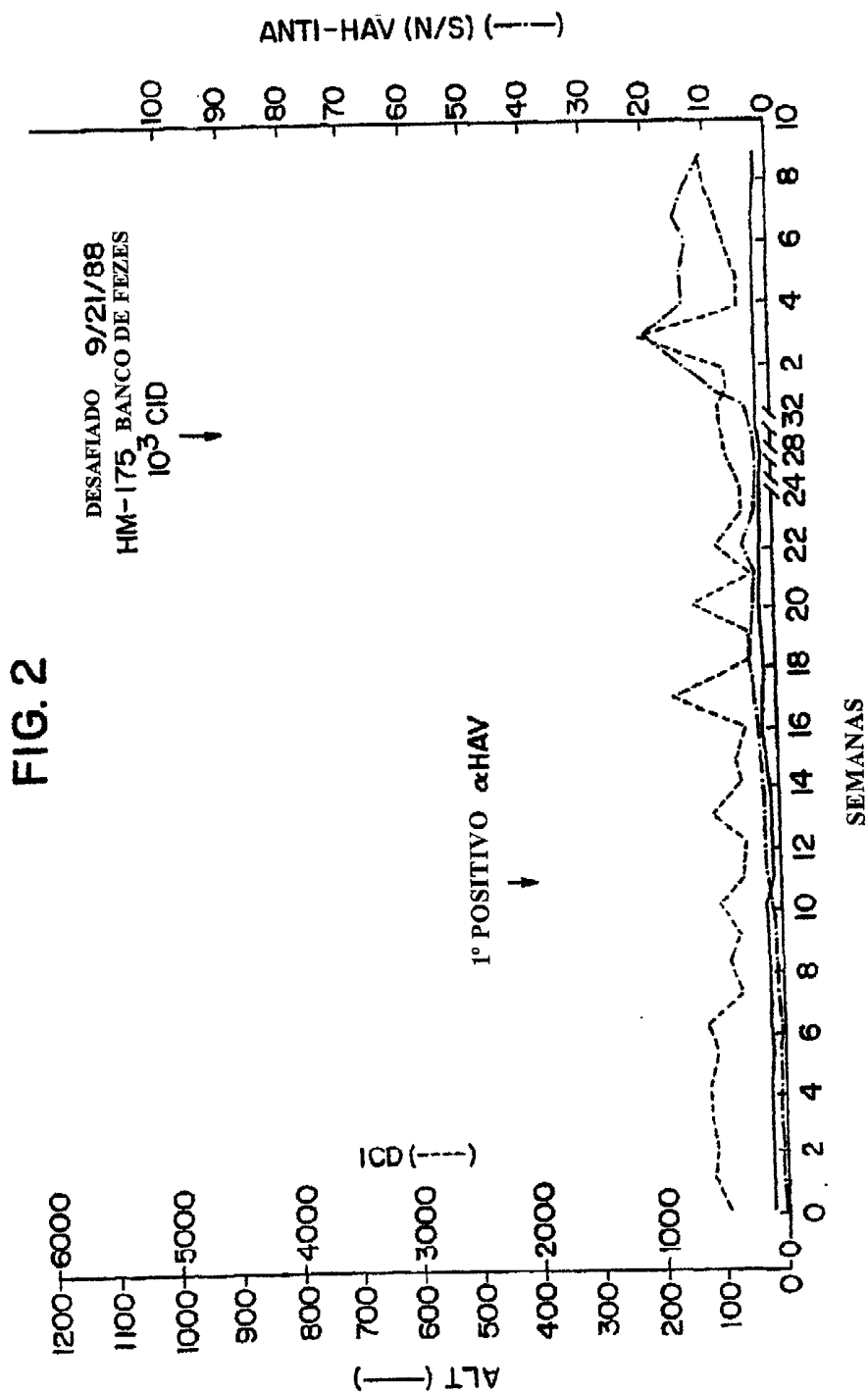


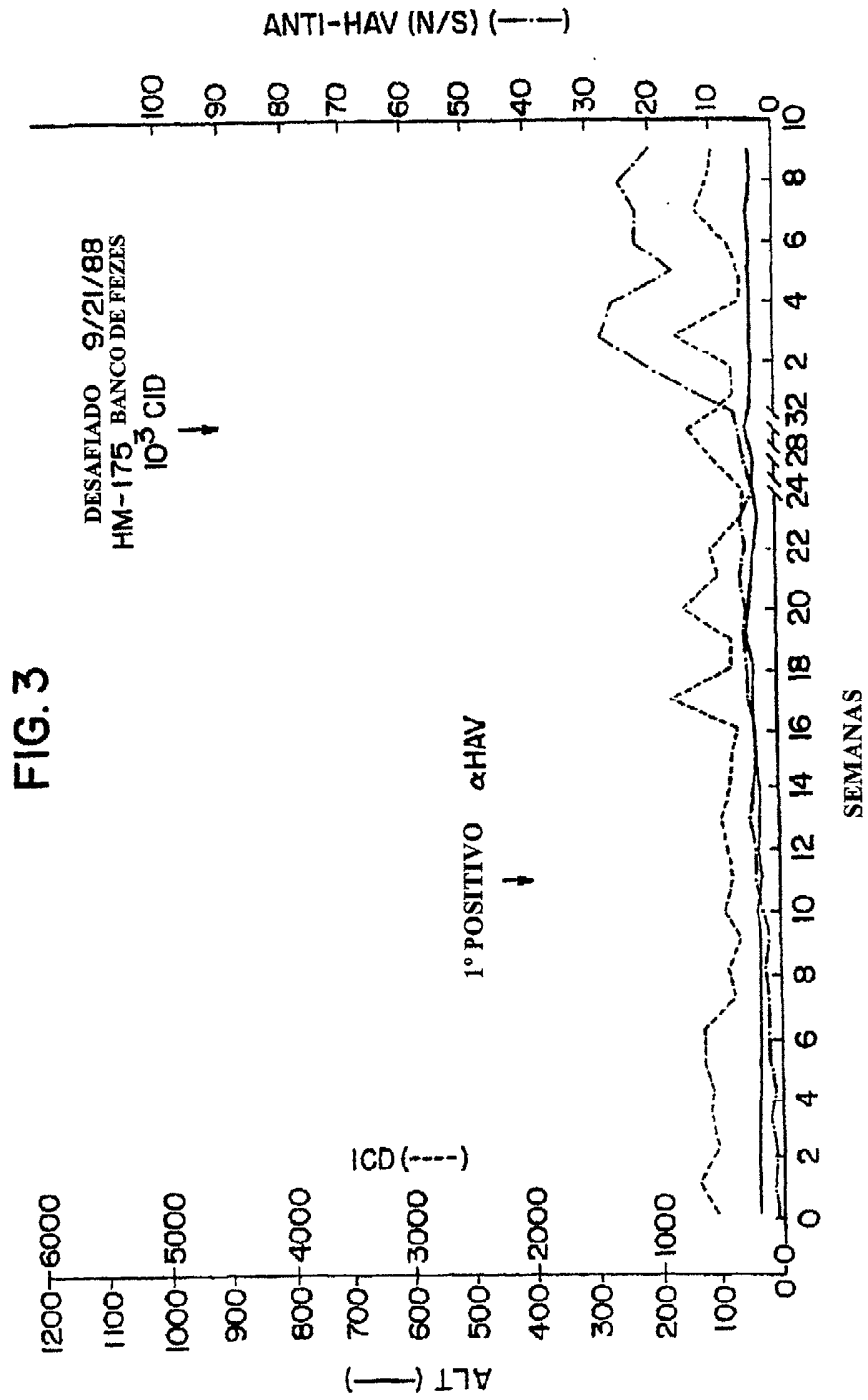
Eng.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74-4.º
1200-195 LISBOA

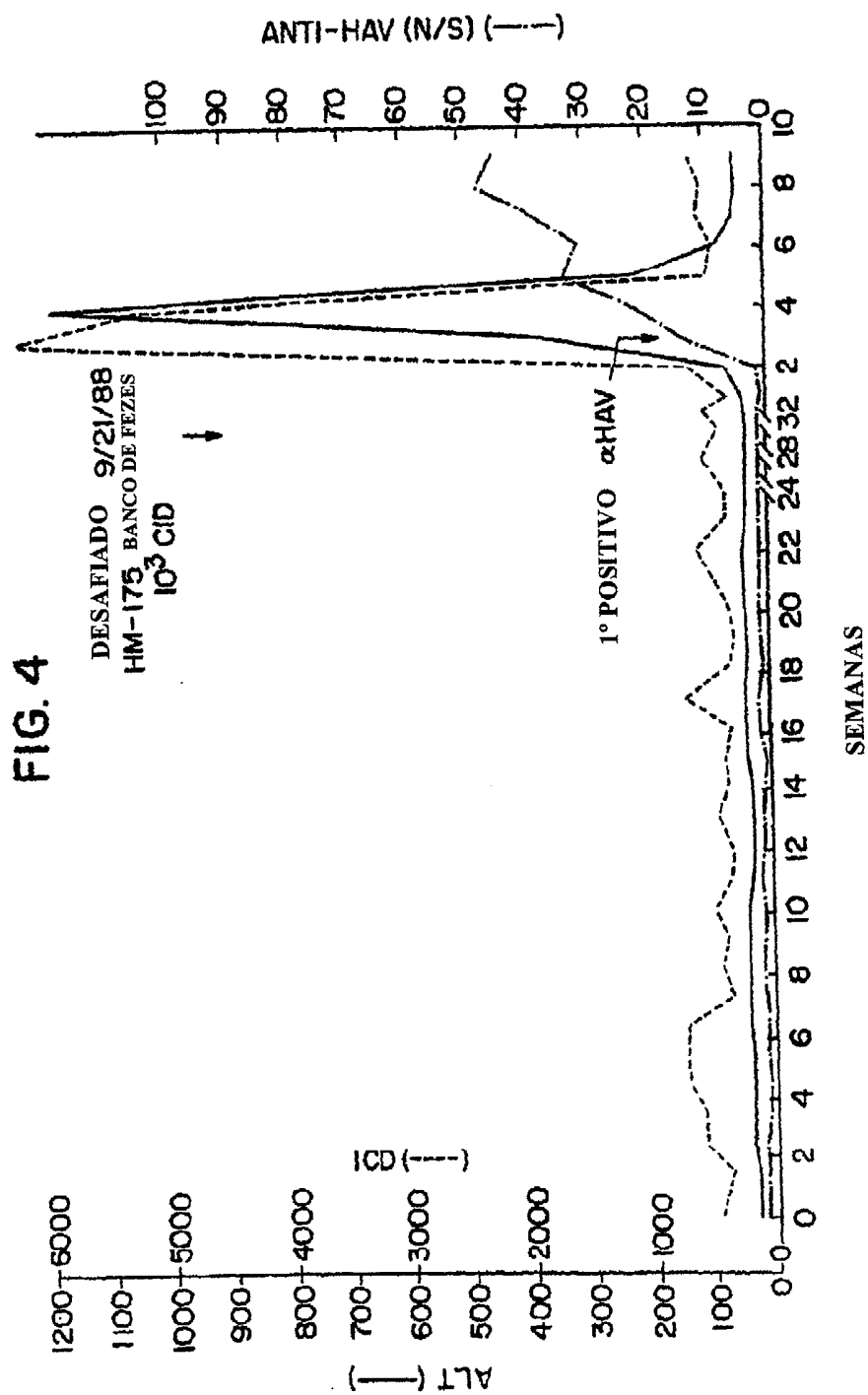
[Handwritten signature]

FIG. 1



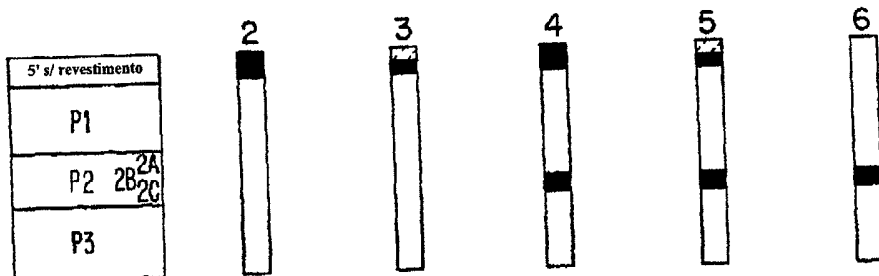
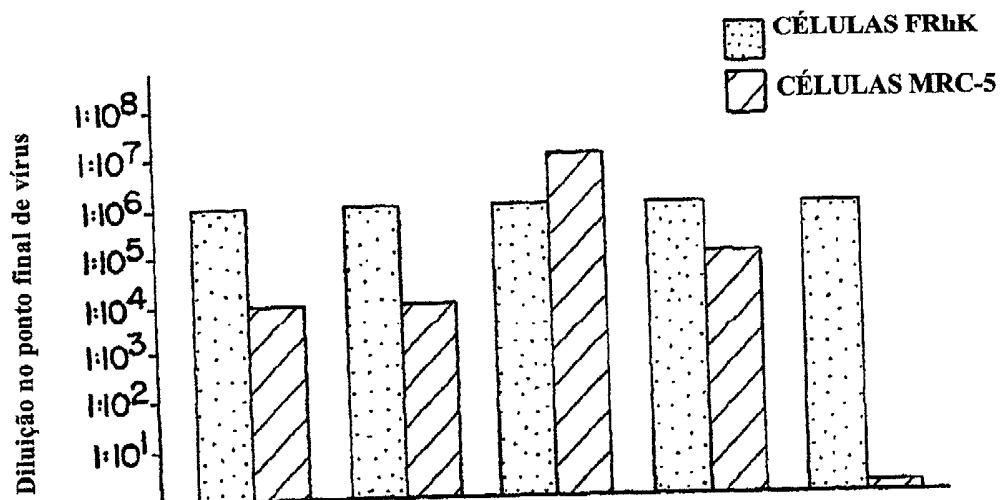






[Handwritten signature]

FIG. 5



- Representa a sequência nucleotídica de P41 MRC-5
- ▨ Representa a sequência nucleotídica de P35 AGMK
- Representa a sequência nucleotídica de HM-175 do tipo selvagem