

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 95.213

REQUERENTE: AMERICAN CYANAMID COMPANY, norte-americana,
industrial, com sede em Wayne, New Jersey
Estados Unidos da América do Norte

EPÍGRAFE: "MÉTODOS DE SELECÇÃO PARA INIBIDORES DE PRO-
TEASES"

INVENTORES: Ellen Z. Baum

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

Estados Unidos da América do Norte, 11 de Setembro 1989
No.07/405,609

95.213



MEMORIA DESCRITIVA

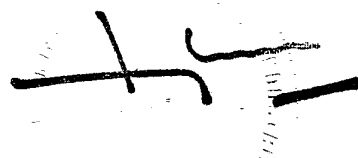
Resumo

O invento fornece métodos para a selecção de inibidores de proteases. O primeiro método envolve a construção de um sistema de plasmídeo de tal forma que a expressão de uma protease é tóxica relativamente a uma estirpe bacteriana. Deste modo podem ser seleccionados compostos de interesse que inibam a protease tóxica e, assim, evitar a morte da estirpe bacteriana. A inibição é detectada por transformação sucessiva da estirpe bacteriana pelo plasmídeo que codi-

=====

AMERICAN CYANAMID COMPANY

"METODOS DE SELECÇÃO PARA INIBIDORES DE PROTEASES"



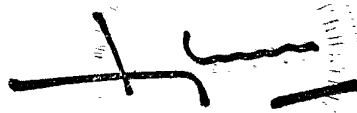
fica para a protease. O segundo método envolve a construção de uma proteína de fusão que contém um sitio de clivagem da protease inserido numa proteína cuja actividade pode ser testada. Os compostos são seleccionados para a inibição de proteases, a qual é detectada por ensaios de modificação de cor, luz ou actividade da proteína. A protease de HIV e a protease de polio 3C são exemplos de proteases que podem ser usadas com estes métodos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

As proteases são uma classe de proteínas da qual alguns membros estão implicados em doenças humanas. Por exemplo, a renina humana é uma protease de aspartil que está envolvida na hipertensão por intermédio do seu papel na formação do peptido vasoactivo antiotensina, no plasma (Referencia Bibliográfica 1). As proteases tripsina e elastase estão envolvidas no ataque de enfizema (2,3). De particular interesse reveste-se a protease associada ao virus da imunodeficiencia humana ("HIV"). A protease de polio também possui interesse.

Os produtos de tradução primários do HIV incluem precursores poliproteicos codificados pelos genes gag e pol (4). O gene gag codifica para as proteínas do capsídeo; o gene pol codifica para os enzimas virais incluindo uma protease viral de 10 Kd, uma transcriptase inversa de 66 Kd e uma endonuclease de 34 Kd (5). A produção destas proteínas é dependente da clivagem destas poliproteínas pela protease viral a qual é gerada por autodigestão da poliproteína pol.

Como enzima especifica do virus, a protease é um alvo atractivo para drogas, com o objectivo de inibir a replicação viral e, tornou-se num foco de investigação intensiva. A sequencia pol (Nucleotidos 1833-2129) produz uma protease madura de 99 aminoácidos (6) com prolina na extremidade amino e fenilalanina na extremidade carboxi(7; Graves). A protease de 99 aminoácidos possui homologia com a familia de proteases aspártica (8) e é inibida pela pepstatina A(9). A protease recombinante mutada no residuo catalitico 25 Asp é enzimáticamente inactiva em sistemas de expressão bacterianos e in vitro (5,6) e o virus mutado neste sitio não é infeccioso (6). A protease foi recentemente purificada



a partir de E. coli e cristalizada (10).

Presentemente, existe uma necessidade urgente de desenvolver agentes terapeuticos contra o sindroma de imunodeficiência adquirida ("SIDA") o qual crê-se ser causado pelo HIV. Um agente que seja selectivo em relação à protease de HIV deve servir como inibidor da replicação de HIV e, deste modo, ser eficaz no tratamento da SIDA. Desta forma, existe necessidade de métodos para seleccionar tais inibidores da protease de HIV.

Os métodos existentes para testar a protease de HIV utilizam substratos poliproteicos ou de oligopeptidos e requerem o uso de electroforese através de gel ou cromatografia liquida de alta eficácia para verificar a presença de produtos de clivagem (11-16). Outros métodos recentemente desenvolvidos para múltiplas amostras incluem transferencia de energia de ressonância (17) e libertação de produtos radioactivos (18). Estes métodos não são facilmente adaptáveis ao ensaio da actividade proteolitica num grande número de amostras.

Deste modo, é um objectivo desta invenção desenvolver métodos de selecção para a identificação de inibidores de proteases.

Um objectivo particular desta invenção é o desenvolvimento de métodos de selecção para a identificação de inibidores da protease de HIV.

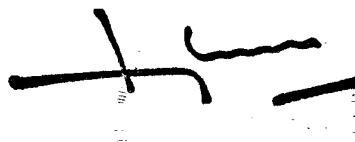
E ainda um objectivo desta invenção, o desenvolvimento de métodos de selecção para a identificação de inibidores da protease de polio.

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece métodos para o teste de compostos que inibem enzimas proteolíticas. Numa parte da invenção, o método é, em primeiro lugar, baseado na construção de um plasmídeo possuidor de uma sequência de DNA que codifica para uma protease, sob o controle de um promotor de T7. De seguida, é seleccionada uma estirpe de expressão bacteriana a qual não é transformada pelo plasmídeo devido à toxicidade da protease para a estirpe bacteriana. Um composto a testar para actividade inibidora é então adicionado juntamente com o plasmídeo à estirpe bacteriana. Se a estirpe bacteriana não é morta e produz transformantes, o composto é identificado como inibidor da protease.

Em particular, a primeira parte da presente invenção fornece as construções de plasmídeos designadas por pPDB16 e pMae2 as quais contêm uma sequência de DNA que codifica para a protease de HIV. Estes plasmídeos não produzem transformantes numa estirpe de E. coli designada BL21 (DE3). Assim, a expressão da protease da HIV a partir do plasmídeo parece ser tóxica para esta estirpe de E. coli. Esta descoberta sugere um método para a identificação de agentes que inibem a protease de HIV. Um plasmídeo similar, designado por pPolio protease 3C, é descrito para a protease de polio e pode ser usado para testar inibidores da protease de polio.

Num outro aspecto da primeira parte da invenção é descrito um método para a selecção de compostos que inibem a protease de HIV. É construído um plasmídeo possuindo uma sequência de DNA que codifica para a protease de HIV, sob o controle de um promotor de T7. De seguida, é seleccionada uma estirpe bacteriana a qual é transformada pelo plasmídeo e morta pela indução da síntese de protease por um agente indutor. E então adicionado um composto, a seleccionar para a



sua activiadde inibidora, juntamente com o agente indutor à estirpe bacteriana transformada. Se as células induzidas não forem mortas, o composto é identificado como um inibidor da protease de HIV.

Na segunda parte da invenção, o método envolve a selecção de uma proteína capaz de ser testada por modificação de cor, luz ou actividade quando combinada com uma enzima proteolitica na presença ou ausência de um composto inibidor potencial.

De seguida, uma sequencia de DNA heteróloga que codifica para um peptido que inclui um sitio de clivagem de enzima proteolitica, é inserida no gene que codifica para a proteína seleccionada. O gene de fusão é inserido num sistema de expressão apropriado e é combinado com a enzima proteolitica a qual reconhece e cliva o peptido codificado pela sequencia de DNA heterologa inserida na proteína de fusão, de tal modo que a enzima proteolitica cliva no sitio de clivagem de enzima proteolitica o que, por seu turno, inactiva a proteína de fusão expressa.

Esta perda de actividade é monitorizada por modificação de cor, luz ou directamente pela própria perda de actividade. Um composto a seleccionar é incluído no sistema de ensaio e é identificado como inibidor da enzima proteolitica se a proteína não fôr clivada e se mantiver activa quando monitorizada por qualquer dos métodos descritos previamente.

Em particular, a segunda parte desta invenção fornece uma construção de plasmideo designada por pl+IQSau, a qual inclui o gene de β -galactosidase, no qual é inserida uma sequencia de DNA que codifica para um decapeptido de sitio de clivagem de protease de HIV. Quando expressa, esta proteína de fusão retém a activiadde de β -galactosidase. A

protease de HIV cliva e inactiva a proteína de fusão.

Compostos potencialmente inibidores da protease de HIV são testados por monitorização da actividade de β -galactosidase de tal maneira que a manutenção da actividade de β -galactosidase indica que o composto previne a clivagem e inibe a protease de HIV.

Uma construção similar designada por plasmideo pZM3CSau, inclui o gene que codifica para a β -galactosidase no qual é inserida uma sequencia de DNA que codifica para o sitio de clivagem da protease de polio 3C. Esta construção é usada para testar compostos que inibem a protease de polio 3C utilizando processos similares aos descritos previamente para a protease de HIV.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura descreve as construções de protease de HIV pPDB16 e pMae2. A construção pPDB16 codifica para o precursor de protease de 18Kd sob o controle do promotor de T7. O fragmento BglIII-DraI de λ BH5(4), correspondente aos nucleotidos 1418-1899 do gene de HIV é subclonado nos sitios NdeI-BamHI do vector de expressão previamente descrito (19), usando oligonucleotidos sintéticos. Os oligonucleotidos situados acima começam com um sitio de restrição de NdeI, fornecendo um codão de inicio de tradução dentro da grelha de leitura e, regeneram os nucleotidos 1406-1417. Os oligonucleotidos situados abaixo regeneram os nucleotidos 1900-1906 seguidos de dois codões de paragem dentro da grelha de leitura e um sitio de restrição BamHI. Para uma mais clareza, a base A do codão de iniciação é definida como nucleotido (nt)1. Os aminoácidos +1 a +99 representam a protease madura de 10Kd libertada por autodigestão na ligação Fen-Pro indicada (7). O pMae2

codifica para a protease madura de 10Kd. A sua construção é similar à pPDB16, exceptuando que os oligonucleotidos acima regeneram a partir do nucleotido 1610 o sitio de restrição MaeIII.

A figura 2 descreve a expressão da protease de HIV em E. coli Painei A: síntese de protease em células BL21(DE3)pLysS que albergam o pPDB16. As proteínas são marcadas com ³⁵S-metionina como descrito (19), submetidas a electroforese e autoradiografia. Linha 1, sem isopropil-β-D-tiogalactopiranosido ("IPTG"). Linha 2, 1mM IPTG. A seta indica a protease madura de 10Kd. Painei B: síntese de protease em sobreviventes de BL21(DE3) que albergam pPDB16 mutagenizado. Os números acima de cada linha correspondem às designações dos clones nas Tabelas II e III. Os marcadores de peso molecular são mostrados à esquerda (68Kd- albumina de soro bovina; 43Kd- ovalbumina; 29Kd- anidrase carbônica; 18Kd- beta-lactoglobulina; 14Kd- lisosima).

A figura 3 descreve a morte de BL21 (DE3)pLysS após a indução da síntese de protease de HIV com IPTG. As células que albergam o plasmideo que codifica para o precursor de protease de tipo selvagem (pPDB16) ou mutante (pP48) crescem até atingirem 0,5 unidades de absorbância (600 nm) e é adicionado IPTG até às concentrações indicadas. Aos tempos indicados, é retirada uma aliquota de cada cultura e são plaqueadas diluições em placas de LB contendo canamicina e cloranfenicol. Após incubação durante a noite são determinadas as unidades formadoras de colônias ("CFU") por 100 µl de cultura.

A figura 4 apresenta a comparação de quantidades de protease de tipo selvagem e mutante produzida. As células BL21(DE3) pLysS que albergam os plasmideos indicados, são induzidos com 1mM IPTG e as proteínas são marcadas com ³⁵S-metionina como descrito (19). Extractos celulares to-

tais (linhas 1-5) e imunoprecipitados (linhas 6-10) com anti-soro produzido contra os aminoácidos 34-46 da protease madura, são submetidos a electroforese e autoradiografia. Linhas 1 e 6, pPDB16. Linhas 2 e 7, pP48. Linhas 3 e 8, pMae2. Linhas 4 e 9, pP48Mae6. Linhas 5 e 10, pPol codificante para a polimerase de polio(19). Linha M, marcadores de peso molecular (68Kd-albumina sérica bovina; 43Kd-ovalbumina; 29Kd-anidrase carbônica;; 18Kd-beta-lactoglobulina; 14Kd-lisozima; 6Kd-inibidor bovino da tripsina).

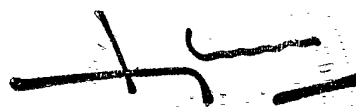
Na figura 5, o Painei A descreve os plasmídeos pI+IQ e pI5-IQ de protease de HIV os quais codificam para a protease de HIV de tipo selvagem ou mutante, respectivamente, sob o controle dum promotor tac. A estirpe de E. coli MC1061 albergando estes plasmídeos, é usada como fonte de protease de HIV para a clivagem in vitro da β -galactosidase. Para monitorizar a clivagem in vivo, são excisados os genes da cassette clivagem/ β -galactosidase, a partir de plasmídeo da série pZM com StuI e BamHI e, são ligados ao sitio BamHI de pI+IQ ou pI5-IQ usando oligonucleotídeos de ligação BamHI de modo a que a protease de HIV e a β -galactosidase sejam expressos simultaneamente na mesma célula de E. coli. O Painei B descreve a inserção do sitio de clivagem de protease de HIV na β -galactosidase. São inseridos oligonucleotídeos que codificam para o sitio de clivagem de protease de HIV, nos sitios de restrição do gene da β -galactosidase indicados. As posições de nucleótidos (nt) e aminoácidos (aa) na β -galactosidase, são indicadas.

Na figura 6, o Painei A apresenta a clivagem in vitro da poliproteína gag pela protease de HIV. A poliproteína gag é incubada com tampão (linha 1) ou protease de HIV de tipo selvagem (linha 2) ou mutante (linha 3), seguido de electroforese e autoradiografia. Os marcadores de peso molecular estão situados à esquerda (67Kd-albumina sérica

bovina; 42Kd-ovalbumina; 28Kd-anidrase carbônica; 18Kd-beta-lactoglobulina). O painel B apresenta a clivagem in vitro das proteínas da cassete de clivagem/ β -galactosidase pela protease de HIV. Extractos de células MC1061 albergando o plasmídeo de protease de HIV são incubados com extractos que possuem β -galactosidase, seguido de transferência "Western" com anti- β -galactosidase. Linha 1, MC1061(sem plasmídeo). Linha 2, extracto de protease de HIV de tipo selvagem. Linha 3, extracto de protease mutante de HIV. O extracto de MC1061/pZM1(linha 4) é incubado com protease de HIV de tipo selvagem(linha 5) ou mutante (linha 6). O extracto de MC1061/pZM-Sau de dois clones independentes (linhas 7 e 10) é incubado com protease de HIV de tipo selvagem (linhas 8 e 11) ou mutante (linhas 9 e 12). A seta superior, à direita, indica a β -galactosidase; a seta inferior, à direita, indica o produto de clivagem de pZM-Sau. Os marcadores de peso molecular estão mostrados à esquerda (103Kd-fosforilase b; 67Kd-albumina sérica bovina; 42Kd-ovalbumina; 28Kd-anidrase carbônica).

A figura 7 apresenta a inibição da clivagem de β -galactosidase pela Pepstatina A. A proteína de cassete de clivagem/ β -galactosidase, de células MC1061 albergando pZM-Sau, é incubada com protease de HIV na presença ou ausência de Pepstatina A, seguido de transferência "Western" com anti-B-galactosidase. Linha 1, sem protease. Linha 2, com adição de protease. E dissolvida Pepstatina A em dimetilsulfóxido e, adicionada à incubação a concentrações de 0,0.2, 1,5, 25 e 50 μ g/ml(linhas 3-8). A seta superior à direita, indica a β -galactosidase; a seta inferior à direita indica o produto de clivagem de pZM-Sau. Os marcadores de peso molecular, mostrados à esquerda, são idênticos aos da Figura 6, Painel B.

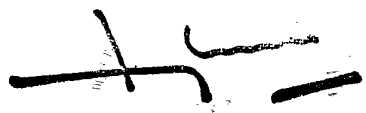
A figura 8 apresenta a clivagem in vivo das proteínas de cassete de clivagem/ β -galactosidase pela protease de HIV. Painel A: células MC1061 albergando pl+IQSau (linha 1), pl+IQ-ClaA(linha 2), pl+IQ-ClaB(linha 3), pl+IQ-Bss



(linha 4), pl+IQ-Eco (linha 5), pl+IQ (linha 6), ou sem plasmídeo (linha 7) crescem até meio da fase logarítmica e é adicionado IPTG a 1mM. Após 30 minutos, as células são sedimentadas e ressuspensas em tampão de amostra, seguido de electroforese e análise "Western" com anti- β -galactosidase. Painei B: células MC1061 sem plasmídeo (linha 1) ou albergando pl-IQSau (linha 2) ou pl5-IQSau (linha 3) são tratadas como no painei A. Em cada painei, a seta superior à direita, indica a β -galactosidase; a seta inferior à direita, indica o produto de clivagem de pl-IQSau. Em cada painei, os marcadores de peso molecular são idênticos aos da Figura 6, painei B.

A Figura 9 é um fotografia que mostra os resultados de um ensaio de clivagem in vivo. São colocadas amostras da estirpe de E. coli MC1061 albergando vários plasmídeos, em placas que contêm o indicador de cor X-gal. Os plasmídeos são pZM-1 (um controle positivo da actividade de β -galactosidase), pZM-2 (um controle negativo da actividade de β -galactosidase), pZM-Sau, pl+IQSau (pl+IQB-Sau marcado) e pl5-IQSau (pl5-IQB-Sau marcado). No ensaio de clivagem com a protease de HIV de tipo selvagem, as construções que clivam a β -galactosidase produzem uma cor branca, ao passo que as construções que não clivam a β -galactosidase produzem uma cor azul. O plasmídeo pZM-1 é construído como descrito abaixo. O plasmídeo pZM-2 codifica para β -galactosidase mutante, inactiva e, desta forma, produz colónias brancas. O plasmídeo pZM-2 é construído por digestão do plasmídeo pZM-1 em EcoRI e Bam HI para retirar a sequência de DNA que codifica para os 18 aminoácidos na extremidade carboxi de β -galactosidase. Como é de esperar, pZM-1 produz uma cor azul tal como o fazem os pZMSau e pl5-IQSau. O plasmídeo pZM-2, como controle negativo, produz uma cor branca; a β -galactosidase de pl-IQSau é clivada pela protease de HIV e produz uma cor branca.

A Figura 10 apresenta a clivagem da casete de clivagem de protease de polio pela protease de



polio in vitro. Extractos de β -galactosidase contendo quer o sitio de clivagem de protease de polio (em MC1061/pZM3CSau) quer o sitio de clivagem de protease de HIV (em MC1061/pZM-Sau), são incubados com protease de polio ou de HIV, seguido de análise "Western" com anti- β -galactosidase. Linha 1, MC1061 sem plasmideo. Linha 2, protease de polio 3C. Linha 3, protease de HIV. Linha 4, MC1061/pZM3CSau não incubada. Linha 5, MC1061/pZM3CSau incubada com protease de polio 3C. Linha 6, MC1061/pZM3CSau incubada com protease de HIV. Linha 7, MC1061/pZM-Sau não incubada. Linha 8, MC1061/pZM-Sau incubada com protease de polio 3C. Linha 9, MC1061/pZM-Sau incubada com protease de HIV. Linha 10, MC1061/pZM1 não incubada. Linha 11, MC1061/pZM1 incubada com protease de polio 3C. Linha 12, MC1061/pZM1 incubada com protease de HIV. A seta superior à direita, indica a β -galactosidase; a seta inferior à direita, indica o produto de clivagem das construções Sau. Os marcadores de peso molecular são mostrados à esquerda (103Kd-fosforilase b; 67Kd-albumina sérica bovina; 42Kd-ovalbumina).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção é dirigida a dois métodos de selecção de inibidores de proteases tais como a protease de HIV, renina, tripsina, elastase e protease de polio. Cada método de selecção será inicialmente descrito com respeito à protease de HIV e depois à protease de polio. Os métodos também podem ser adaptados para uso com outras proteases de acordo com os principios da invenção.

O primeiro método de selecção de inibidores de protease de HIV diz respeito à construção de um plasmideo que exprime a protease de HIV a qual é tóxica para uma estirpe de E. coli. Esta toxicidade, por outro lado, é útil para testar agentes que inibem a protease de HIV.

Para estudar a protease de HIV, o fragmento BglIII-DraI de λ BH5(4), correspondente aos nucleotídeos 1641-2122 do gene pol de HIV que codifica para a protease, é subclonado num vector de expressão previamente preparado (pT7K) contendo um promotor de fago T7(19, criando o plasmídeo pPDB16(Fig.1). A construção de pPDB16 é levada a cabo na estirpe de E. coli DH5 α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Maryland) antes da transformação da estirpe de expressão E. coli BL21(DE3)pLysS. É necessário levar a cabo esta construção numa estirpe como a DH5 α , a qual não contém polimerase de RNA de T7 e, deste modo, não pode exprimir a protease de HIV uma vez que a expressão da protease de HIV mostrará ser tóxica para a estirpe de expressão.

Uma estirpe de E. coli DH5 α albergando o plasmídeo pPDB16 foi depositada na American Type Culture Collection e foi-lhe atribuído o número de acesso 68005. O plasmídeo pPDB16 pode ser obtido através de técnicas convencionais (20), por crescimento desta estirpe numa cultura, destruição das células, centrifugação e isolamento do plasmídeo a partir do sobrenadante.

A estirpe de expressão de E. coli, BL21(DE3)pLysS, contém uma cópia cromossômica da polimerase de RNA de T7 sob o controle de um promotor indutível lacUV5 e um plasmídeo resistente a cloranfenicol que codifica para a lisosima de T7 a qual inibe a transcrição pela polimerase de RNA de T7, na ausência de indução (21,22). São induzidas células que albergam pPDB16, com o agente indutor IPTG, na presença de 35 S-metionina e a síntese proteica é examinada por electroforese através de um gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio ("SDS-PAGE") a 15% (compreendendo 15 ml de acrilamida a 30%, 1,3 ml de bisacrilamida a 2%, 11,2 ml de TRIS-HCl 1M (pH 8,7), 0,15 ml de SDS a 20%, 2,35 ml de H₂O, 25 μ l de N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina e 100 μ l de persulfato de

amônia a 10%(20)) e autoradiografia. O fragmento de DNA de HIV em pPDB16 é esperado codificar para um produto primário de tradução de 18Kd. Em vez disso, como se verifica por SDS-PAGE, é observada uma banda saliente de 10Kd após a indução(FIG.2A, linha 2). Esta observação é consistente com uma eficaz autodigestão do precursor de 18Kd, de modo a formar uma protease madura de 10Kd (a forma biologicamente activa), na ligação fenilalanina-prolina (FIG.1) e está de acordo com resultados previamente relatados(5,7).

A banda de protease de HIV de 10Kd detectada por autoradiografia, não é visível por coloração com Coomassie blue, sugerindo que apenas são produzidos níveis baixos desta proteína. Foi determinado previamente que o nível absoluto de expressão de um gene clonado sob o controle do promotor de T7, é mais baixo em BL21(DE3)pLysS do que na estirpe correspondente sem lisosima (BL21(DE3)(21)), devido à inativação da polimerase de RNA de T7 pela lisosima (22). Contudo, os genes sob controlo do promotor de T7 que são tóxicos para E. coli não produzirão transformantes estáveis em BL21(DE3), a qual não possui o plasmídeo de lisosima, pLysS(21).

Numa tentativa para aumentar o nível de expressão da protease de HIV, é investigado o uso da estirpe de expressão BL21(DE3) pelos requerentes. Os resultados de duas experiências de transformação são mostrados na Tabela I:

<u>Plasmideo</u>	<u>No. de transformantes</u>	
	<u>BL21(DE3)</u>	<u>BL21(DE3)pLysS</u>
A.		
pPDB16	0	400
pPoll	400	400
pPol2	350	300
B.		
pMae2	0	960
p48Mae6	330	840
pPoll	600	2400

Tabela I. Transformação das estirpes BL21(DE3) por construções de protease de HIV. As células BL21(DE3) contendo ou não possuindo o plasmideo pLysS são tornadas competentes pelo processo padrão do cloreto de cálcio(20). São usados 20 ng do plasmideo controle de protease em cada transformação. Os plasmideos pPDB16 e pMae2 são os descritos previamente; o plasmideo p48Mae6 codifica para a protease de HIV com uma mutação pontual no aminoácido 29. Os plasmideos pPoll e pPol2 codificam

para a polimerase de polio (19).

Enquanto diversos plasmídeos como controle transformam as estirpes BL21(DE3) e BL21(DE3)pLysS igualmente bem, os plasmídeos pPDB16 e pMae2 que codificam para a protease de HIV não produzem transformantes em BL21(DE3). Estes dados sugerem fortemente que a expressão de pPDB16 ou pMae2 é tóxica para E. coli BL21(DE3). Esta toxicidade, por outro lado, sugere um método para identificação de agentes que inibem a protease de HIV.

A aparente toxicidade da protease de HIV podia ser devida à sua actividade enzimática inerente ou a algum outro efeito desta proteína. Esta questão é elucidada pelo isolamento de mutantes de protease de HIV através do teste de transformantes viáveis de BL21(DE3). Para introduzir mutações na protease de HIV, o plasmídeo pPDB16 é primeiro utilizado para transformar a estirpe de E. coli LE30 mutD (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Esta estirpe possui uma frequência de mutação espontânea 10^3 - 10^4 vezes mais alta se comparada com a E. coli de tipo selvagem (23). O plasmídeo é preparado a partir de 50.000 transformantes reunidos de LE30 mutD e, este plasmídeo é usado para a transformação de BL21(DE3).

São obtidas aproximadamente 150 colónias. Estes clones são examinados para a produção de protease de HIV por marcação das células com ^{35}S -metionina na presença de IPTG, seguido de electroforese através de SDS-PAGE usando o sistema descrito previamente e autoradiografia. Como mostra a FIG. 2B, estas mutações putativas não produzem a proteína de 10Kd observada no clone de tipo selvagem. Ao contrário, eles produzem proteínas de 18Kd (linhas M3, M4, M5) ou proteínas mais pequenas que 18Kd, mas não de 10Kd (linhas M2, M6, M7). Estas proteínas são apenas observadas após a indução com IPTG, o que indica que estão sob o controle do promotor de T7. Para além

disso, quando o plasmideo isolado destes mutantes putativos é adicionado a um sistema de transcrição-tradução dependente de DNA de E. coli, apenas é observada a proteína do mesmo tamanho da observada naquelas células, na presença de polimerase de RNA de T7.

Para determinar se uma lesão genérica específica poderia estar correlacionada com o tamanho alterado da proteína individual, o fragmento inserido de DNA de HIV de 500bp, inteiro, de cada mutante putativo, é sequenciado. O primeiro grupo de 18 sobreviventes de BL21(DE3) compreende oito clones que produzem a proteína de 18Kd (M3,M4,M5,M8, M9,M12,P2 e PS), sete clones que produzem proteínas mais pequenas que 18Kd (M2,M6,M7,M10,M11,P49 e P74) e três clones que não produzem proteína após a indução com IPTG(M1,P3 e P26).

Os resultados da sequenciação estão representados nas Tabelas II e III. A tabela apresenta mutantes "Sem sentido" de protease de HIV.

TABELA II

Clone

P26	CAG → UAG at nt 60
M7	CAA → UAA at nt 225
P49	CGA → UGA at nt 228
M10, M11	G inserção at nt 259, UGA at nt 293
M2	G deleção at nt 352, UAA at nt 373
P74	G inserção at nt 353, UGA at nt 383
M6, P52	CAG → UAG at nt 387

Tabela II. O fragmento inserido, inteiro de 500 bp de protease de pPDB16 de sobreviventes de BL21(DE3) é sujeito a análise de sequenciação de DNA e é identificado um codão prematuro de paragem. O clone P26 codifica para uma protease truncada de 2Kd a qual não é detectada após marcação de proteínas de E. coli, provavelmente devido ao seu pequeno tamanho. Cada um dos outros clones codifica para uma proteína menor que 18Kd a qual é detectada após marcação (ver Fig. 2B, linhas M2,M6,M7).

Cada clone que produz proteína menor que 18Kd contém um codão prematuro de terminação de tradução (Tabela II). Os codões de terminação prematura dos clones M6,M7 e P49, resultam duma transição C → U. No caso dos clones M2,M10,M11 e P74, a infração ou deleção de um residuo G numa área de 5 ou 6 G's resulta numa deslocação da grelha de tradução que pode dar origem à terminação tal como indicado (Tabela II). Em cada caso em que ocorre uma transição ou deslocação da grelha, o tamanho da protease previsto a partir da sequencia de DNA está de acordo com o tamanho da proteína observado após a indução (Fig. 2B6).

O clone P26 que aparentemente não produz proteína marcada após indução com IPTG, mostra não possuir um codão prematuro de terminação de tradução no nucleotido 61 (Tabela II). A proteína truncada esperada após indução desta construção, deve ser de aproximadamente 2Kd e é demasiado pequena para ser resolvida no sistema de gel usado o qual é baseado no de Plotch et al.(19). Os clones M1 e P3 também são sujeitos à análise de sequencia de DNA e mostraram codificar para a protease de tipo selvagem. Uma vez que na estirpe LE30 mutD todo o plasmideo é sujeito a mutagenese, estes clones podem conter mutações fora da região da protease de HIV que podem prevenir a transcrição ou tradução a partir dos ge-

nes sob o controle do promotor de T7, tais como mutações na própria região promotora ou no sitio de ligação ou ribossoma (21).

Para cada clone que produz a proteína de 18Kd, é detectada uma única mutação de nucleotídeo que leva a uma única substituição de aminoácido, por sequenciação de DNA(Tabela III). Após estes resultados iniciais com o primeiro grupo de 18 clones serem obtidos, apenas os clones que produzem a proteína de 18Kd após indução são examinados detalhadamente. A modificação específica de aminoácido determinada para cada mutante é resumida na Tabela III:

			Asp	Gli
P15	297	31	ACA —>	GCA
				Ala
P1, P5, P80	319	38	UUG —>	UCG
			Leu	Ser
P66	339	45	AAA —>	GAA
			Lis	Glu
M3, M5	346	47	AUA —>	ACA
			Ile	Tre
P31, P44	355	50	AUU —>	ACU
			Ile	Tir
M9	381	59	UAU —>	CAU
			Tir	His
P24	385	60	GAU —>	GUU
			Asp	Val
P13, P47, P68	403	66	AUC —>	ACC
			Ile	Tre
M4, P73	424	73	GGU —>	GAU
			Gly	His
P45, P79	427	74	ACA —>	AUA
			Tre	Ile
M8	433	76	UUA —>	UCA
			Leu	Ser
P2, P8	436	77	GUA —>	GCA
			Val	Ala
P22	442	79	CCU —>	CUU
			Pro	Leu
P38	460	85	AUU —>	ACU
			Ile	Tre
P9	463	86	GGA —>	GAA
			Gli	Glu
P50	465	87	AGA —>	GGA
			Arg	Gli
P27	484	93	AUU —>	ACU
			Ile	Tre

Tabela III. Mutantes de "troca de sentido" de protease de HIV. O fragmento inteiro ingerido de 500 bp de pPDB16 de sobreviventes de BL21(DE3) que produzem um precursor de protease de 18Kd (ver texto e Fig. 2B) é sujeito a análise de sequência de DNA e é identificado uma única mutação pontual em cada clone. A numeração de nucleótidos e aminoácidos é descrita na Fig. 1.

São identificadas em todos 24 mutações pontuais diferentes. Seis destas mutações, nos aminoácidos Ile 3, Ile 47, Ile 50, Gln 73, Thr 74 e Val 77, são identificadas em dois clones independentes. Visto que as mutações são reisoladas sem obtenção de outras mutações conhecidas (ou seja, mutação na Asp 25) (4,5), é possível que plasmídeos irmãos estejam a ser detectados.

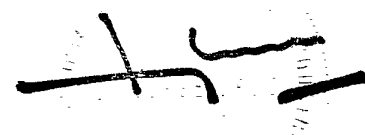
Algumas destas mutações podem ser agrupadas de acordo com a função proposta do aminoácidos na protease de HIV. O triplete Asp, Thr e Gln é conservado na família de proteases de aspartil (8) e ajuda a localizar o sítio activo da protease de HIV nos resíduos 25,26 e 27. Mutações nestes ou perto destes resíduos devem tornar a protease enzimaticamente inactiva por destruição do sítio catalítico. A estrutura tridimensional da protease de HIV foi descoberta recentemente (10) e parece que mutações em Ala 22, Gln 27, Asp 29, Thr 31, Ile 85, Gln 86 e Arg 87 se localizam no sítio activo. Também foram encontradas mutações; pelos requerentes, em aminoácidos que se supõem participarem nas ligações de hidrogénio da protease, incluindo Ala 22, Lys 45, Ile 47, Ile 66, Gln 73, Val 77 e Ile 85. Finalmente, a protease de HIV é provavelmente um dímero tendo em conta a sua estrutura de cristal analisada aos raios X (10,24) e, as mutações dos requerentes em Gln 27, Ile 50 e Ile 93 devem interferir com a formação de dímeros.

Loeb et al., (25) levaram a cabo uma mutagénese dirigida a um sítio extenso entre os aminoácidos 21 e 46 da protease de HIV após o que determinaram a actividade de

processamento. A maior parte das mutações de troca de sentido eliminam o processamento nessa região, a qual é altamente conservada entre as proteases de retrovirus. Estas mutações incluem Asp 29→Gli e Tre 31→Ala, de acordo com os resultados dos requerentes. Contudo, em contraste com a abordagem de Loeb et al., o método dos requerentes de isolamento de mutantes parece seleccionar apenas proteases não funcionais. De acordo com isto estão 31 mutações nos aminoácidos 21-46 que Loeb et al. determinaram possuir pouco ou nenhum efeito no processamento. Nenhuma destas mutações aparece nos testes dos requerentes. Os resultados dos requerentes também indicam que mutações pontuais na protease, fora das regiões conservadas, podem destruir a actividade da enzima (Tabela II).

Krausslich et al.(26) mostraram que a deleção de 17 aminoácidos da extremidade carboxi do precursor de protease de HIV de 18Kd previne a autodigestão que liberta a protease madura de 10Kd e, para além disso, o precursor é incapaz de clivar um substrato gag em trans. Resultados similares foram obtidos por Hansen et al.(27). Quatro das mutações pontuais dos requerentes em Ile 85, Gli 86, Arg 87 e Ile 93 estão nos 17 aminoácidos da extremidade carboxi.

Os resultados dos requerentes indicam que o precursor de protease mutante de 18Kd é incapaz de se autodigerir e não é, aparentemente, tóxico para BL21 (DE3). Sem se cingirem à discussão seguinte, os requerentes propõem que a protease madura de 10Kd exerce o seu efeito tóxico por digestão de uma proteína não identificada essencial de E.coli e que o precursor de 18Kd é incapaz de levar a cabo esta digestão. O falhanço em gerar a protease madura de 10Kd pode resultar da mutação de um aminoácido requerido para a actividade catalitica ou da disrupção da ligação Fen-Pro,(localizada nos aminoácidos -1 a +1 da protease madura), de tal modo que a autodigestão do precursor de 18Kd não ocorre. Os requerentes propõem que as mutações em Ser -4, Gln 2 e Ile 3 (Tabela II) tor-



nam a ligação Fen-Pro não clivável. Loeb et al.(25) usaram mutagênese dirigida a um sítio na poliproteína pol (a qual codifica para a protease, transcriptase inversa e endonuclease) para introduzir substituições na ligação Fen-Pro. Uma classe de mutantes é defectiva para autodigestão mas pode ainda clivar nas margens não mutadas de endonuclease e transcriptase inversa. Este processamento resulta ou duma pequena quantidade de protease madura não detectada ou do precursor que reteve a actividade. Outra classe de mutantes que não liberta a protease madura também não é eficaz na clivagem para gerar a endonuclease e a transcriptase inversa. É possível que o método dos requerentes de detecção de mutantes, a necessidade de transformação estável de BL21 (DE3), selecione precursores de 18Kd que são enzimaticamente inactivos.

Para examinar directamente o efeito da protease madura na viabilidade de BL21(DE3), os requerentes construíram plasmídeos que codificam apenas para a protease de 10Kd, ultrapassando a necessidade de autodigestão do precursor, (Fig.1). Como mostra a Tabela IB, o plasmídeo de protease de 10Kd de HIV de tipo selvagem (pMae2) não transforma a estirpe BL21(DE3) com sucesso, mas é capaz de transformar BL21(DE3)pLysS. O plasmídeo p48Mae6 que codifica para a protease com uma mutação pontual no aminoácido 29(Tabela III), é capaz de transformar ambas as estirpes de E. coli.

Outra evidência da toxicidade da protease de HIV para BL21 (DE3) é fornecida pelo exame da sobrevivência de culturas na presença de IPTG. Nesta experiência, culturas de células BL21 (DE3)pLysS contendo a protease de tipo selvagem (pPDB16) ou mutante (pP48) crescem até meio da fase logaritmica e a síntese de protease é induzida com IPTG. O número de células viáveis é determinado por plaqueamento de aliquotas de culturas tendo em vista a formação de colónias isoladas. Após 30 minutos de exposição a 1,0 mM ou 0,1 mM de IPTG as células que albergam a protease de tipo selvagem sofrem

aproximadamente quatro logs de mortalidade se comparadas com as células não tratadas (Fig.3). Ao contrário, as células que albergam a protease mutante não são afectadas pela adição de IPTG. Estes dados indicam que a protease de HIV é extremamente tóxica para BL21(DE3). Similarmente, as células que albergam o plasmideo que codifica para a protease de tipo selvagem de 10Kd (pMae2) são significativamente mais sensíveis ao IPTG do que as células que albergam o plasmideo que codifica para a protease mutante correspondente (p48Mae6).

Uma estirpe de E. coli BL21(DE3) albergando o plasmideo pP48 foi depositada na American Type Culture Collection e foi-lhe dado o número de acesso ATCC 68004. Esta estirpe que alberga o plasmideo pode ser sujeita a um dos seguintes métodos com o fim de retirar o pP48 de modo a obter a estirpe de E. coli BL21(DE3) (28,29):

1) Tratamento com agentes que inibem preferencialmente a replicação do plasmideo, tais como laranja de acridina, acriflavina, quinacrina ou brometo de etidio: Por exemplo, a BL21(DE3)/pP48 deixa-se crescer durante a noite numa cultura líquida. O meio é constituído por 10g de peptona e 10g de extrato de levedura por litro e o pH é ajustado até 7,6 com NaOH. A seguir são inoculadas 10^4 células por ml numa série de tubos contendo 10-100 µg/ml (incrementos de 10 µg/ml) de laranja de acridina. Estas culturas são incubadas no escuro a 37°C, durante a noite. As células são riscadas em placas LB a partir da cultura que contém a concentração mais alta de laranja de acridina e que mostrou crescimento. São testadas colónias individuais para a resistência a canamicina. As colónias que são sensíveis à canamicina devem ter perdido o pP48 de tal forma que só resta a estirpe de E.coli BL21 (DE3).

2) Tratamento espontâneo. Por exemplo, deixa-se crescer BL21 (DE3) pP48 até à fase estacionária, diversas vezes, em meio LB sem canamicina. As células são riscadas em placas LB. As colônias individuais são testadas para a resistência à canamicina. As colônias que são sensíveis à canamicina devem ter perdido o pP48 de tal forma que só resta a estirpe de E.coli BL21 (DE3).

3) Tratamento com agentes que inibem a girase de DNA, tais como a coumermicina ou a novobiocina. Este método é idêntico ao tratamento com acridina, exceptuando que os agentes de tratamento são usados entre 1 e 7 microgramas por ml.

4) Tratamento com um agente que inibe a polimerase de RNA, tal como a rifampicina. Este método é idêntico ao do tratamento com acridina, exceptuando que a rifampicina é usada entre 5 e 10 microgramas por ml.

A quantidade de proteína produzida após indução com IPTG, pelas células que albergam plasmídeos que codificam para versões de tipo selvagem ou mutantes da protease de 18Kd ou 10Kd, é examinada por marcação com ³⁵S metionina e imunoprecipitação seguida electroforese através de gel e autoradiografia (Fig.4). Estima-se que os mutantes P48 e P48Mae6 que codificam para o precursor de 18Kd e para a protease de 10Kd, respectivamente, (linhas 2 e 4), produzem dez vezes mais, mais protease do que os clones de tipo selvagem correspondentes PDB16 (linha 1) e Mae2 (linha 3). A diminuição da quantidade de protease de tipo selvagem produzida comparada com a mutante é, provavelmente, devida à morte de células pela protease de tipo selvagem após indução com IPTG (Fig.3). Surpreendentemente, contudo, os mutantes ainda produzem níveis muito baixos do precursor de protease, apesar da sua falta de toxicidade. As proteínas mutantes não podem ser detectadas por coloração com Coomassie blue nos geis correspon

dentes. Uma vez que são expressos genes diferentes com diferentes eficiências no sistema T7(21), deve haver uma barreira para a alta produção de protease de HIV, mesmo quando a sua toxicidade é aparentemente aliviada.

A protease de HIV foi expressa com sucesso em várias estirpes de E. coli K12 (5,6,7,9,27), embora pelo menos HB101, tenha sido descrita a inibição do crescimento após indução da síntese da protease (30). A protease de HIV pode ser especialmente tóxica para BL21(DE3) a qual é uma estirpe B de E. coli. A toxicidade da protease de HIV para E. coli BL21(DE3)21 parece indicar que a protease funciona apropriadamente. Ao contrário dos resultados descritos neste requerimento, Krausslich et al.(15) descreveram a expressão da protease de HIV na estirpe BL21(DE3) sem o plasmídeo de lisosima. As diferenças entre a construção de protease de Krausslich et al. e a de presente invenção podem ser tomadas em conta na observação consistente de que BL21(DE3) não pode ser transformada por pPDB16. A extremidade amino da protease de 18Kd dos requerentes é o codão 1 do gene pol precedido de um único resíduo de metionina, ao passo que a de Krausslich et al é o codão 5 do gene pol precedido de 12 aminoácidos do gene 10 do fago T7 (26). Para além disso, a nova construção de protease desta invenção é feita num plasmídeo que codifica para a resistencia a canamicina e não a ampicilina. Contudo, a protease também é tóxica para BL21(DE3) quando introduzida num vector com resistencia a ampicilina, indicando que o alvo putativo da protease de HIV não é, provavelmente, a fosfotransferase que confere a resistencia a canamicina.

Estudos recentes com substratos peptídicos identificaram requisitos mínimos de sequência para a clivagem com protease de HIV e concluíram ser suficientes sete aminoácidos (11,12,16). Deste modo, a proteína bacteriana que é o alvo putativo da protease necessita de partilhar pouca

homologia com os substratos naturais gag e pol. A toxicidade da protease de HIV para a estirpe de E. coli BL21(DE3) fornece um método para o isolamento de mutantes desta importante enzima virol e, mais importante ainda, o potencial para o teste de inibidores de proteases úteis na terapia da infecção por HIV.

Os requerentes demonstraram que os plasmídeos de protease de HIV pPDB16 e pMae2 são incapazes de transformar com sucesso a estirpe de E. coli BL21 (DE3) (Tabela I). Como teste, estas transformações são tentadas na presença de inibidores potenciais da protease de HIV. Transformações bem sucedidas servem para identificar inibidores da protease. Noutra experiência, os requerentes também demonstram que o fago que codifica para a protease de HIV é incapaz de transfectar a estirpe de E. coli BL21(DE3) F+. Estas transfecções também podem ser tentadas na presença de potenciais inibidores da protease.

Outro exemplo do primeiro método de teste, envolve o uso de BL21(DE3) pLysS transformada com os plasmídeos de protease de HIV pPDB16 e pMae2. A indução de síntese de protease por IPTG mata estas células, como se demonstra na Figura 4. Potenciais inibidores de protease podem prevenir a morte das células induzidas.

As experiências seguintes com o primeiro método de teste para a protease de HIV, podem ser adaptadas para identificar inibidores da protease de polio. O material inicial para esta parte da invenção é o poliovírus de tipo 1 (estirpe Mahoney) o qual foi previamente depositado na American Type Culture Collection e ao qual foi dado o número de acesso ATCC VR-59. Esta estirpe de poliovírus é usada para gerar a protease 3C de polio através duma série de passos descritos abaixo.

Em resumo, a estirpe de poliovirus 1 é inicialmente usada para o plasmideo pT7pvl-5(31). O plasmideo contém a sequencia completa de cDNA da estirpe 1 de poliovirus sob o controle do promotor de T7 descrito previamente. A protease de polio 3C é então subclonada a partir deste plasmideo.

Especificamente, numa primeira etapa, é preparado cDNA da estirpe 1 de poliovirus e é subclonado no vector T7 para construir o plasmideo pT7pvl-5 por técnicas padrão. O gene de protease de polio (nucleotidos 5438-5986) é retirado do plasmideo pT7pvl-5 sob a forma de fragmento de restrição AsuI(nucleotidos 5435-5953). São usados oligonucleotidos sintéticos para recriar as sequencias codificadoras acima e abaixo, para fornecer códons de inicio e paragem da tradução, bem como para recriar os sitios de restrição NdeI e BamHI descritos previamente tendo em atenção a Figura 1. Seguindo este processo obtem-se um plasmideo possuidor da protease de polio 3C sob o controle do promotor de T7.

Em experiências análogas às realizadas com a protease de HIV, os dados dos requerentes sugerem que a protease de polio 3C também é tóxica para a estirpe de E.coli BL21(DE3). Como mostra a Tabela IV abaixo, o plasmideo que contém a protease de polio 3C é incapaz de transformar com sucesso BL21(DE3), mas transforma BL21(DE3) pLysS. O plasmideo controle pPoll (o qual codifica para a polimerase de polio como descrito na Tabela I) transforma ambas as estirpes com aproximadamente igual eficiência:

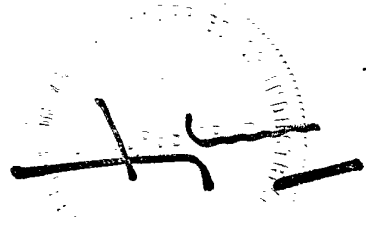


TABELA IV

No. de transformantes

	<u>BL21(DE3)</u>	<u>BL21(DE3)pLysS</u>
Proteinasq		
Ppolio	0	150
pPoll	300	500

Estes dados indicam que a protease de polio 3C, tal como a protease de HIV, é tóxica para esta estirpe de E. coli, BL21(DE3), quando colocada sob o controle do promotor de T7. Assim, pode ser imediatamente projectado um método para testar inibidores de protease de polio. Num tal teste, um composto a ser testado mostra ser um inibidor da protease de polio ao evitar a morte da estirpe bacteriana BL21(DE3) e permitir transformações sucessivas daquela estirpe por um plasmideo que codifica para a protease de polio 3C.

Por outro lado, os resultados com as proteases de HIV e de polio 3C fornecem a base para um teste geral de inibidores de proteases. De particular interesse são os compostos que inibem outras proteases que estão implicadas em doenças humanas, tal como a renina, tripsina e elastase.

A protease alvo particular, é colocada num plasmideo sob o controle do promotor de T7. O sistema mostra ser tóxico para a estirpe de E. coli BL21(DE3) ao verificar-se falhar a transformação daquela estirpe não obstante

seja transformada a estirpe BL21(DE3)pLysS. Os compostos potencialmente inibidores de proteases são então testados. Os compostos que possuem actividade inibidora são aqueles que bloqueiam a toxicidade da protease para BL21(DE3)e, deste modo permitem as transformações daquela estirpe.

O segundo método de teste de inibidores de enzimas proteolíticas é dirigido para a construção de proteínas de fusão que compreendem uma proteína sinalizante (quer dizer, uma proteína facilmente testável) na qual foi introduzido um sitio de clivagem de protease. O sitio de clivagem corresponde a uma porção de um substrato natural de protease de interesse.

A proteína sinalizante escolhida é capaz de ser ensaiada para uma mudança de cor, luz ou actividade quando combinada com uma enzima proteolítica. A introdução do sitio de clivagem para criar uma "cassete de clivagem" de protease, não destrói a actividade da proteína sinalizante. Deste modo, a proteína de fusão pode ser usada num sistema de ensaio para testar inibidores de proteases.

Quando a enzima proteolítica é adicionada à proteína de fusão que contém o sitio de clivagem de protease, a proteína cliva no sitio da protease, inactivando deste modo a proteína de fusão. Esta perda de actividade é verificada por mudanças de cor, luz ou por verificação directa da perda de actividade. Um composto a testar é incluído no sistema de ensaio e é identificado como inibidor da protease se a proteína sinalizante não fôr clivada e permanecer activa segundo os métodos descritos acima.

Exemplos de proteínas sinalizantes que são utilizadas na construção de proteínas de fusão e que são ensaiadas por mudança de cor com um composto indicador de cor incluem a β -galactosidase, fosfatase alcalina, β -gluco-

ronidase e acetiltransferase. Este sistema pode ser adaptado para proteínas que especifiquem resistencia a antibióticos, tal como a β -lactamase. Numa parte preferencial desta invenção, a β -galactosidase é usada como proteína sinalizante.

A enzima β -galactosidase, codificada pelo gene lac Z de E. coli, é responsável pela conversão da lactose em glucose e galactose, permitindo a utilização da lactose como fonte de carbono(32). Uma vez que a β -galactosidase também cataliza a hidrólise de diversos outros substratos que são convertidos em compostos coloridos, tornou-se um instrumento de grande valor para observar uma larga gama de processos biológicos. Por exemplo, as fusões de β -galactosidase foram usadas para estudar a regulação da transcrição e da tradução (33 e referências nela incluídas). A fusão de uma proteína heteróloga com β -galactosidase pode facilitar a purificação daquela proteína (34-37). Para além disso, a interrupção da extremidade amino de β -galactosidase, é a base da identificação dos clones desejados quando se usam os plasmídeos das séries pVC(38).

A demonstração nesta invenção de que sequências proteicas estranhas podem ser inseridas em regiões específicas de β -galactosidase, resultando quer na retenção de actividade de β -galactosidase quer na acessibilidade de sequências estranhas às proteases, é um facto novo. No caso específico da cassette de clivagem de protease, o facto de a β -galactosidase poder agora ser clivada e inactivada pela protease análoga, fornece um meio simples de verificar a actividade proteolítica e de procurar inibidores destas importantes enzimas.

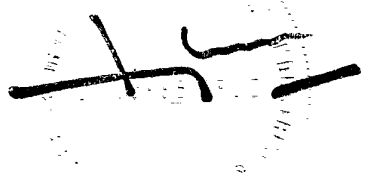
Exemplos de compostos indicadores de cor apropriados incluem X-gal e Fast Blue RR. Uma proteína como a β -galactosidase irá reagir com X-gal para produzir cor azul; quando a proteína é inativada não é observada nenhuma mudança de cor (branca). Uma reacção similar da proteína com Fast Blue RR produz uma cor vermelha; após inactivação não é observada nenhuma mudança de cor (branca).

Em alternativa, a proteína é escolhida de tal modo que catalize a reacção química de emissão de luz dum proteína derivada dum organismo bioluminescente ou quemescente. Contudo, quando a proteína é clivada por uma enzima proteolítica, a reacção não pode ocorrer e, deste modo, não é emitida luz. A luz pode ser observada a olho nu, medida espectrofotometricamente ou gravada numa película de Raios X. Preferencialmente, a proteína sinalizante usada é a luciferase.

Adicionalmente, a inactivação pela protease pode ser verificada por um sistema in vitro que mede directamente a actividade da proteína numa reacção com um substrato.

Em todas as variantes da segunda parte desta invenção, a proteína de fusão é expressa num sistema de expressão apropriado. O hospedeiro é uma bactéria, levedura, célula de insecto, linha celular de mamífero ou qualquer outro sistema de expressão. Numa parte preferencial a estirpe hospedeira é de E. coli.

Como ilustração do segundo método de teste desta invenção, a construção e uso de um sistema de ensaio para teste de inibidores da protease de HIV com β -galactosidase e um indicador de cor, serão agora descritos.



O passo inicial é a construção dum plasmideo que contém o gene que codifica para a β -galactosidase. O plasmideo pZM1 é construido como se segue: a estirpe de E.coli MC1061(ara D139, Δ (ara,leu)7697, Δ lacX74, galU, galK, hsdR, strA) é obtida de Pharmacia. O plasmideo pZM1 que contém o gene β -galactosidase de E. coli é derivado do pCH110 (Pharmacia). O plasmideo pCH110 contém um sitio EcoRI que é retirado por troca do fragmento mais pequeno PstI/BamHI de pCH110 que contém o gene de β -lactamase, com o fragmento correspondente PstI/BamHI duma variante de pBR322 que não contém o sitio EcoRI normalmente presente nesse fragmento. A seguir, o fragmento EcoRI/BamHI que contém a extremidade carboxi do gene da β -galactosidase é trocado pelo oligonucleotido:

5' AATTCCAGCTGAGGCGCGGTGGCTACCATTAACCACTTGGTCTGGTGTCAAAAATAATAAG 3'
3' GGTCGACTGGGGCCAGCGATGGTAATGGTCAACCAAGACCAAGTTTTATTATTCTAG 5'

que recria a extremidade carboxi da β -galactosidase e coloca dois codões de paragem no fim do gene. O plasmideo resultante é designado por pZM1.

O passo seguinte é a construção de plasmideos que codificam para a protease de HIV de tipo selvagem ou mutante, respectivamente, cada um deles sob controle dum promotor tac. Estes plasmideos, designados por pl+IQ e pl5-IQ, são construidos como se segue: os genes de protease de pMae2 (tipo selvagem) ou p48Mae6(mutante, descritos previamente, são retirados sob a forma de fragmentos NdeI/BamHI, tornados cegos pela enzima de Klenow e ligados ao sitio Sma de pKK223-3(Pharmacia), criando o pl+ e o pl5-. O fragmento SphI/AlwNI de pl+ e pl5- que contém o gene de protease de HIV é então ligado ao fragmento PvuI/AlwNI que contém o gene lacIQ de pGEX2T (Pharmacia) criando os pl+IQ e pl5-IQ(Fig.5A). Para retirar o sitio de restrição BamHI no sitio de ligação

múltipla de p1+IQ e p15-IQ, estes plasmídeos são parcialmente digeridos com BamHI, tornados cegos com a enzima de Klenow e ligados. Os plasmídeos resultantes, designados por p1+IQB e p15-IQB, contém um único sítio BamHI imediatamente acima do promotor tac.

Subsequentemente, um sítio de clivagem de protease de HIV é ingerido na β -galactosidase por inserção dum oligonucleotido no gene de β -galactosidase do plasmídeo pZM-1. Estudos de diversos laboratórios usando péptidos sintéticos possuidores dos diferentes sítios de clivagem dos poliproteínas gag e gag/pol, determinaram a sequência mínima de aminoácidos requerida para a clivagem com a protease de HIV (11,12,15,16). O sítio p6/PR é clivado mais eficazmente in vitro e apenas sete aminoácidos são suficientes para a clivagem (15). Baseados nestes requisitos mínimos, são sintetizadas séries de oligonucleotidos ("cassetes de clivagem"). Estes oligonucleotidos correspondem aos dez aminoácidos que rodeiam a junção p6/PR e contém as extremidades coesivas apropriadas para a inserção em grelha em seis locais diferentes do gene da β -galactosidase do plasmídeo pZM1 (Fig. 5B).

O decapeptido Val-Ser-Phe-Asn-Phe-Pro-Gln-Ile-Thr-Leu corresponde ao sítio de clivagem de p6/PR da poliproteína de HIV gag/pol. São sintetizados seis pares de oligonucleotidos ("cassetes de clivagem") que codificam para este decapeptido. Os oligonucleotidos possuem em comum a sequência de DNA abaixo indicada que contém um sítio de restrição HindIII(sublinado) e que codifica para o decapeptido em cada par de oligonucleotidos:

Val Ser Phe Asn Phe Pro Gln Ile Thr Leu
 5' GTA AGC TTT AAC TTC CCT CAG ATC ACT CTG 3'
 3' CAT TCG AAA TTG AAG GGA GTC TAG TGA GAC 5'

Cada par contém nucleotídeos adicionais que especificam diferentes extremidades coesivas desenhadas para inserção, na grelha de leitura adequada, nos únicos sítios de restrição BssH2, ClaI, DraIII, EcoRI, SauI ou SstI do gene de β -galactosidase de E. coli de pZM1 (Fig. 5B). Os seis sítios diferentes na β -galactosidase são seleccionados por serem sítios de restrição únicos em pZM1 e a cassette de clivagem pode ser ingerida por um processo de clonagem simplificado descrito abaixo. As sequências completas de DNA dos seis pares de oligonucleotídeos são as seguintes (com o sítio de clivagem de HIV assinalado por parenteses rectos):

ECOL1/2 (xRI entidades coesivas):

5' AA TTT [GTA AGC TTT AAC TTC OCT CAG ATC ACT CTG] C 3'
3' A [CAT TOG AAA TTG AAG GGA GTC TAG TGA GAC] GTT AA 5'

SST1/2 (xSstI entidades coesivas):

5' G [GTA AGC TTT AAC TTC OCT CAG ATC ACT CTG] CAG CT 3'
3' TC GAC [CAT TOG AAA TTG AAG GGA GTC TAG TGA GAC] G 5'

CLA1/2 (xClaI entidades coesivas):

5' C [GTA AGC TTT AAC TTC OCT CAG ATC ACT CT] 3'
3' [AT TOG AAA TTG AAG GGA GTC TAG TGA GAG] C 5'

DRA1/2 (xDraIII entidades coesivas):

5' G [GTA AGC TTT AAC TTC OCT CAG ATT ACG CT] 3'
3' C GAC [CAT TOG AAA TTG AAG GGA GTC TAA TG] 5'

SAU1/2 (xMstIISauI entidades coesivas):

5' T GAA [GTA AGC TTT AAC TTC OCT CAG ATT ACG CTG] AC 3'
3' T [CAT TCG AAA TTG AAG GGA GTC TAA TGC GAC] TGA CT 5'

BSS1/2 (xBssH2 entidades coesivas):

5' CG CGA [GTA AGC TTT AAC TTC OCT CAG ATT ACG CTG] A 3'
3' T [CAT TCG AAA TTG AAG GGA GTC TAA TGC GAC] TGC GC 5'

Para simplificar o processo de clonagem, somente as extremidades coesivas de cada par de oligonucleotidos se assemelham ao sitio de restrição alvo, de tal modo que a ligação bem sucedida do oligonucleotido ao gene da β -galactosidase destrói esse sitio de restrição. Deste modo, após ligação do oligonucleotido em pZml, a mistura de ligação é digerida com a enzima de restrição alvo para linearizar qualquer plasmideo residual inicial pZml. Após precipitação com etanol, a mistura de ligação digerida é usada para transformar a estirpe de E. coli Mc1061. Os clones correctos são identificados pela presença de um novo sitio HindIII. Este método resulta numa alta proporção de clones correctos e elimina a necessidade de tratamento com fosfatase do vector e do tratamento com cinase dos oligonucleotidos.

Os plasmideos resultantes são designados por pZM-Bss, pZM-ClaA, pZM-Dra, pZM-Eco, pZM-Sau e pZM-Sst respectivamente. Também foi construido o plasmideo pZM-Cla B que contém a cassette de clivagem na orientação inversa e que codifica para o decapeptido não relacionado Glu-Ser-Asp-Leu-Arg-Glu-Val-Lis-Ala-Tir que não deve ser reconhecido pela protease de HIV. Em cada caso, a inserção da cassette de clivagem no gene de β -galactosidase é confirmada por sequenciação de DNA.

Para verificar se é retida a actividade de β -galactosidase desejada, apesar de inserção da cassette de

clivagem, é plaqueada em placas com X-gal a estirpe de E.coli Mcl061 que alberga cada construção. Neste ensaio, a β -galactosidase funcional resulta em colônias azuis e a falta de actividade de β -galactosidase produz colônias brancas. Usando processos descritos abaixo, cada construção também é testada quantitativamente para a actividade de β -galactosidase e para o facto de ser ou não clivada pela protease de HIV in vitro e in vivo. A Tabela V apresenta os resultados deste ensaio:

TABELA V

Actividade de Beta-galactosidase das construções de cassette de clivagem e susceptibilidade à clivagem pelo protease de HIV

Plasmídeo	Cor da colónia em placas com X-gel	actividade deBeta-galactosidase (unidades) ¹	Clivagem pelo in vitro	Protease de HIV 2 in vivo
pZM-Bss	Azul	5	no	no
pZM-Cla A	Azul	10	no	no
pZM-Cla B	Azul	163	no	no
pZM-Dra	Branco	0	no	n.d. ³
pZM-Eco	Azul	2	no	no
pZM-Sau	Azul	63	yes	yes
pZM-Sst	Branco	0	no	n.d.
pZM1	Azul	1179	no	n.d.
Nada	Branco	0	-	-

¹ a actividade de beta-galactosidase é determinada por hidrólise de ONPG

² a clivagem de beta-galactosidase pelo protease de HIV é determinada por análise "Western" (ver na Figura 6 e 8)

³ N.R. = não realizado

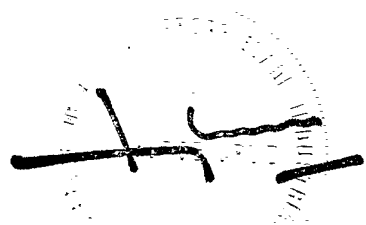
A inserção da cassette de clivagem nos sítios SauI, ClaI, BssH2 ou EcoRI resulta em colônias azuis, indicando que a actividade enzimática da β -galactosidase é retida. A inserção da cassette de clivagem na orientação oposta no sítio ClaI de tal modo que é codificado um decapeptido não relacionado com o sítio de clivagem de protease de HIV (Tabela V, pZM-Cla B) também resulta na formação de colônias azuis. Estes dados indicam que a proteína β -galactosidase pode tolerar inserções em diversos locais e ainda reter actividade enzimática detectável. Reciprocamente, a inserção em DraIII ou SstI destrói a actividade de β -galactosidase uma vez que as colônias que albergam estas construções são brancas. A intensidade da cor azul em estirpes que albergam os plasmídeos pZM Bss, Cla A, Cla B, Eco e Sau exibe uma variação considerável e em todos os casos é menos intensa do que a conferida pelo plasmídeo inicial pZM1. A actividade de β -galactosidase é quantificada por hidrólise de 0-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG) (39). As placas contêm 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-gal) a 40 μ g/ml. Os ensaios usam uma modificação do descrito por Miller (40). As células crescem em meio Luria até atingir uma absorbância de 0,5 (600 nanómetros). As células (0,5 ml) são sedimentadas e ressuspensas em 2 ml de tampão Z (0,1 M Na_3PO_4 , pH 7,0, 1 mM MgSO_4 , 0,2 mM MnSO_4 , 0,1 M β -mercaptoetanol, 0,2 mg/ml CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamónio), 0,1 mg/ml deoxicolato de sódio) e incubados durante cinco minutos a 28°C. A seguir são adicionados 0,6 ml de ONPG a 4 mg/ml em 0,1 M Na_3PO_4 pH 7,0 e deixa-se incubar a 28°C até a solução se tornar amarela (10 minutos a durante a noite). Para parar a reacção são adicionados 1,3 ml de 1 M Na_2CO_3 . A absorbância é, então lida a 420 e a 550 nanómetros. As unidades de β -galactosidase são calculadas usando a seguinte equação:

$$\text{unidades} = \frac{(A_{420} - 1,75) \times A_{550}}{t \times v \times A_{600}}$$

onde A = absorbância, T = tempo da reacção em minutos e v = volume da cultura usada em ml.

Os resultados do ensaio quantitativos também estão representados na Tabela V. Os clones azuis exibem bastante menos actividade de β -galactosidase do que o plasmideo inicial pZM1 (de dez vezes (pZM-Cla B) a cerca de quinhentas vezes menos (pZM-Eco)). Sem ficarmos restrictos ao seguinte, propomos que a reduzida actividade de β -galactosidase, observada após inserção da cassette de clivagem, pode resultar duma mudança na estrutura desta proteína que atenua a sua função enzimática, da proteína β -galactosidase/cassete de clivagem que possui actividade enzimática de tipo selvagem mas está presente em quantidades reduzidas ou da combinação destes dois factores. Como esperado, os clones brancos pZM-Dra e pZM-Sst não produzem níveis detectáveis de actividade de β -galactosidase neste ensaio.

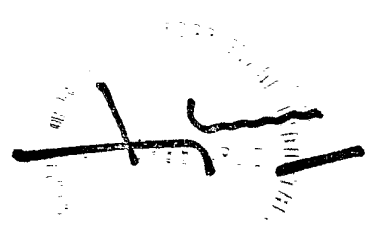
As proteínas β -galactosidase/cassete de clivagem são testados a seguir para a susceptibilidade à clivagem pela protease de HIV in vitro. Duas amostras da estirpe de E. coli Mcl061, uma contendo o plasmideo de protease pl+IQ e a outra o plasmideo pl5-IQ, crescem até atingir 0,5 unidades de absorbância (595 nanómetros). A síntese de protease é induzida por adição de IPTG a 1mM. Após uma hora, as células são sedimentadas, ressuspensas em 0,66 volumes de tampão M (50mM ácido 2-(N-morfolino)etanossulfónico (MES), pH6, 1mM ditiotretitol e 25mM NaCl) contendo 1mM EDTA e 1 mg/ml de lisosima e incubadas em gelo durante 10 minutos. As células são sedimentadas e ressuspensas em 0,01 volumes de tampão M e lisados por três ciclos de congelação/descongelação (congelação rápida em gelo seco/etanol e descongelação lenta em água gelada). Após a descongelação final, o extracto é centrifugado e o sobrenadante clarificado é usado como fonte de protease.



O mesmo método é usado para preparar extractos que contêm β -galactosidase de células de E. coli MC1061 albergando as séries de plasmídeo pZM descritas previamente, exceptuando que se omite o IPTG e é usado 0,1 volume de tampão M no ciclo de congelação/dcongelação. Para as reacções de clivagem, 20 μ l de extracto de β -galactosidase são tipicamente incubados com 5 μ l de extracto de protease a 37°C durante uma hora, seguido de electroforese das reacções de incubação através de geis de SDS-poliacrilamida. A β -galactosidase é visualizada por análise de "Western Blot" usando um soro policlonal de murganho anti- β -galactosidase (SIGMA) e o conjunto de reagentes ImmunoSelect (Bethesda Research Laboratories). O substrato controle marcado com 35 S-metionina correspondente à poliproteína gag de HIV (nt 109-1417) (4) é produzido a partir do promotor de T7 na estirpe de E. coli BL21 (DE3)pLysS.

Um extracto da estirpe de E. coli MC1061 contendo a protease de tipo selvagem (de pl+IQ), mas não protease mutante (de pl5-IQ) é capaz de clivar a poliproteína gag, a qual é um substrato natural da protease de HIV (Fig. 6A). Extractos de E. coli contendo construções de β -galactosidase/cassete de clivagem são incubados com extracto de protease de HIV de tipo selvagem ou mutante e a clivagem de β -galactosidase é verificada por análise "Western" usando anticorpos anti- β -galactosidase (Fig. 6B). A β -galactosidase nativa codificada por pZM1 não é afectada por estas incubações (linhas 4-6). Das seis proteínas β -galactosidase/cassete de clivagem examinadas, cinco delas (Bss, Cla A, Dra, Eco e Sst) não são igualmente digeridas pela protease de HIV (Tabela V) tal como o clone Cla B que contém um decapeptido invertido como controle.

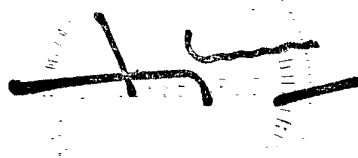
Em contraste, a β -galactosidase/cassete de clivagem codificada por dois clones independentes pZM-Sau é clivada pela protease de HIV de tipo selvagem (linhas 8 e 11), produzindo um produto de clivagem de aproximadamente 10Kd consistente com a clivagem no sítio de inserção SauI localiza-



do a cerca de 80 aminoácidos da extremidade amino. O outro produto de clivagem esperado de aproximadamente 8Kd, não é detectado e talvez seja instável. A incubação da β -galactosidase/cassete de clivagem de pZM-Sau com a protease mutante de HIV (Fig. 6B, linhas 9 e 12) não produz clivagens, indicando que o acontecimento de clivagem é mediado pela protease de HIV e não por uma protease de E. coli.

Para examinar melhor as bases da reduzida actividade de β -galactosidase nos clones de β -galactosidase/cassete de clivagem, a quantidade de β -galactosidase é quantificada por análise "Western" usando anticorpos anti- β -galactosidase. Descobriu-se que a construção pZM-Sau possui bastante menos proteína β -galactosidase se comparada com o pZM1 inicial (Fig. 6B, comparar a intensidade da banda de β -galactosidase na linha 4 com as linhas 7 e 10). Esta diferença é quantificada com mais precisão por análise "Western" de diferentes diluições de células que contêm pZM1 e pZM-Sau e determinou-se que o clone pZM-Sau possui cerca de 10-20 vezes menos proteína β -galactosidase do que o clone inicial pZM1 (dados não mostrados). Deste modo, no caso de pZM-Sau, uma reduzida quantidade de proteína β -galactosidase com, aproximadamente, níveis de actividade enzimática de tipo selvagem, podia ser responsável pela redução de actividade de β -galactosidase observada nas placas com X-gal e no ensaio com ONPG (Tabela V).

A análise "Western" nos outros clones de cassete de clivagem mostrou níveis reduzidos semelhantes de proteína β -galactosidase suficiente para explicar a diminuição de actividade enzimática. As proteínas β -galactosidase não funcionais codificadas por pZM-Dra e pZM-Sst também estão presentes em quantidades reduzidas. Uma vez que a β -galactosidase nativa codificada por pZM1 e as proteínas alteradas β -galactosidase/cassete de clivagem são expressas a partir de vectores idênticos que diferem apenas na inserção da cassete de



clivagem no gene de β -galactosidase, parece que as proteínas de β -galactosidase/cassete de clivagem são menos estáveis do que a proteína nativa.

Noutra experiência, a pepsatina A, um conhecido inibidor da protease de HIV(34), é testada para se saber até que ponto a clivagem da proteína de β -galactosidase/cassete de clivagem de pZM-Sau incubada com a protease de HIV é inibida por este composto. A pepsatina A a 1 μ g/ml inibe completamente a clivagem da β -galactosidase alterada, indicando adicionalmente que a clivagem é devida à protease de HIV (Figura 7).

Os resultados in vitro demonstram que com a exceção da construção pZM-Sau, as proteínas de β -galactosidase/cassete de clivagem, não são clivadas pela protease de HIV. A cassete de clivagem nas proteínas resistentes à protease pode estar inserida no interior das proteínas e deste modo é inacessível à protease num ensaio in vitro. Por esta razão, é útil introduzir a protease de HIV na mesma célula das proteínas de β -galactosidase/cassete de clivagem, para permitir a clivagem in vivo simultaneamente com a tradução.

Para testar a clivagem da β -galactosidase/cassete de clivagem codificada por pZM-Sau in vivo, este gene de β -galactosidase alterado é subclonado nos plasmídeos pl+IQ e pl5-IQ que codificam para a protease de HIV de tipo selvagem e mutante, respectivamente. Especificamente, o gene alterado de β -galactosidase de pZM-Sau é retirado sob a forma de fragmento StuI-BamHI e ligado no sítio BamHI de pl+IQ e pl5-IQ criando os plasmídeos pl+IQSau e pl5-IQSau, respectivamente. Amostras duma estirpe de E. coli MC1061 contendo o plasmídeo pl+IQSau foram depositadas na American Type Culture Collection e foi-lhes dado o número de acesso ATCC68.352.

Com objectivos de comparação, as regiões de β -galactosidase/cassete de clivagem de pZM-Bss, pZM-Cla A e pZM-Eco também são subclonadas em pl+IQ. A β -galactosidase alterada produzida por pZM-Cla B é usada como controle. Uma vez que pZM-Dra e pZM-Sst produzem β -galactosidase não funcional, não serão considerados adiante.

A proteína total de células contendo estes plasmídeos resultantes pl+IQSau e pl5-IQSau é sujeita a electroforese através de SDS-PAGE e a clivagem da β -galactosidase é verificada por análise "Western" (Fig.8). Esta β -galactosidase/cassete de clivagem é clivada in vivo pela protease de HIV de tipo selvagem (painel A, linha 1 e painel B, linha 2) mas não pela protease mutante (painel B, linha 3), gerando um produto de clivagem do mesmo tamanho dos observados in vitro (Fig. 6B, linhas 8 e 11). Estima-se que aproximadamente 50-75% da proteína de β -galactosidase/cassete de clivagem é clivada. Estes ensaios de clivagem são feitos em culturas líquidas. A quantidade de clivagem que ocorre em colónias não é quantificada directamente mas, os E.coli MC1061 contendo pl+IQSau são brancos em placas com X-gal ao passo que as que contêm pl5-IQSau conferem cor azul. Estes dados são consistentes com a clivagem da β -galactosidase/cassete de clivagem pela protease de HIV de tipo selvagem mas não pela protease mutante.

A protease de HIV não cliva nenhuma destas outras proteínas de β -galactosidase/cassete de clivagem in vivo e que são resistentes à protease in vitro (Fig. 8A, linhas 2-5 e Tabela V). Como esperado, as células que contêm pl+IQBss, pl+IQCla A, pl+IQCla B, ou pl+IQEco são azuis em placas com X-gal, o que é consistente com a ausência de clivagem pela protease de HIV.

Os resultados de outro ensaio de clivagem de protease de HIV in vivo estão apresentados na fotografia da Figura 9. Amostras da estirpe de E. coli MC1061 contendo diversos plasmídeos são colocadas em placas que contêm o indicador de cor X-gal. Os plasmídeos são o pZM-1 (um controle positivo da actividade de β -galactosidase), o pZM-2 (um controle negativo da actividade de β -galactosidase), pZM-Sau, pl+IQSau (pl+IQB-Sau marcado) e pl5-IQSau (pl5-IQB-Sau marcado). No ensaio de clivagem com protease de HIV de tipo selvagem, as construções que clivam β -galactosidase produzem uma cor branca, e as construções que não clivam a β -galactosidase produzem uma cor azul. O plasmídeo pZM-2 codifica para β -galactosidase inactiva, mutante e, deste modo produz colónias brancas. O plasmídeo pZM-2 é construído por digestão do plasmídeo pZM-1 com EcoRI e BamHI para retirar a sequência de DNA que codifica para os 18 aminoácidos da extremidade carboxi de β -galactosidase. Como esperado, o pZM-1 produz uma cor azul tal como os pZMSau e pl5-IQSau. O plasmídeo pZM-2, como controle negativo, produz uma cor branca. A β -galactosidase produzida por pl+IQSau é clivada pela protease e produz uma cor branca.

A proteína β -galactosidase que foi modificada por inserção de uma cassette de clivagem de protease viral, pode ser usada num teste para identificar inibidores dessa protease ou de qualquer outra protease cuja sequência de clivagem seja conhecida e possa ser introduzida no sítio Sau I de β -galactosidase.

O plasmídeo pl+IQSau numa estirpe de E. coli apropriada, tal como a BAS849(41) (que possui uma mutação na membrana externa, tornando-a mais permeável a diversos compostos) é plaqueado uniformemente numa placa de agar. Em alternativa, pode ser usada uma cultura líquida como meio nutritivo. A placa deve conter IPTG suficiente para induzir a síntese de protease de HIV, clivando a β -galactosidase e tor-

nando a placa descolorida quando ensaiada com indicadores de cor de β -galactosidase, tal como o X-gal (40), Fast Blue RR (42) ou outros. Possíveis inibidores de protease são colocados na placa a qual é posteriormente coberta com o indicador.

Um inibidor de protease inativará a protease, evitando a clivagem da β -galactosidase. A β -galactosidase reage então com o indicador, tornando as placas coloridas (azul no caso de X-gal, vermelho no caso de Fast Blue RR). Desta forma são identificados inibidores de protease.

Um teste semelhante pode ser usado quando uma reacção emissora de luz é verificada em vez duma mudança de cor. A cassette de clivagem é inserida numa proteína tal como a luciferase (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) em vez da β -galactosidase. Na ausência duma enzima proteolítica, a proteína luciferase/cassete de clivagem cataliza uma reacção química emissora de luz. Na presença de luciferina e ATP, é formado um complexo de enzima ligada a luciferil-adenilato, o qual é seguido de descarboxilação oxidativa. Os produtos da reacção são CO_2 , oxiluciferina e AMP juntamente com a emissão de luz. A emissão de luz pode ser observada a olho nu, medida espectrofotometricamente ou gravada numa película de raios X.

Quando uma enzima proteolítica está presente, cliva no sítio de clivagem de enzima proteolítica, bloqueando deste modo a reacção catalizada pela luciferase de tal forma que não é emitida luz. Num teste de inibidores de proteases, um composto a testar é incluído no sistema de ensaio. Se o composto evita a clivagem pela protease, a reacção prossegue e é emitida luz, identificando desta maneira o composto como inibidor da protease.

Como descrito acima, quer na reacção indicadora de cor quer na emissora de luz em ensaios in vivo,

o sistema de expressão contém genes que codificam para a proteína β -galactosidase/cassete de clivagem e para a protease de HIV. O sistema de expressão exprime ambas as proteínas usadas no sistema de ensaio. A proteína β -galactosidase/cassete de clivagem também pode ser ensaiada directamente num tubo de ensaio. Neste ensaio in vitro o sistema de expressão contém apenas o gene que codifica para a proteína β -galactosidase/cassete de clivagem. A protease de HIV é gerada separadamente e deixada separada da proteína de fusão até ao início do ensaio. Nesta altura a proteína purificada β -galactosidase/cassete de clivagem é misturada com a protease de HIV e um inibidor potencial de protease em solução. A actividade de β -galactosidase é verificada por hidrólise de ONPG usando um espectrofotometro. Um inibidor de protease aumentará a actividade de β -galactosidase em relação à observada numa experiência controle apenas com a proteína de fusão e a protease de HIV.

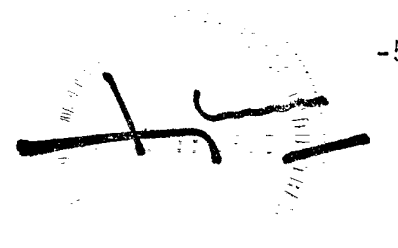
Os testes seguintes da segunda parte desta invenção também podem ser usados para testar inibidores de outras proteases, tal como a protease de polio 3C. Em primeiro lugar, é construída a proteína β -galactosidase/cassete de clivagem. Por exemplo, um oligonucleotido que codifica para o sitio de clivagem de protease de polio 3C Met-Glu-Ala-Leu-Fen-Gln-Gli-Pro-Leu-Gln-Tir-Lis-Asp(43) é inserido, em grelha, no sitio SauI de β -galactosidase, criando o pZM3CSau. As células que contêm este plasmídeo são azuis o que é compatível com os resultados de pZM-Sau que contém a cassete de clivagem de protease de HIV(Tabela V). Estes dados indicam ainda que o sitio SauI é um sitio apropriado para a inserção de sequências proteicas heterólogas sem destruir a actividade de β -galactosidase.



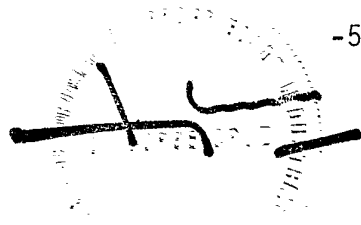
Como mostra a Figura 10, esta proteina de fusão é clivada pela protease de polio 3C (linha 5), a qual é expressa em BL21(DE3)pLysS duma forma semelhante à descrita por Nicklin et al. (44), mas não pela protease de HIV (linha 6), como é de esperar. Esta construção pode então ser usada para testar inibidores de protease de polio 3C, usando os métodos descritos previamente.

Bibliografia

1. T. Imai, et al., J. Biochem., 100, 425-432 (1986).
2. D. W. Cox and H. Levison, Am. Rev. Respir. Dis., 137, 371-375 (1988).
3. R. J. Albin, et al., Am. Rev. Respir. Dis., 135, 1281-1285 (1987)
4. L. Ratner, et al., Nature, 313, 277-284 (1985).
5. S. F. J. Le Grice, et al., EMBO, 7, 2547-2553 (1988).
6. N. E. Kohl, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 4686-4690 (1988).
7. W. G. Farmerie, et al., Science, 236, 305-308 (1987); C. Debouck, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 8903-8906 (1987); M. C. Graves, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 2449-2453 (1988).
8. L. H. Pearl and W. R. Taylor, Nature, 329, 351-354 (1987).
9. S. Seelmeier, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 6612-6616 (1988).
10. M. A. Navia, et al., Nature, 337, 615-620 (1989).
11. S. Billich, et al., J. Biol. Chem., 263, 17905-17908 (1988).
12. M. L. Moore, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 159, 420-425 (1989).
13. J. J. Blumenstein, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 980-987 (1989).
14. G. B. Dreyer, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 9752-9756 (1989).

- 
15. H. Krausslich, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 807-811 (1989).
 16. P. L. Darke, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 156, 297-303 (1988).
 17. E. D. Matayoshi, et al., Science, 247, 954-958 (1990).
 18. A. Billich, et al., J. Biol. Chem., 371, 265-272 (1990).
 19. S. J. Plotch, O. Palant, Y. Gluzman, J. Virol., 63, 216-225 (1989).
 20. T. Maniatis, et al., Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pages 86-94, 250-251, 348 (1982).
 21. F. W. Studier and B. A. Moffatt, J. Mol. Biol., 189, 113-130 (1986).
 22. B. A. Moffatt and F. W. Studier, Cell, 49, 221-227 (1987).
 23. R. G. Fowler, et al., Molec. gen. Genet., 133, 179-191 (1974).
 24. T. D. Meek, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 1841-1845 (1989).
 25. D. D. Loeb, et al., J. Virol., 63, 111-121 (1989).
 26. H. Krausslich, et al., J. Virol., 62, 4393-4397 (1988).
 27. J. Hansen, et al., EMBO, 7, 1785-1791 (1988).
 28. R. F. Schleif and P.C. Wensink, Practical Methods in Molecular Biology, Springer-Verlag, New York, pages 19-20 (1981).
 29. L. Caro, et al., Methods in Microbiology, 17, P.M. Bennett & J. Grinsted, eds., Academic Press, New York, pages 114-122 (1984).
 30. P. L. Darke, et al., J. Biol. Chem., 264, 2307-2312 (1989).

- 
31. S. Van Der Werf, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 2330-2334 (1986).
 32. F. Jacob and J. Monod, J. Mol. Biol., 8, 318-356 (1961).
 33. T. J. Silhavy, et al., "Experiments with Gene Fusions", Cold Spring Harbor, N.Y. (1984).
 34. M. Koenen, et al., EMBO J., 1, 509-512 (1982).
 35. U. Ruther and B. Muller-Hill, EMBO J., 2, 1791-1794 (1983).
 36. J. Germino and D. Bastia, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 4692-4696 (1984).
 37. S. Scholtissek and F. Grosse, Gene, 62, 55-64 (1988).
 38. C. Yanisch-Perron, et al., Gene, 33, 103-119 (1985).
 39. D. M. Rothstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 7372-7376 (1980).
 40. J. Miller, "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor, N.Y. (1972).
 41. B. A. Sampson, et al., Genetics, 122, 491-501 (1989).
 42. R. K. Elespuru and M. B. Yarmolinsky, Environmental Mutagenesis, 1, 65-78 (1979).
 43. P. V. Pallai, et al., J. Biol. Chem., 264, 9738-9741 (1989).
 44. M. J. H. Nicklin, et al., J. Virol., 62, 4586-4593 (1988).



R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1ª. - Método para selecção de compostos que inibem enzimas proteolíticas, caracterizado por compreender os seguintes passos:

a) construção de um plasmideo que possui uma sequência de DNA que codifica uma protease, sob o controlo de um promotor de T7.

b) selecção de uma estirpe bacteriana de expressão, o qual não é transformada pelo referido plasmideo devido à toxicidade da protease relativamente à estirpe bacteriana e,

c) adição de um composto a seleccionar juntamente com o plasmideo, à estirpe bacteriana de tal modo que, se a estirpe bacteriana não é morta e produz transformantes, o composto é identificado como sendo um inibidor da protease.

2ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a estirpe bacteriana ser a E. coli BL21 (DE3) e o plasmideo possuir uma sequência de DNA que codifica a protease do vírus da imunodeficiência humana.

3ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o plasmideo ser pPolio protease 3C e possuir uma sequência de DNA que codifica a protease de polio 3C.

4ª. - Método para selecção de compostos que inibem a protease do vírus de imunodeficiência humana, caracterizado por compreender os seguintes passos:

a) construção de um plasmideo que possui uma sequência de DNA que codifica uma protease do virus da imunodeficiência humana, sob o controlo de um promotor de T7;

b) selecção de uma estirpe bacteriana transformada pelo referido plasmideo, a qual não é morta pela indução da síntese de protease pelo agente indutor isopropil- β -D-tiogalactopirónósido; e

c) adição de um composto a seleccionar juntamente com isopropil- β -D-tiogalactopirónósido à estirpe bacteriana transformada de tal modo que, se as células induzidas não são mortas, o composto é identificado como sendo um inibidor da protease do virus da imunodeficiência humana.

5ª. - Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por a estirpe bacteriana ser a E. coli 3L21(DE3)pLysS.

6ª. - Método para prevenir a expressão da protease de 10kd do virus da imunodeficiência humana, enzimaticamente activa, caracterizada por compreender:
a) a introdução duma mutação na sequência de DNA que codifica o precursor de 18kd da protease de 10kd, evitando desta forma a autodigestão do precursor o qual doutro modo daria origem à protease madura, enzimaticamente activa, de 10kd; ou b) a introdução duma mutação na sequência de DNA que codifica a protease de 10kd.

7ª. - Método de produção da protease de 10kd, não funcional, do virus da imunodeficiência humana, caracterizado por compreender a modificação da sequência de DNA que codifica o precursor da protease de 18kd, da protease de 10kd, de tal modo que se quebre a ligação FEN-PRO, localizada nos aminoácidos-1 a 1 da protease de 10kd madura.

8ª. - Método para a selecção de compostos que inibem enzimas proteolíticas, caracterizado por compreender os seguintes passos:

(I) a) selecção de uma proteína sinalizante a qual é capaz de ser tratada por reacção com um composto indicador de cor de forma a produzir uma modificação de cor;

b) inserção no gene que codifica a referida proteína de uma sequência de DNA heteróloga que codifica um peptídeo, a qual inclui um sítio de clivagem de uma enzima proteolítica;

c) inserção num sistema de expressão apropriado do produto construído no passo b) e dum gene que codifica a enzima proteolítica o qual reconhece e cliva o sítio de clivagem da enzima proteolítica do peptídeo codificado pela sequência de DNA heteróloga do passo b);

d) preparação de um sistema de análise que compreende:

- i) o sistema de expressão do passo c);
- ii) um composto indicador de cor; e
- iii) um meio nutriente; e

e) a adição dum composto a seleccionar no sistema de ensaio, de tal modo que se o composto inibe a enzima proteolítica, o sistema de expressão produz o produto intacto do passo b), a proteína sinalizante retém a sua actividade e a cor é mantida no sistema de ensaio, mas se o composto não for inibidor, a protease cliva no sítio de clivagem da enzima proteolítica do peptídeo do passo b), a proteína sinalizante é inactivada e não é observada nenhuma cor no sistema de ensaio; ou

(II) a) selecção duma proteína sinalizante capaz de catalizar uma reacção química emissora de luz;

b) inserção no gene que codifica a referida proteína sinalizante de uma sequência de DNA heteróloga que codifica para um peptídeo que inclui um sítio de clivagem da enzima proteolítica;

c) inserção num sistema de expressão apropriado do produto do passo b) e dum gene que codifica a enzima proteolítica a qual reconhece e cliva o sítio de clivagem de enzima proteolítica do peptídeo codificado pela sequência heteróloga de DNA do passo b);

d) preparação dum sistema de análise que inclui:

i) o sistema de expressão do passo c);

ii) um composto que sofre uma reacção química emissora de luz catalisada pela proteína sinalizante do passo a); e

e) adição dum composto a seleccionar ao sistema de ensaio, de tal forma que se o composto inibe a enzima proteolítica, o sistema de expressão produz um produto intacto do passo b), a proteína sinalizante retém a sua actividade catalítica e ocorre uma reacção química emissora de luz, mas se o composto não for inibidor, a protease cliva o sítio de clivagem de enzima proteolítica do peptídeo do passo b), a proteína sinalizante é inactividade e a reacção química emissora de luz não ocorre.

9ª. - Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por em I) a proteína sinalizante do passo a) ser a β -galactosidase, em II) a proteína sinalizante do passo a) ser a luciferase; e quer em I) quer em II) o sítio de clivagem da protease do passo b) ser o sítio de clivagem da poliproteína gag/pol p6/PR do vírus da imunode-

ficiência humana, o sistema de expressão do passo c) incluir uma estirpe hospedeira de E. coli ea enzima proteolitica do passo d) (i) ser a protease do virus da imunodeficiência humana.

10ª. - Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por quer em I) quer em II) o sitio de clivagem da protease do passo b) ser o sitio de clivagem da protease de polio 3C e a enzima proteolitica do passo d) i) ser a protease de polio 3C.

11ª. - Método para selecção de compostos que inibem enzimas proteoliticas, caracterizado por compreender os seguintes passos:

a) selecção de uma proteina sinalizante cuja actividade é capaz de ser monitorizada por reacção com um substrato;

b) inserção no gene que codifica a referida proteina sinalizante duma sequencia de DNA heteróloga que codifica um peptideo que inclui um sitio de clivagem de enzima proteolitica;

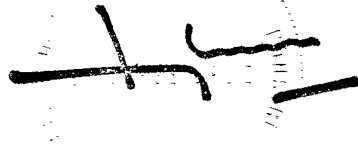
c) inserção num sistema de expressão apropriado do produto do passo b);

d) preparação dum sistema de análise que compreende:

i) uma enzima proteolitica que reconhece e cliva o sitio de clivagem da enzima proteolitica do peptideo codificado pela sequencia de DNA heteróloga do passo b);

ii) o sistema de expressão do passo e) que arque o produto do passo b); e

iii) um substrato que reage com a proteina sinalizante do



passo a); e

e) a adição dum composto a seleccionar ao sistema de análise de tal modo que, se o composto inibe a enzima proteolítica, o sistema de expressão produz um produto intacto do passo b) e a proteína sinalizante retém a sua actividade, a qual é detectada por reacção com o substrato, mas se o composto não for um inibidor, a protease cliva no sitio de clivagem de enzima proteolítica do peptideo do passo b) e a proteína sinalizante é inactivada.

12ª. - Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por a proteína do passo a) ser a β -galactosidade, o sitio de clivagem da protease do passo b) ser o sitio de clivagem da poliproteína p6/PR do vírus da imunodeficiência humana, o sistema de expressão do passo c) incluir uma estirpe hospedeira de E. coli, a enzima proteolítica do passo d) (i) ser a protease do vírus da imunodeficiência humana e o substrato do passo d) (iii) ser O-nitrofenil- β -D-galactosido.

13ª. - Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por o sitio de clivagem da protease do passo b) ser o sitio de clivagem de protease de polio 3C e a enzima proteolítica do passo d) (i) ser a protease de polio 3C.

14ª. - Plasmideo caracterizado por ser seleccionado de entre o grupo constituido pelos plasmideos designados por pPDB16, pMae2, pl+IQSau e pZM3CSau.

15ª. - Estirpe bacteriana que alberga um plasmideo, caracterizada por ser seleccionada de entre o grupo constituido por E coli DH5 α que alberga o plas-

mideo pPDB16 (ATCC 68005), E. coli BL21(DE3) que alberga o plasmideo pP48 (ATCC 68004) e E. coli MC1061 que alberga o plasmideo pl+IQSau.

Lisboa, 5 de Setembro de 1990



J. PEREIRA DA CRUZ

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

500
99
Phe

204
-1, +1
Phe Pro

1
-69
Met

pPDB16



pMae2

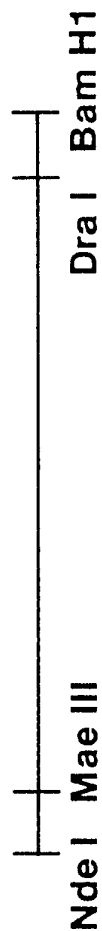


FIG. 1



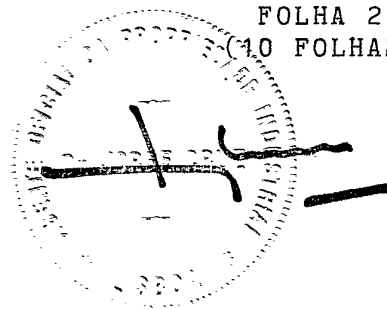
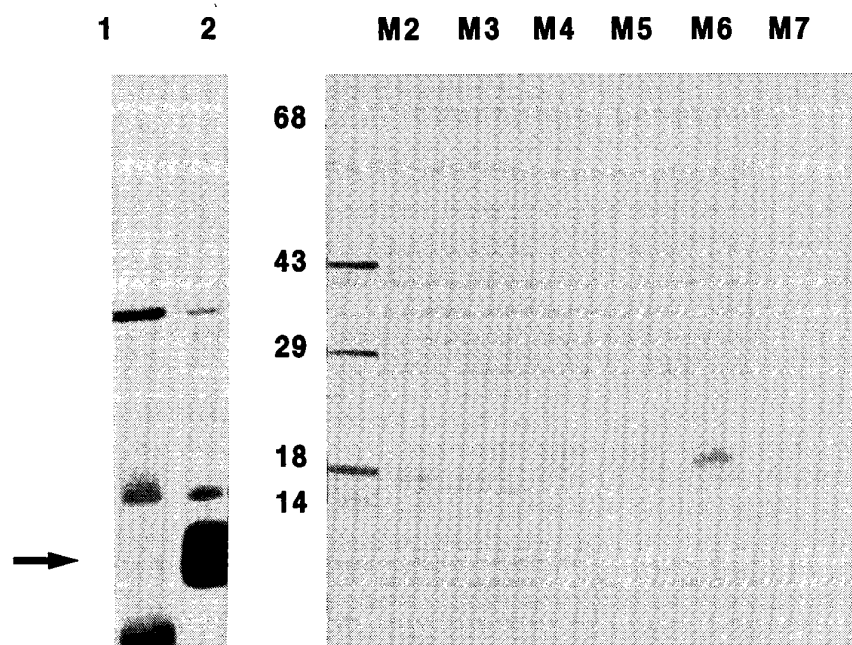


FIG. 2A

FIG. 2B



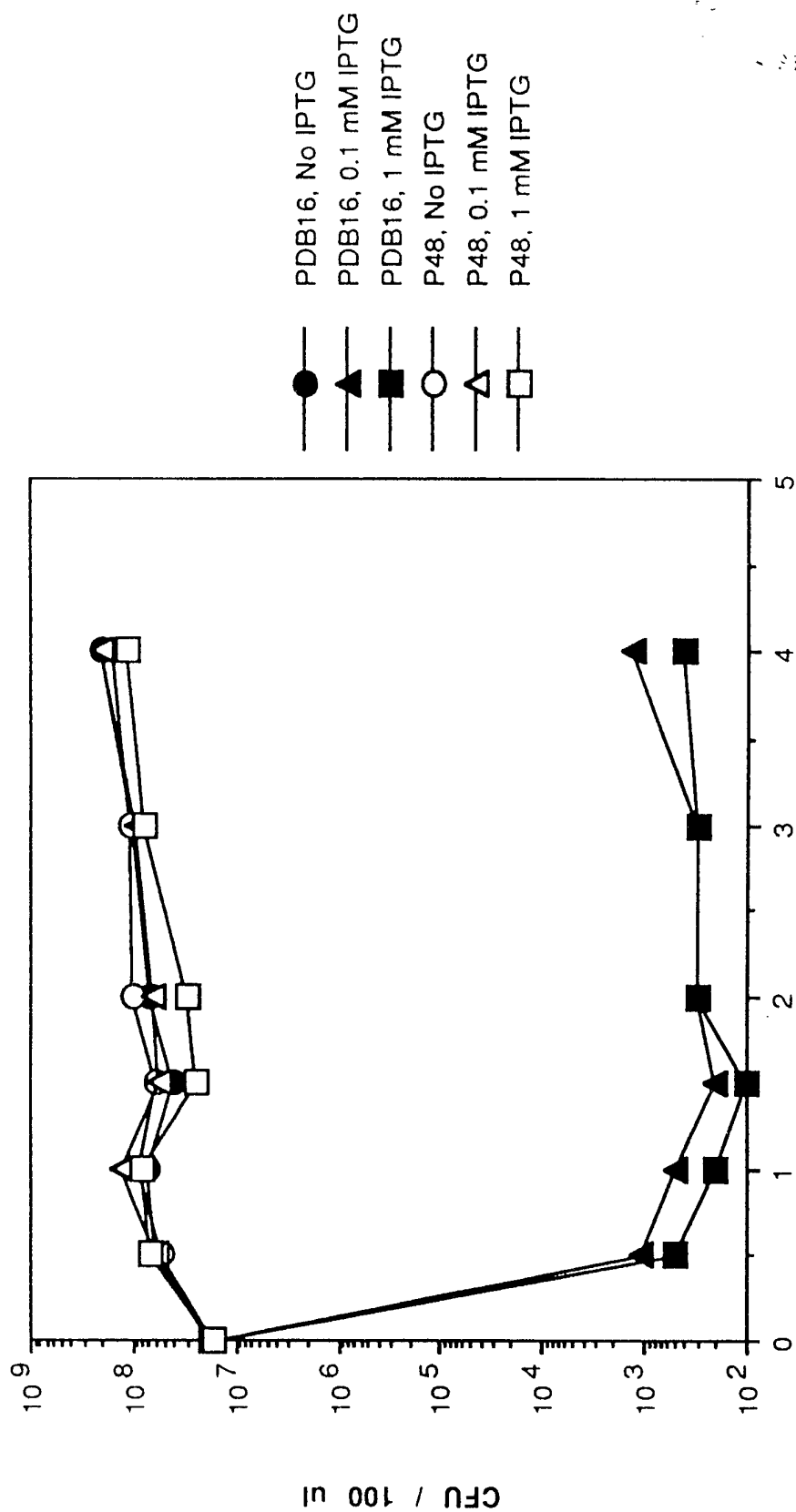


FIG. 3

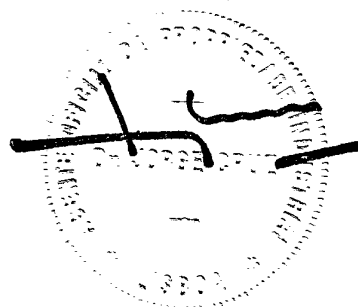
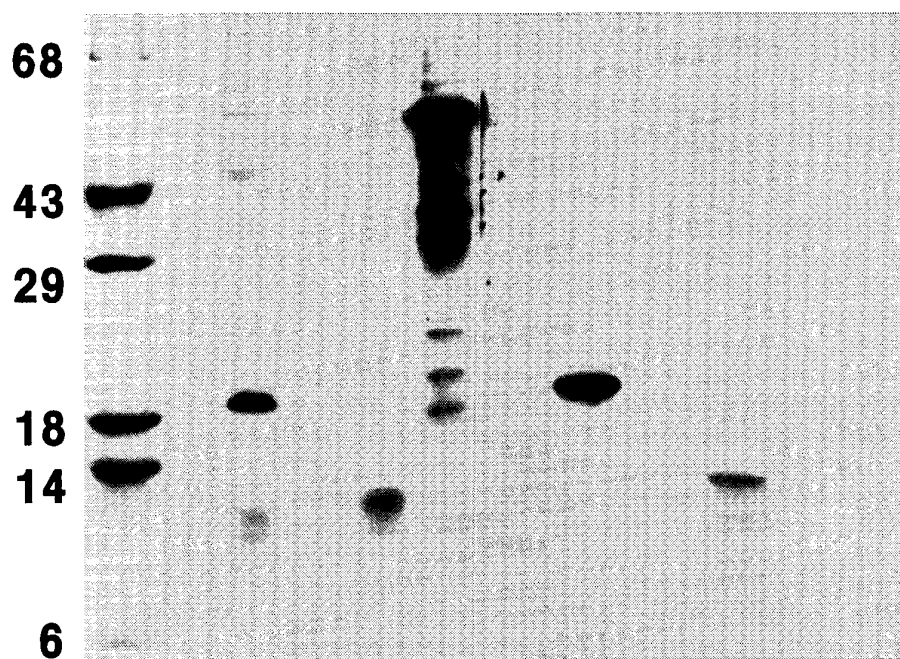


FIG. 4

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



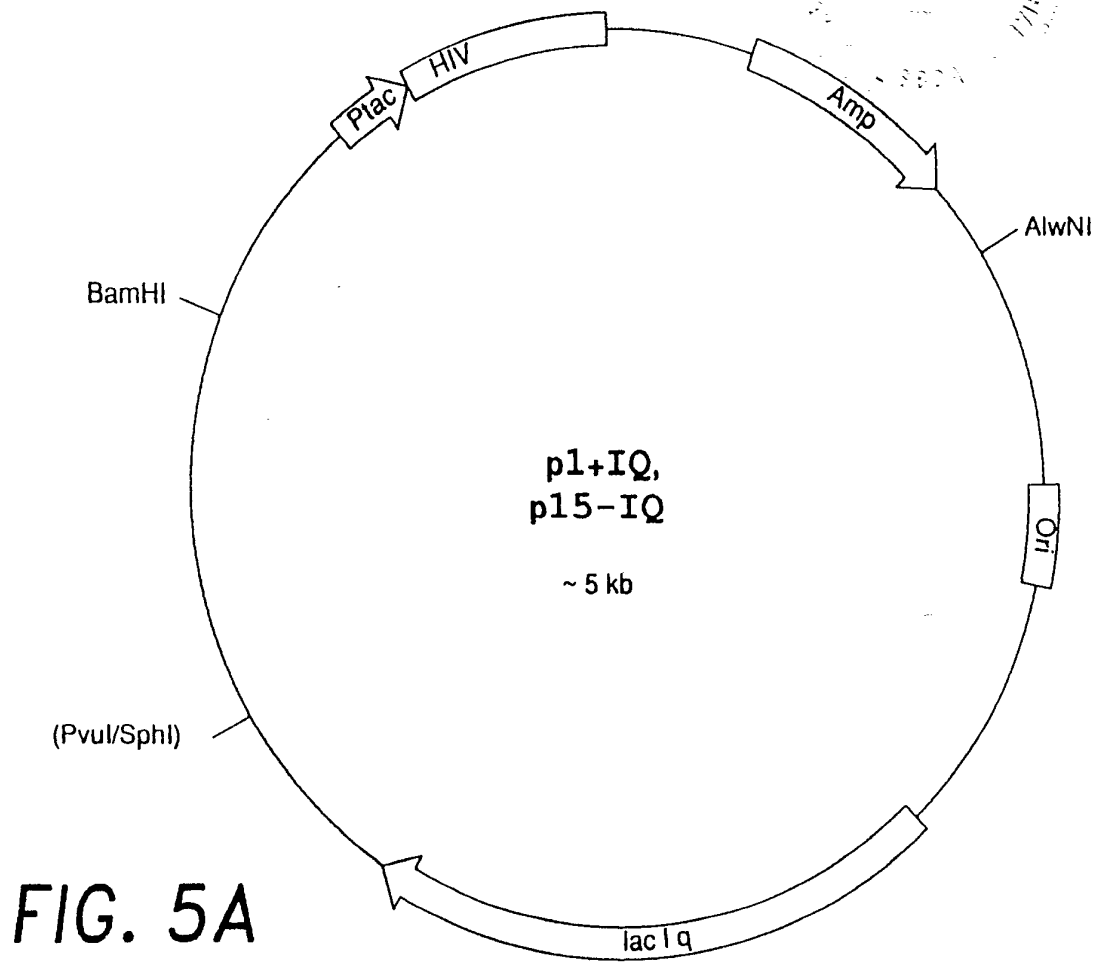
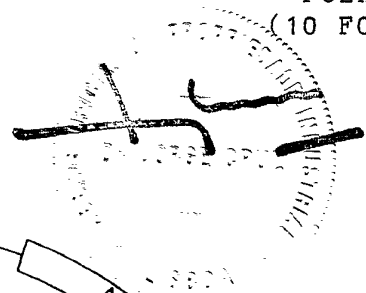


FIG. 5B

	SauI	Clal	DraIII	BssHII	SstI	EcoRI
nt	239	839	1205	1516	1905	3019
aa	80	280	402	504	652	1006

β -
1023 a.a.

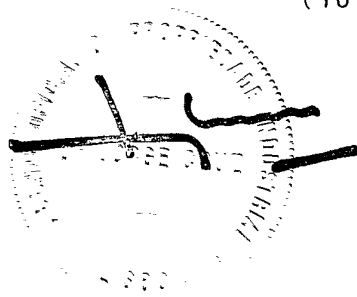


FIG. 6A

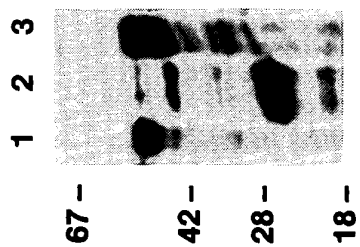


FIG. 6B



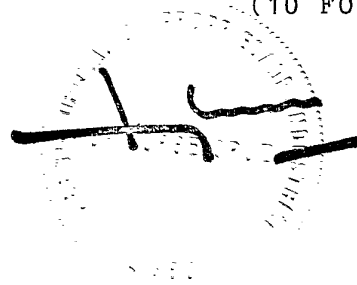
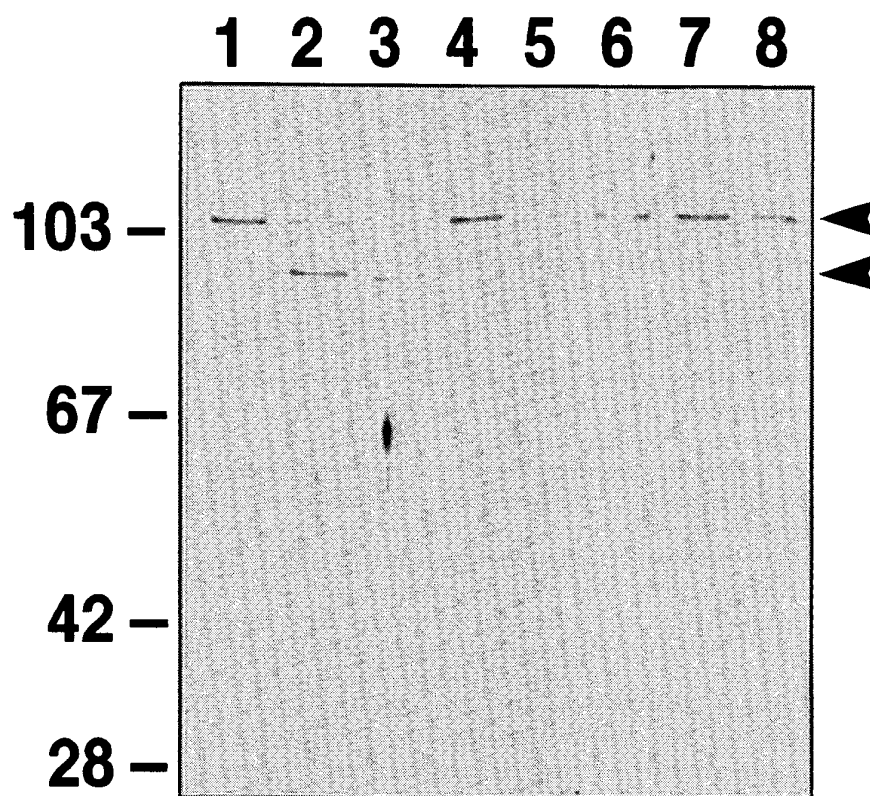


FIG. 7



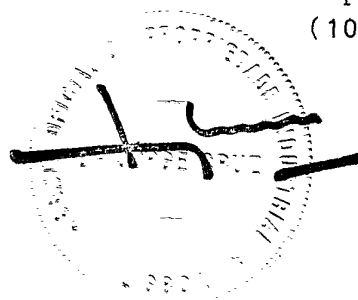


FIG. 8A

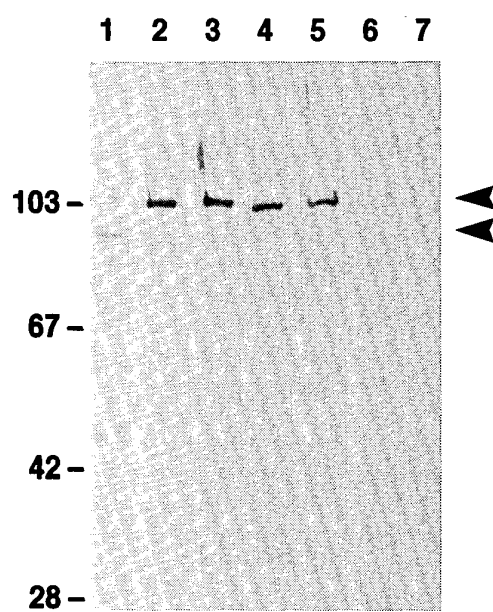
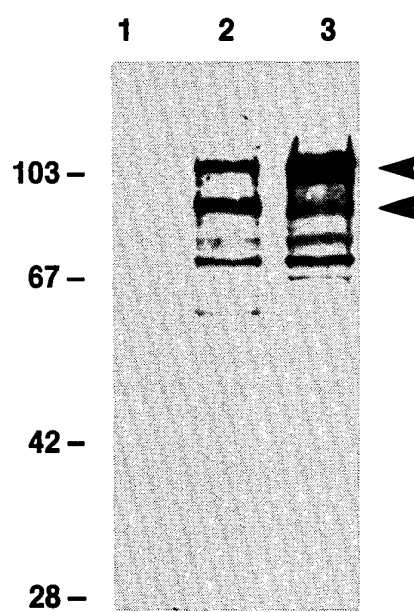


FIG. 8B



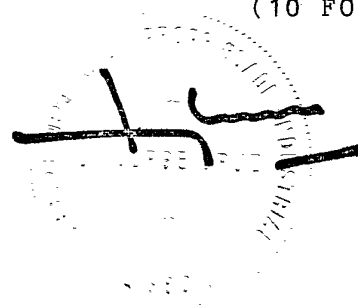
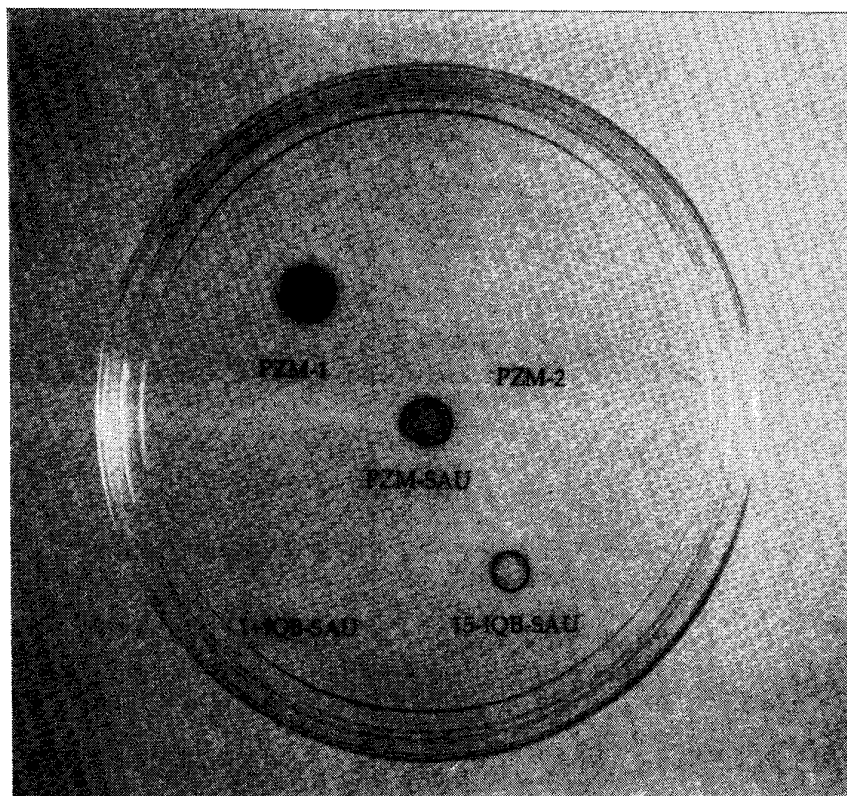


FIG. 9



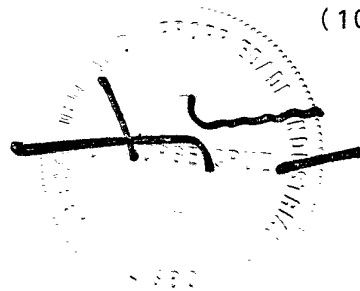


FIG.10

