

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 85 093

REQUERENTE: TRANSGENE S.A., Société Anonyme, francesa, com sede em 16 rue Henri Regnault, 92400 Courbevoie França e INSTITUT PASTEUR, instituto nacional francês, com sede em 25 rue du Docteur-Roux, 75015 Paris, França.

EPÍGRAFE: "VECTOR VIRAL E PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ADN RECOMBINANTE CODIFICADO PARA A PROTEÍNA F DO VIRUS AGENTE CAUSADOR DA S.I.D.A.".

INVENTORES:

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883. França em 16 de Junho de 1986, sob o nº 86 08698

al

Patente Nº 85093

1

- R E S U M O -

5

"VECTOR VIRAL E PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ADN RECOMBINANTE CODIFICANDO PARA A PROTEÍNA F DO VIRUS AGENTE CAUSADOR DA S.I.D.A."

10

Na presente invenção descreve-se um vector viral caracterizado por compreender pelo menos:

15

- . uma parte do genoma de um vírus.
- . um gene codificando para a proteína F do vírus responsável pela SIDA,
- . assim como os elementos que asseguram a expressão desta proteína nas células.

20

Este vector viral pode ser utilizado a título de vacina no tratamento, na prevenção e no diagnóstico da SIDA.

25

30

35

1

Descrição do objecto do invento
que

5

10

15

TRANSGENE S.A., Société Anonyme,
francesa, industrial, com sede em
16 rue Henri Regnault, 92400 COUR-
BEVOIE, França; e INSTITUT PASTEUR,
Instituto nacional francês, com se-
de em 25 rue du Docteur- Roux,
75015, PARIS, França, pretendem obter
em Portugal, para: "VECTOR VIRAL E
PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ADN
RECOMBINANTE CODIFICANDO PARA A PRO-
TEINA F DO VIRUS AGENTE CAUSADOR DA
S.I.D.A."

20

O presente invento refere-se mais particularmente ao
processo de preparação de uma vacina destinada à preven-
ção de SIDA.

25

A síndrome da imuno-deficiência adquirida (SIDA) é
uma afecção viral que apresenta de momento uma maior im-
portância na América do Norte, na Europa e na África cen-
tral.

30

As estimativas recentes sugerem que cerca de 1 milhão
de americanos podem ter sido expostos ao vírus da SIDA.
Os indivíduos afectados apresentam uma imuno-depressão
grave e a doença é, em geral, fatal.

35

A transmissão da doença efectua-se na maioria dos ca-
sos por contacto sexual, se bem que as pessoas que utili-
zam estupefacientes por via intravenosa representem igual-
mente um grupo com elevado risco; por outro lado têm si-
do infectados por este vírus um grande número de indiví-

16 JUN 1987



1 duos depois de terem recebido sangue ou produtos sanguíneos contaminados.

5 O agente causador desta afecção é um retrovirus. Numerosas afecções animais têm sido atribuídas aos retrovirus mas, acontecem apenas recentemente que puderam ser descritos os retrovirus que afectam o homem.

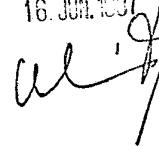
10 Enquanto os retrovirus das células T humanas (HTLV : human T leukemia virus) dos tipos I e II têm estado implicados como agente causador de certas leucemias das células T nos adultos, o retrovirus associado a linfadenopatias (vírus LAV), que é igualmente denominado vírus HTLV III ou vírus relacionado A.I.D.S. (ARV), é agora correntemente aceite como o agente responsável pela SIDA.

15 O genoma de vários isolados do retrovirus LAV ou HTLV III foi caracterizado de maneira muito completa (Wain-Hobson et al. 1985; Ratner et al. 1985; Muesing et al. 1985; Sanchez-pescador et al. 1985) e informações sobre a sequência genómica indicam uma relação estreita com o grupo dos lentivirus. Os lentivirus, cujo protótipo é o vírus ovin Visna, são os agentes de doenças com progressão muito lenta e que apresentam tipicamente um período de incubação prolongada. O LAV e o vírus Visna partilham numerosas semelhanças, em particular no seu tropismo para o tecido neural.

25 Além das três partes de genoma encontradas em todos os retrovirus e designadas por gag, pol e env, o vírus LAV compreende pelo menos três outros genes denominados Q ou Ser TAT e F ou 3'orf (Wain-Obson et al. 1985; Arya et al. 1986). O produto do gene F foi caracterizado por reacção com soros de doentes atacados de SIDA e a identidade da proteína confirmada por um processo de sequência directa dos ácidos aminados (Allan et al 1985).

35 Segundo os autores, a proteína F é reconhecida por 30 a 90% dos soros de doentes. Esta proteína migra sobre um

16 JUN 1987



1 gel de acrilamida SDS segundo um peso molecular aparente
compreendido entre 26 e 28 KD. Certos autores puseram em
evidência um produto do gene F compreendido entre 24 e 25
5 KD, evocando a possibilidade de uma iniciação da tradução
ao segundo ATG.

A proteína F não é glicosilada, se bem estejam presen-
tes dois locais potenciais de N-glicosilação. Finalmente,
foi demonstrado que a proteína F é acilada pelo ácido mi-
10 rístico. Existe na proteína F um tetrapéptido (arg - Phe
- asp - Ser), encontrado em algumas proteínas que inter-
vêm na adesão celular, e igualmente numa cadeia do anti-
gene HLA de classe II.

Auffray, (Auffray, 1986) evocou a possibilidade da
15 proteína F desempenhar um papel no reconhecimento e liga-
ção da proteína env e do vírus LAV linfócitos T4, contri-
buindo assim para a disseminação do vírus. Além disso,
a variabilidade elevada (2 a 17%) da proteína F de uma ca-
mada para a outra, variabilidade comparável à da glicopro-
20 teína de envolvimento, deixa pensar que a proteína F de-
sempenha efectivamente um papel na infecção (Ratner et al.
1985).

O presente invento propõe utilizar como vector de ex-
pressão da proteína F um vector viral que permite a ex-
25 pressão da proteína num ambiente que permitirá a sua re-
estruturação pós-tradução.

É por este facto que o presente invento se refere a
um vector viral, caracterizado por compreender o gene F
30 do vírus responsável pela SIDA.

Entre os vectores virais utilizáveis, devem citar-se
mais particularmente os poxvirus e, designadamente, o ví-
rus da vacina (VV).

O vírus da vacina é um vírus com ADN de haste dupla
35 que foi utilizado muito largamente em todo o mundo para
controlar e eliminar a varíola. Avanços técnicos recen-

16. JUN. 1987

al. 9

tes permitiram o desenvolvimento deste vírus como vector de clonagem e os vírus recombinantes vivos permitiram exprimir antígenos estranhos e mesmo obter imunizações contra diferentes doenças virais ou parasitárias.

Assim, vários grupos puseram recentemente em evidência a utilização de recombinantes deste tipo para exprimir o antígeno da enxaqueca, da hepatite B e a glicoproteína da raiva para imunizar contra estas doenças (Smith et al. 1983; Panicali et al. 1983; Kiney et al. 1984).

A expressão de uma sequência codificando para uma proteína estranha pelo vírus da vacína (VV) implica necessariamente duas etapas:

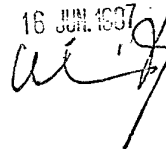
- 1ª.) a sequência codificando deve ser alinhada com um promotor de VV e ser inserida num segmento não essencial do ADN de VV, clonado num plasmídeo bacteriano apropriado;
- 2ª.) as sequências de ADN de VV situadas de um lado e do outro da sequência codificando devem permitir recombinações homólogas in vivo entre o plasmídeo e o genoma viral; uma dupla recombinação recíproca conduz a uma transferência do enxerto de ADN do plasmídeo no genoma viral no qual se propaga e exprime (Panicali e Paoletti, 1982; Smith et al. 1983; Panicali et al. 1983).

Bem entendido que a utilização deste tipo de vector implica muitas vezes uma deleção parcial do genoma do vírus vector.

O presente invento refere-se mais particularmente a um vector viral caracterizado por compreender pelo menos:

- uma parte do genoma de um vírus vector,
- um gene codificando para a proteína T do vírus responsável pela SIDA,
- assim como os elementos que asseguram a expressão desta proteína nas células.

16 JUN 1987



1 O invento refere-se igualmente aos ADN recombinantes que correspondem aos referidos vectores virosos.

5 Por "vírus responsável pela SIDA", pretende-se designar nomeadamente o vírus LAV, o vírus HTLV III ou ARV, do mesmo modo que eventuais mutantes pontuais ou deleções parciais destes vírus, assim como os vírus aparentados.

10 Os vectores virosos, na parte que corresponde ao genoma do vírus vector (distinto do vírus responsável pela SIDA), podem ser constituídos a partir do genoma de um vírus de qualquer origem. Todavia, será preferível utilizar uma parte do genoma de um poxvirus e mais particularmente uma parte do genoma da vacina.

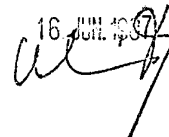
15 As condições necessárias para a expressão de uma proteína heteróloga no vírus da vacina foram lembradas anteriormente.

20 De um modo geral, o gene em causa, por exemplo o gene F, deverá, para se poder exprimir, estar sob a dependência de um promotor de um gene da vacina e este promotor será em geral o promotor da proteína 7,5k da vacina. Por outro lado, a sequência que codifica deverá ser clonada num gene não essencial da vacina que poderá eventualmente servir de gene marcador. Na maior parte dos casos, 25 tratar-se-à do gene TK.

30 A proteína F nativa não possui o sinal de excreção e não é glicosilada. Propõe-se aqui modificações deste gene para melhorar a imunogenicidade do produto de expressão.

35 Propõe-se modificar o gene F de modo a assegurar a sua excreção para fora da célula e, por outro lado, para uma terceira construção, a assegurar a fixação da proteína na membrana.

Para este efeito, o gene poderá ser modificado ao ní-



1 vel da sua parte que codifica pela extremidade NH_2 termi-
nal da proteína adicionando uma sequência sinal que pro-
vêm de um vírus heterólogo, por exemplo a sequência sinal
5 da glicoproteína do vírus rábico. Isto permitirá a excre-
ção da proteína para fora da célula.

Bem entendido que se pode utilizar uma sequência si-
nal proveniente de outras proteínas virais.

10 Finalmente, pode ser interessante para a imunogeneci-
dade da proteína que esta seja fixa na membrana celular e
assim correctamente apresentada ao sistema imunitário do
hospedeiro. É por isso que é proposto, a partir da cons-
trução precedente (F + sinal de raiva), adicionar ao ní-
vel da parte codificando para a extremidade COOH terminal
15 da proteína F uma sequência codificando para a porção
transmembranária proveniente de um vírus heterólogo, igual-
mente a da glicoproteína do vírus rábico.

O presente invento refere-se em primeiro lugar à uti-
lização dos vectores virosos para a obtenção da proteína
20 codificada pelo gene F do vírus LAV em culturas celulares.

Trata-se portanto num primeiro tempo de células de ma-
míferos que foram infectadas por um vector viral segundo
o invento ou então que podem conter a ADN recombinante cor-
respondente; de entre estas células, devem citar-se mais
25 particularmente as células diplóides humanas, culturas pri-
márias assim como as células Vero. Bem entendido que é
possível prever outros tipos de células como se depreende-
rá de resto dos exemplos seguintes.

30 As proteínas assim obtidas podem ser utilizadas após
purificação pela realização de vacinas.

É igualmente possível prever a utilização directa dos
vectores virosos de acordo com o invento a fim de efectuar
uma vacinação, sendo a proteína F então produzida in situ
35 e in vivo.

al

1

5

O presente invento refere-se igualmente aos anti-corpos lançados contra as proteínas F precedentes obtidos por infecção de um organismo vivo com um vector viral tal como anteriormente se descreveu e recuperação dos anti-

10

corpos induzidos depois de decorrido um tempo determinado. Finalmente, o presente invento refere-se à detecção dos anti-corpos lançados contra as proteínas F anteriores assim como ao processo de diagnóstico correspondente que permite, a partir da detecção destes anti-corpos na retirada biológica de um paciente, detectar in vitro a SIDA nesse paciente.

15

As técnicas utilizadas para a obtenção da proteína F, as culturas celulares e as técnicas de vacinação são idênticas às que são praticadas actualmente com as vacinas conhecidas e não serão descritas em pormenor.

20

O presente invento compreende-se com a leitura dos métodos e exemplos seguintes.

25

As figuras seguintes ilustram os exemplos:

- . a figura 1 representa a acção da tunicamicina sobre as proteínas sintetizadas pelos recombinantes VV.TG.FLAV.1147 e VV. TG. FLAV.1145 e imunoprecipitadas devido a um soro anti-LAV; nesta figura, os pesos moleculares são dados em quiloDaltons, e representam-se por:

30

P : o resíduo celular

S : o sobrenadante

- : os produtos obtidos sem tratamento

+ : os produtos obtidos depois do tratamento com a tunicamicina

35

1 : VV.TG.FLAV.1145

1

2 : VV.TG.FLAV.1147

3 : vírus da vacina, tipo selvagem;

5

a figura 2 representa a crivagem de soros anti-LAV pela sua capacidade em reconhecerem a proteína F sintetizada pelos vírus recombinante

VV.TG.FLAV.1145; os pesos moleculares são expressos em quilodaltons, e representam-se por:

10

. 0 : vírus da vacina, tipo selvagem

. 1 : VV.TG.FLAV.1145, clone C

. 2 : VV.TG.FLAV.1145, clone D

. - : soro testemunha negativo

15

. a, b, c, d, e : soros de doentes atingidos pela SIDA;

. a figura 3 representa a imunoprecipitação das proteínas sintetizadas pelo recombinante VV.TG.1147 ; nesta figura designa-se por :

20

. 1 : vírus de vacina selvagem

. 2 : VV.TG.FLAV.1147

. a : a marcação das células BHK21 com a metionina ^{35}S

25

. b : a marcação das células BHK21 com $^{32}\text{PO}_4$

. c : a marcação das células BHK21 com o ácido mirístico ^3H os pesos moleculares são em daltons;

30

. a figura 4 representa a imunoprecipitação de extratos de células BHK21 infectadas pelos recombinantes de vacinação depois da marcação com $^{32}\text{PO}_4$;

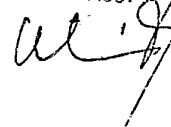
nesta figura designa-se por :

. - : a imunoprecipitação sem adição de TPA

. + : a imunoprecipitação com adição de TPA

35

. P : o resíduo celular



1

. S : o sobrenadante de cultura
os pesos moleculares são em daltons;

5

- . a figura 5 representa a imunoprecipitação das proteínas sintetizadas pelo vírus recombinante VV.TG.FLAV.1165 e marcadas com a metionina

³⁵S ; nesta figura designa-se por :

10

- . 1 : as células infectadas por VV.TG.FLAV.1145
- . 2 : as células infectadas por VV.TG.FLAV.1165
- . 3 : as células infectadas por VV.TG.FLAV.1147

os pesos moleculares são em quilodaltons ;

15

- . as figuras 6a e 6b representam a reação dos anticorpos de ratos vacinados com os vírus recombinantes em relação à proteína F produzida em E. coli e transferida sobre nitrocelulose;

na figura 6a :

20

- . as faixas 1 e 3 representam o vírus de vacina selvagem
- . as faixas 2, 4, 5, 8, 9 representam o vírus VV.TG.FLAV.1145
- . as faixas 6, 7, 8, 11, 12 representam o vírus VV.TG.FLAV.1147
- . as faixas 13, 14, 15 representam o vírus VV.TG.FLAV.1146 ;

25

na figura 6b :

30

- . as faixas 1, 2 representam o vírus de vacina selvagem
- . a faixa 3 representa o vírus VV.TG.FLAV.1146
- . a faixa 4 representa o vírus VV.TG.FLAV.1147
- . as faixas 5, 6, 7, 8 representam o vírus VV.TG.FLAV.1165.

35

16 JUN 1987
al

MÉTODOS

Clonagem: Maniatis et al. 1982.

Enzimas : Utilizadas de acordo com as prescrições do fornecedor.

Mutagénesse localizada : Método derivado de Zoller e Smith, 1983.

Transferência na vacina : Kieny et al. 1984. Única diferença : as células humanas 143B substituem as células LMTK⁻.

Preparação da reserva de vírus

As células primárias de frango "livres de germes" são infectadas com 0,01 pfu/célula durante 4 dias a uma temperatura de 37°C (meio MEM + 5% NCS).

Purificação do vírus

Efectua-se uma centrifugação da reserva de vírus acima mencionada durante 15 minutos a 2.500 rotações (Rotor GSA Sorvall). O sobrenadante é posto de lado. Retoma-se o resíduo num tampão RSB (Tris HCl 10 mM pH 7,4, KCl 10 mM, MgCl₂ 1mM) durante 15 minutos a 4°C. Efectua-se uma trituração em vaso, depois uma centrifugação durante 15 minutos a 2.500 rotações. O sobrenadante é adicionado ao produto precedente efectuando-se depois uma segunda trituração da mesma maneira.

Todos os sobrenadantes são depositados sobre 10 ml de base de sacarose a 36% (p/v) (Tris 10 mM pH 8). Efectua-se uma centrifugação durante 2 horas a 14.000 rotações (Rotor SW28, Beckman).

O resíduo é retomado, dissociado e remetido sobre uma segunda base idêntica. O segundo resíduo é retomado em 5 ml PBS e carregado sobre um gradiente de 20-40% de sacarose (Tris 10 mM PH 8) (mesmo rotor). Efectua-se uma

centrifugação durante 45 minutos a 12.000 rotações.

Recupera-se a faixa de vírus. Ela é enegrecida por centrifugação durante 1 hora a 20.000 rotações. O resíduo é retomado no Tris 10 mM pH 8.

Imunoprecipitações

Efectua-se uma infecção de células BHK21 (caixas de 3 cm de diâmetro, 10^6 células/caixa, cultivadas em G-MEM+10% FCS) com 0,2 pfu/célula durante 18 horas. O meio é decantado e substituído por 1 ml de meio sem metionina e 10 μ l de metionina 35_S (5 mCi/300 μ l) (Amersham) por caixa.

Adiciona-se um excesso de metionina não radioactiva após 2 horas.

No fim da marcação, efectua-se uma raspagem das células infectadas, uma centrifugação durante 1 minuto numa centrífugadora Eppendorf, uma separação das fracções sobrenadantes de resíduo, uma lavagem do resíduo uma vez em tampão PBS, depois uma imunoprecipitação e um gel (segundo Lathe e outros, 1980).

Imunoprecipitação das proteínas sintetizadas em presença de tunicamicina

Depois da infecção de células BHK21 como se descreveu anteriormente, adicionam-se após 18 horas 1,5 μ g de tunicamicina por ml de meio durante 1 hora.

O meio é em seguida decantado e substituído por 1 ml de meio MEM sem metionina contendo 1,5 μ g de tunicamicina e 10 μ l de metionina 35_S (Amersham). O seguimento da manipulação efectua-se como anteriormente.

Tratamento endo-F

Depois da imunoprecipitação das proteínas marcadas por um soro de doente atingido pela SIDA, a fracção proteína-A sefarosa é retomada em:

0,2 M fosfato de Na, pH 6,1

0,05% SDS

0,1 % Nonidet P40

0,1 % Beta-mercaptoetanol

0,1 % EDTA pH 8

e ferve-se durante 5 minutos para desnaturar as proteínas.

Efectua-se uma incubação durante 20 horas a 37°C, com 4 unidades de endo-F, depois uma precipitação durante 2 minutos em gelo com 1/5 de volume de TCA a 100%. Lava-se o resíduo 3 vezes com acetona a 80%, adiciona-se o tampão de amostras e carrega-se sobre gel SDS.

Dosagem dos anti-corpos pelo teste Elisa

Incubam-se placas com 96 orifícios (NUNC) com fundo plano durante 18 horas a 37°C com 10⁶ pfu de vírus da vacina tipo selvagem em tampão carbonato. As placas são em seguida saturadas com gelatina a 0,01%. Os soros de ratos são então absorvidos sobre as placas e efectua-se o resto do protocolo como para um teste ELISA clássico.

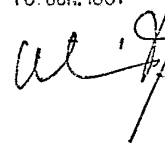
Leituras a 492 nm.

EXEMPLO 1

Construção dos plasmídeos híbridos

Os tamanhos combinados dos diferentes elementos necessários para a transferência da sequência codificando para o gene env no genoma de VV e sua expressão subsequente são da ordem de vários Kb. Julgou-se portanto necessário minimizar o tamanho do plasmídeo de replicação no E. coli utilizado para o trabalho de construção de modo a facilitar as manipulações necessárias.

16. JUN. 1987



1 O fragmento HindIII (HinJ) do genoma de VV contém
o gene completo da timidina Kinase (TK) que já foi ante-
riormente utilizada para permitir a permuta e a recombina-
5 ção do AND inserido no genoma de VV (Macket et al 1982).
É importante notar que a transferência de um enxerto no
gene TK do genoma de VV criou um vírus TK deficiente que
pode ser seleccionado. Foi primeiro que tudo necessário
produzir um plasmideo de pequeno tamanho compreendendo um
10 único local HindIII utilizável para a integração do frag-
mento Hin-J VV. Além disso, é necessário eliminar as se-
quências de restrição não necessárias do plasmideo de mo-
do a permitir as manipulações seguintes.

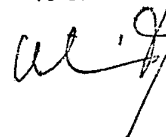
15 A construção foi despoletada a partir do plasmideo
pML2 (Lusky e Botchan, 1981) que é um vector derivado do
plasmideo pBR322 por deleção espontânea no qual se perdeu
o segmento entre os nucleótidos 1089 e 2491. Em primeiro
lugar eliminou-se a sequência de PstI por inserção do
fragmento AhaIII-AhaIII de pUC8 (Vieira e Messing, 1982)
entre dois locais AhaIII de pML2 eliminando 19 pares de
20 bases. Utilizou-se o método do "linker-tailing" (resí-
duo ligante) (Lathe et al 1984) para inserir um ligante
HindIII entre os locais NruI e EcoRI tratado por SI des-
te plasmideo, eliminando o local BamHI.

25 Isto conduz a um plasmideo de 2049 pares de bases que
compreende o gene betatolactamase funcional (que confere a
resistência à ampicilina) e que compreende além disso um
princípio de réplicação activa no E. coli e um local de
restrição única HindIII.

30 Esta construção é denominada pTG1H.

O fragmento Hin-J do ADN de VV que comporta o gene
TK foi previamente clonado num vector proveniente de
pBR327 (Drillien e Spehner, 1983). Este fragmento de
4,6 kb foi novamente clonado no local HindIII de pTG1H.
35 Seleccionou-se um clone no qual o gene TK está distante
em relação ao gene codificando para a resistência à ampi-

16 JUN 1987



1 cilina.

Esta construção pTGH-TK foi utilizada como vector na experiência seguinte.

5 A etapa seguinte consistiu em isolar um promotor de VV utilizável para comandar a expressão da sequência codificando para o gene a exprimir. O promotor de um gene precoce codificando para uma proteína de 7.500 daltons (7,5 k) já foi utilizado com êxito com fim idêntico (Smith et al 1983) e procedeu-se portanto ao isolamento deste
10 segmento.

O gene 7,5k está situado sobre um dos mais pequenos fragmentos SalI (fragmento Sal-S) do genoma de VV tipo WR (Venkatasen e outros, 1981). Como os pequenos fragmentos
15 são clonados de maneira preferencial, uma grande proporção dos clones obtidos por clonagem directa do ADN de VV tipo WR cortado por SalI no plasmido pBR322 compreende o fragmento Sal-S. Este fragmento é transferido sobre o bacteriófago vector M13mp701 (Kieny et al. 1983) por digestão SalI e reunião conduzindo assim ao bacteriófago
20 M13TGSal-S.

Neste clone encontra-se um local ScaI imediatamente na proximidade da ATG de iniciação do gene 7,5K. A jusante do gene 7,5K encontram-se situados os locais únicos
25 BamHI e EcoRI provenientes do vector. Os locais BamHI e ScaI são fundidos por intermédio de um ligante BglII 5'-CAGATCTG-3' depois de terem completado as extremidades geradas pela digestão BamHI com o fragmento Klenow da polimerase de E. coli. Este processo elimina o local ScaI
30 mas reconstitui o local BamHI e desloca o local único EcoRI a jusante. Ao mesmo tempo, o local SalI (AccI) a jusante é eliminado, tornando-se portanto único o local SalI a montante.

35 Esta construção é denominada M13TG 7,5K.

No interior do fragmento Hind-J do ADN de VV encon-

16 JUN. 1987

al:9

tram-se situados locais CaII e EcoRI que são separados por cerca de 30 pares de bases (Weir e Moss, 1983). O fragmento promotor de 7,5K presente no M13TG7,5K é excisado por AccI e EcoRI e clonado entre os locais ClaI e EcoRI de pTG1H-TK para gerar pTG1H-TK-P7,5K.

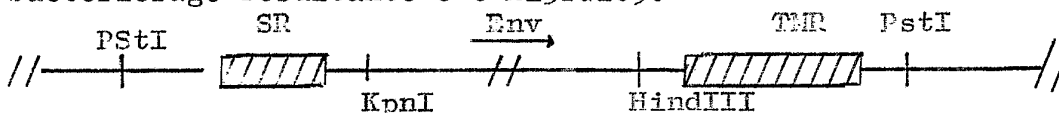
Esta construção conduz à transferência dos locais BamHI e EcoRI únicos do vector M13 imediatamente a jusante da sequência do promotor 7,5K. Estes locais únicos BamHI e EcoRI são utilizados na construção seguinte.

O segmento poli-ligante do bacteriófago M13TG131 (Kieny e outros, 1983) é excisado por EcoRI e BglIII e inserido entre os locais EcoRI e BamHI do plasmídeo pTG1H-TK-P7,5K, gerando pTG186-poli. Nesta construção, estão disponíveis 5 locais de restrição únicos para a clonagem de um gene estranho sob o controle de P7,5K (PstI, BamHI, SstI, SmaI, EcoRI).

EXEMPLO 2

Construção do plasmídeo que comporta a sequência F

Em primeiro lugar, o gene env do LAV envolvido pelas sequências de sinal e transmembranário da glicoproteína do vírus foi inserido num plasmídeo (pTG1134) descrito anteriormente. O fragmento PstI-PstI do plasmídeo pTG1134 é clonado no vector M13mp701 numa orientação adequada. O bacteriófago resultante é o M13TG169:



(SR = sinal de raiva

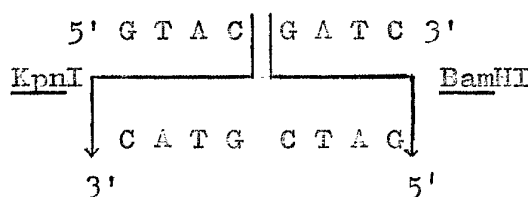
(TMR= raiva transmembranária

O fragmento genómico que codifica para a proteína F é obtido por uma digestão BamHI-HindIII do plasmídeo pJ19-6, segmento proviral clonado e descrito anteriormente.

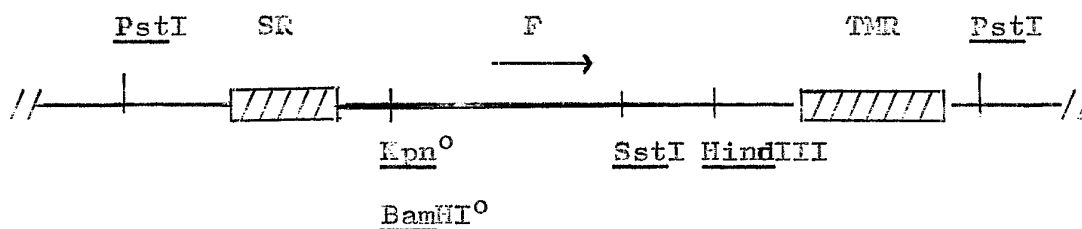
alg

O fragmento BamHI - HindIII de pJ19-6 é clonado no vector M13TG169 aberto aos locais KpnI e HindIII. O local BamHI é novamente ligado ao local KpnI por um ligante oligonucleótido simples de sequência:

5'-GATCGTAC-3'



O bacteriófago resultante chama-se M13TG170:



A fim de poder excisar unicamente a sequência codificante da proteína F, gera-se um local BamHI a montante da ATG de iniciação da tradução, por mutagénese dirigida por oligonucleótido

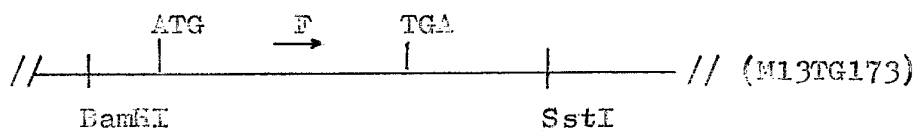


A sequência do oligonucleótido é:

5' GAAAGGATCCTGCTATAAG 3'
BamHI

16 JUN 1987
al

1 Depois de reparação e crivagem dos bacteriófagos
pelo oligonucleótido marcado por ^{32}P , isola-se o bacterió-
fago M13TG173. Ele não difere do bacteriófago M13TG170
5 senão pelo local BamHI situado a montante do ATG de inicia-
ção.



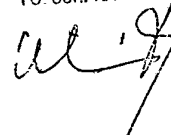
10 A introdução deste local permite clonar o fragmento
BamHI-SstI que contém o gene F no plasmideo de transferên-
cia pTG186-poli aberto aos locais BamHI e SstI e cuja
15 construção foi descrita anteriormente. Como se indicou,
a expressão de uma proteína heteróloga no vírus da vaci-
na necessita que a sequência que codifica seja alinhada
com uma sequência do promotor da vacina e seja inserida
num segmento não essencial do ADN da vacina. Este ADN
20 situado de um lado e doutro permite a recombinação com o
genoma da vacina in vivo por uma dupla recombinação re-
cíproca que transfere a sequência que codifica e o promo-
tor acompanhante para o genoma da vacina. O plasmideo
resultante é o plasmideo pTG1147.

25 A transferência da sequência codificando do gene
F e do promotor acompanhante no genoma da vacina é efec-
tuada como se descreveu:

EXEMPLO 3

Clonagem no vírus da vacina para gerar VV.TG.Flav:1147

30 A estratégia descrita por Smith et. al. 1983, assen-
ta na permuta in vivo entre um plasmideo que compreende
um enxerto no gene VV TK e o genoma viral do tipo selva-
gem de modo a inativar o gene TK transportado pelo vírus
35



1 Cs vírus TK⁻ podem ser seleccionados por espalhamento sobre uma linha celular (TK negativo) em presença de 5-bro-
modeoxiduridina (5BUDR) (Hackett et. al. 1982). A timi-
5 dina quinase fosforila o 5BUDR em 5'-monofosfato, que é em seguida convertido em trifosfato. Este composto é um análogo de dTTP e a sua incorporação no ADN bloqueia o de-
senvolvimento correcto do vírus. Um vírus TK⁻ pode toda-
via replicar o seu ADN normalmente e conduz a bacteriófagos virais visíveis numa linha celular igualmente TK⁻.

10 O vírus da vacina propaga-se no citoplasma das células infectadas primeiro que no núcleo. É por isso que não é possível tirar vantagem da maquinaria de replicação e de transcrição do ADN do hospedeiro e é necessário que
15 o vírus possua os componentes para a expressão do seu genoma. O ADN de VV purificado não é infeccioso.

A fim de gerar os recombinantes, é necessário efectuar simultaneamente a infecção celular com o vírus VV e uma transfecção com o segmento do ADN clonado que apresen-
20 te interesse. Todavia, a geração dos recombinantes é limitada à pequena proporção das células que são competentes para a transfecção pelo ADN. É por esta razão que foi necessário pôr em prática uma estratégia de "congru-
ência" indirecta para reduzir o ruído de fundo dos vírus
25 aparentados não recombinantes. Isto foi efectuado utilizando como vírus infecciosos vivos um mutante termosensível (ts) da vacina que não é capaz de se propagar a uma temperatura não permissiva de 39,5°C (Drillien et Sp-
hner, 1983). Quando as células são infectadas por um mu-
30 tante ts em condições não permitidas e transfectadas com o ADN de um vírus do tipo selvagem, a multiplicação viral intervirá somente nas células que são competentes para a
transfecção e nas quais uma recombinação entre o ADN vi-
ral selvagem e o genoma do vírus ts terá tido lugar; ne-
35 nhum vírus se multiplicará nas outras células, não obstan-
te o facto de elas terem sido infectadas. Se um plasmi-

16. JUL 1997



1 deo recombinante contendo um fragmento do ADN de vacina
tal como pTG1147 estiver incluído na mistura de transfec-
ção, na concentração apropriada, com o ADN do tipo selva-
gem, é do mesmo modo possível conseguir que ele partici-
pe na recombinação homóloga com o ADN da vacina nas célu-
las competentes.

10 Infectam-se monocamadas de células primárias de fi-
broblastos de embriões de frangos (CEF) a 33°C com VV-Co-
penhaga ts7 (0,1 pfu/célula) e transfectam-se com um co-
precipitado com fosfato de cálcio do ADN do vírus de ti-
po selvagem VV-Copenhaga (50 ng/10⁶ células) e com o plas-
mideo recombinante (50 ng/10⁶ células).

15 Depois de incubação durante 2 horas a uma tempera-
tura que não permite o desenvolvimento do vírus ts
(39,5°C), as células são incubadas de novo durante 48 ho-
ras a 39,5°C. Utilizam-se diluições de vírus ts⁺ para
infectar novamente uma mono-camada de células humanas
143-B-TK⁻ a 37°C que são em seguida incubadas na presen-
ça de 5BUDR (150 µg/ml). Obtem-se diferentes placas de
vírus TK⁻ a partir destas células que receberam o plasmí-
deo recombinante, ao passo que as culturas controladas
sem plasmideo não apresentam placas visíveis. Os vírus
TK⁻ são em seguida sub-clonados por uma segunda selecção
em presença de 5BUDR.

30 Uma dupla recombinação recíproca correcta entre o
plasmideo híbrido pTG1147 e o genoma de VV conduz à per-
muta do gene TK que comporta o enxerto com o gene TK do
vírus, tornando-se assim os recombinantes TK⁻.

35 Os ADN purificados a partir dos diferentes vírus
recombinantes TK⁻ são digeridos por HindIII e submetidos
a uma electroforese sobre gel de agarose. Os fragmentos
de ADN são transferidos sobre um filtro de nitrocelulose
segundo a técnica descrita por Southern (1975). O filtro
é em seguida tornado híbrido com o plasmideo pTG1147

ul

nick-transladado ao 32_p. Depois de lavagem do filtro, este último é fluorografado e são visíveis faixas de 3,85, 2,9, 0,8 kb sobre a autoradiografia quando o vírus vacina tem incorporado o gene F do LAV. Um destes recombinantes VV.TG.FLAV.1147 foi seleccionado pelos estudos seguintes.

EXEMPLO 4

Proteína F sintetizada a partir de um vírus recombinante vecina-LAV

Para pôr em evidência a expressão do gene F do LAV a partir do vírus vacina híbrido, infectam-se as células de roedor, BHK21, que são cultivadas num meio G-MEM + 10% de soro de vitelo fetal com o referido recombinante VV.TG.FLAV.1147.

Infectam-se uma mono-camada semi-confluente fresca (10^6 de células) com 0,2 pfu/célula e incuba-se durante 18 horas.

O meio é em seguida eliminado e adiciona-se um meio com fraco teor de metionina (1 ml para 10^6 células) suplementado com 10 μ l/ml de metionina 35 S (5 mCi/300 μ l). As células são incubadas a 37°C e as proteínas marcadas são reunidas por centrifugação. Depois de separação em resíduo e sobrenadante, as proteínas são incubadas com um soro pertencente a pacientes atingidos pela SIDA. As proteínas que reagem com o soro são recuperadas por adsorção sobre uma resina proteína A-sefarose e espalhadas por electroforese sobre um gel de poliacrilamida SDS e auto-radiografadas segundo uma técnica descrita por Lathe et al. 1980. As autoradiografias mostram que alguns soros de pacientes atingidos pela SIDA ligam especificamente duas proteínas dos extractos celulares infectados. Os pesos moleculares aparentes de 25,5 e 27 Kd

al

sugerem a equivalência com a proteína F identificada por soros de doentes atingidos pela SIDA, numa preparação de proteína F autêntica e em extractos de células infectadas pelo vírus LAV.

A sequência que codifica para F conduz a um produto de tradução primária de cerca de 23 Kd ao passo que a proteína F obtida pelo processo anterior apresenta um peso molecular aparente compreendido entre 25 e 27 kd. Esta heterogeneidade pode ser atribuída a uma modificação (acilação) e/ou ser devida ao facto de dois ATG poderem ser utilizados para a iniciação da tradução de F.

EXEMPLO 5

Construção de pTG1145

O plasmideo pTG1145 contém o gene F cuja parte codificando para a extremidade NH₂ terminal da proteína foi posta em fase com a sequência de sinal da glicoproteína rábica. As construções derivam do bacteriófago H13TG170 descrito atrás.

A parte 5' do gene F é colocado em fase com a sequência sinal da glicoproteína rábica por meio de uma eliminação gerada pelo oligonucleótido.

Os quatro primeiros ácidos aminados da glicoproteína rábica são conservados para favorecer uma boa clivagem do péptido sinal.

5'	<u>Phe</u>	<u>Gly</u>	<u>Lys</u>	<u>Phe</u>	<u>Pro</u>	<u>Ile</u>	<u>Gly</u>	<u>Gly</u>	<u>Lys</u>	<u>Trp</u>	<u>Ser</u>	<u>Lys</u>	3'
	<u>TTT</u>	<u>GGG</u>	<u>AAA</u>	<u>TTC</u>	<u>CCT</u>	<u>ATT</u>	<u>GGT</u>	<u>GGC</u>	<u>AAG</u>	<u>TGG</u>	<u>TCA</u>	<u>AAA</u>	

fim do
sinal
raiva

4 primeiros
ácidos ami-
nados da gli-
coproteína
rábica

(o ATG de iniciação é
eliminado)

al

O oligonucleótido que serve para gerar o anel tem por sequência:

5' TTTTGACCACTTGCCACCAATAGGGAATTTCCCAAA 3'

Obtem-se assim o bacteriófago M13TG171. O sinal raiva (SR) da glicoproteína rábica fundida com o gene F é em seguida transferido para o plasmideo pTG186-poli.

Para isto faz-se a clonagem do fragmento PstI-PstI de M13TG171 em pTG186-poli aberto no local PstI. O plasmideo resultante é denominado pTG1145. O gene F fundido com o sinal raiva é transferido para a vacina como descrito atrás.

EXEMPLO 6

Construção de pTG1146

Neste plasmideo, a sequência codificando para a zona transmembranária da glicoproteína rábica (TMR) é fundida com a extremidade gene F. O codão TGA (Stop) do gene F está compreendido no anel de eliminação gerado pelo oligonucleótido, que tem por sequência:

5' TGCACCTCAGTAATACATAGCAGTTCTTGAAGTACTC 3'

Glu Tyr Phe Lys Asn Cys Tyr Val Leu Leu Ser Ala

GAG TAC TTC AAG AAC TGC TAT GTA TTA CTG AGT GCA

F

TMR

Obtem-se assim o bacteriófago M13TG172.

O gene F fundido a montante com o sinal raiva e a jusante com a porção transmembranária raiva é transferido para o plasmideo pTG186-poli.

al

Para isto faz-se a clonagem do fragmento PstI-PstI de 113TG172 no plasmideo pTG186-poli, aberto para PstI para gerar o plasmideo pTG1146.

EXEMPLO 7

Imunoprecipitação das proteínas sintetizadas pelos
vírus recombinates VV.TG.FLAV.1145 e 1146

Operando como se descreveu anteriormente para o plasmideo pTG1147, obtêm-se os vectores vacina híbridos que correspondem aos diferentes plasmideos e preparados atrás.

Estes vectores virosos serão denominados respectivamente :

VV.TG.FLAV.1145

VV.TG.FLAV.1146

As proteínas obtidas como se descreveu atrás são testadas por imunoprecipitação (figura 1). Os imunoprecipitados obtidos com o produto de VV.TG.FLAV.1145 fazem aparecer uma proteína cujo peso molecular aparenta estar na proximidade de 28 kd. A proteína posta em evidência no sobrenadante do meio de cultura tem um peso molecular aparente mais elevado. Parece que o produto do gene F é efectivamente expelido no sobrenadante da cultura.

Por o aspecto difuso do sinal autoradiográfico sugerir a existência de uma glicosilação conduziu-se uma manipulação de marcação na 35_S metionina na presença de tunicamicina. Na presença de tunicamicina, obtém-se uma proteína de peso molecular aparente de 26 kd, nitidamente inferior ao descrito atrás. Isto indica que o produ-

to do vírus VV.TG.FLAV.1145 é glicosilado. A presença do péptido sinal e de locais potenciais de N-glicosilação ocasionou uma glicosilação da proteína F. Como a diferença de peso molecular entre a proteína glicosilada e não glicosilada é de 2 kd, é admissível que seja utilizado apenas um dos dois locais de glicosilação.

A mesma experiência conduzida com o vírus VV.TG.FLAV.1147 mostra que o produto deste vírus não é glicosilado.

Os imunoprecipitados obtidos com o produto de VV.TG.FLAV.1146 fazem aparecer uma proteína de peso molecular aparente superior (34 kd) aos observados anteriormente. Podia-se esperar este resultado porque o gene F é fundido com a parte terminal da glicoproteína rábica, que compreende a parte transmembranária desta última.

É igualmente demonstrado, pela marcação com a metionina ^{35}S na presença de tunicamicina, que o produto de VV.TG.FLAV.1146 é glicosilado. A excreção observada é menor que a constatada com VV.TG.FLAV.1145, indicando que a proteína está bem fixa à superfície das células.

Isto é confirmado por imunofluorescência de acordo com uma técnica descrita atrás. A superfície das células aparece nitidamente fluorescente em relação a um testemunho negativo, o que demonstra a presença da proteína F na superfície das células.

EXEMPLO 8

Colocação em evidência dos anti-corpos anti-F nos ratos vacinados com os vírus VV.TG.FLAV.1145 1146 e 1147

Vacinam-se ratos Balb/c e C57/B1 machos com 7 semanas por injeção sub-cutânea de 5.10^7 pfu ou por sacrifício da base da cauda e aplicação de 2.10^7 pfu de vírus VV.TG.FLAV por animal. Recebem uma injeção de reforço

16 JUN 1980
[Handwritten signature]

1 com a mesma dose passadas 2 semanas, e sofrem uma colhei-
ta de sangue no momento do reforço assim como 2 e 4 sema-
nas depois do reforço. Procura-se presença de anti-cor-
5 pos dirigidos contra determinantes do vírus LAV e do ví-
rus da vacina nos seus soros.

Todos os animais vacinados dão soros capazes de
reagir com o vírus da vacina num teste ELISA.

10 Utilizaram-se técnicas de imunoprecipitação ou de
"Western Blot". Estes métodos permitem pôr em evidência
os anti-corpos capazes de reagir com as proteínas do ví-
rus LAV não desnaturadas ou desnaturadas ao SDS num gel
de electroforese e transferidas sobre uma membrana de ni-
trocelulose. Nesta experiência, as membranas de nitroce-
15 lulose empregadas são obtidas por transferência das pro-
teínas contidas num extracto celular infectado pelo ví-
rus LAV segundo técnicas conhecidas. Estas membranas são
cortadas em faixas e cada faixa é incubada com o soro dos
ratos vacinados (diluição a 1/20). A proteína A marcada
20 a ^{125}I permite visualizar as proteínas do vírus LAV que
fixaram anti-corpos de ratos.

Utilizaram-se extractos celulares infectados pelo
vírus LAV e marcados com a cisteína ^{35}S para as experiên-
cias de imunoprecipitação.

25 Vários soros dão uma reacção específica com uma pro-
teína de peso molecular à volta de 27 kd, correspondendo
à proteína F.

30 Deve notar-se que o soro de alguns ratos produzem
em "Western Blot" sinais que correspondem a proteína não
identificadas da preparação de vírus LAV fixas sobre as
membranas.

EXEMPLO 9

Miristilação da proteína F

35 Mostrou-se que células BHK21 infectadas pelo recom-

binante VV.TG.FLAV.1147 exprimem uma proteína semelhante à proteína F nativa e que se apresenta sob duas formas de pesos moleculares aparentes de 25 e 27 kd em electroforese em gel de poliacrilamida SDS (figura 3).

Sendo miristilada a proteína F sintetizada pelas células infectadas pelo vírus HIV selvagem (Allan e outros, 1985), pro a existência de uma modificação pós-traducional semelhante foi procurada sobre a molécula sintetizada pelo vírus recombinante por marcação com ácido mirístico tritiado.

Um tapete de células BHK21 (10^6 células/caixa) é infectado com o vírus recombinante (a 0,2pfu/célula); 12 horas depois da infecção adicionam-se 100 μ Ci/ml de ácido mirístico 3 H (Amersham) num meio MEM suplementado em piruvato de sódio 5 mM. Passadas 4 horas de incubação as proteínas marcadas são recolhidas e imunoprecipitadas com um soro de doentes atingidos pela SIDA. As proteínas que reagiram com os anti-corpos são recuperadas por adsorção sobre uma resina de proteína A-sefarose e separadas por electroforese em gel de poliacrilamida SDS.

A auto-radiografia do gel mostra que apenas a forma de peso molecular aparente de 25 kd está miristilada; a forma de 27 kd não aparece (figura 3).

A expressão da proteína F pelo vírus da vacina recombinante permite portanto obter uma miristilação da molécula semelhante à da molécula nativa sintetizada pelo vírus HIV.

O miristato é provavelmente responsável pela ligação da molécula nas membranas intracelulares como se observa para outras proteínas miristiladas (Gould e outros, 1985).

1

5

5

5

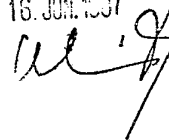


20

25

30

35



O local de fosforilação pela proteína quinase C de HIV-1, pp60src e EGFrec está indicado pela seta. Myr=ácido mirístico ; tm = parte transmembranária da proteína EGFrec.

EXEMPLO 10

Fosforilação da proteína F

A proteína F é miristilada (exemplo 9) e encontra-se assim fixa à membrana em contacto com outras proteínas membranárias. Existem analogias de sequência entre F e a proteína pp60src (Gould e outros, 1985), igualmente miristilada, e com o receptor EGF (Ulrich e outros, 1984), na sua parte intracitoplásmica próxima da membrana (quadro 1). Sendo estas duas últimas proteínas fosforiladas pela proteína quinase C sobre um local próximo da membrana, procurou-se saber se uma tal modificação existia para F. Um local de consenso de fosforilação pela proteína quinase C existe efectivamente sobre a treonina 15 de F (Woodgett e outros, 1986).

Infecta-se um tapete de células BHK21 (10^6 células/caixa) com o recombinante VV.TG.1147 (0,1 pfu/célula); 12 horas depois da infecção, adicionam-se 100 μ Ci/ml de 32 PO₄ (Amersham) no meio MEM sem fosfato. Passadas 4 horas de incubação, efectua-se uma imunoprecipitação e uma electroforese sobre gel, como descrito no exemplo 4.

A figura 3 mostra que a proteína de 25 kD que é miristilada é igualmente fosforilada. Esta proteína é resolvida em duas faixas : P25-1 e P25-2. Se se adicionar a mesma ao meio de cultura, 10 minutos antes da imunoprecipitação, o éster de forbol 12-tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA), observa-se um aumento muito nítido da fosforilação para a P25-1. Isto está de acordo com uma fosforilação para a proteína quinase C cuja actividade é muito fortemente aumentada pelo TPA (figura 4).

Numerosos isolantes de HIV possuem um gene F cuja

16 JUN 1987
al

1 treonina 15 é substituída por uma alanina (Ratner e ou-
tros, 1985). A proteína F de tais isolados é portanto
5 teòricamente não fosforizável. Para verificar este pon-
to, construiu-se um recombinante que exprime uma proteí-
na F que tem uma alanina em posição 15.

A P25-2 pode corresponder quer a uma forma de F
fosforilada sobre um outro ácido aminado que não a Thr15,
10 quer a uma proteína celular imunoprecipitada com F.

EXEMPLO 11

Construção do plasmideo pTG1191

15 O plasmideo pTG1191 contém o gene F proveniente do
plasmideo pJ19-6 mas em que a treonina na posição 15 é
substituída por uma alanina. As construções derivam do
bacteriófago M13TG170 descrito anteriormente (exemplo 2).
A mutação treonina-alanina é efectuada por meio do oligo-
20 nucleótido de sequência:

5' TCTTCCCTCACTGCAGGCCATCC 3'

25 Obtém-se assim o bacteriófago M13TG1151. O gene
F-Ala é em seguida transferido para o plasmideo pTG186-
-poli. Para isso, faz-se a clonagem do fragmento BamHI-
-SstI de M13TG1151 no pTG186-poli aberto nos mesmos lo-
cais. O plasmideo resultante é denominado pTG1191. A
30 transferência do gene F-Ala na vacina é efectuada como
se descreveu anteriormente.

EXEMPLO 12

Imunoprecipitação das proteínas sintetizadas pelo 35 vírus recombinante VV.TG.FLAV.1151

Operando como foi descrito atrás para o plasmideo

16 JUN 1987
al

1 pTG1147, obtém-se o vector viral VV.TG.FLAV.1191.

5 Examinam-se as proteínas obtidas por imunoprecipitação depois de marcação com a ^{35}S metionina como se descreveu atrás. As proteínas obtidas e visualizadas sobre gel SDS são idênticas às induzidas pelo recombinante VV.TG.FLAV.1147 (não representado).

10 Se se efectuar uma marcação com fosfato $^{32}\text{PO}_4$ como se descreveu atrás, já não se visualisa a forma P25-1 induzida pelo recombinante VV.TG.FLAV.1147. Além disso, a adição de TPA no meio não modifica a fosforilação da forma P25-2 (figura 4).

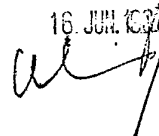
15 Estes resultados indicam que o local de fosforilação pela proteína quinase C é a treonina 15. O facto de a proteína F de alguns isolados não ser fosforilizável pela PKC pode implicar uma actividade biológica diferente para estes isolados. Com efeito, a fosforilação pela PKC constitui geralmente uma regulação da actividade dos seus substratos (ver revista por Nishizuka, 1986).

EXEMPLO 13

Construção do plasmideo pTG1165

25 Mostrou-se que a imunidade da proteína F era acrescida se esta fosse ligada a uma zona hidrófoba em C-terminal (recombinante VV.TG.FLAV.1146). Contudo, verificou-se que a conformação da proteína não era correcta por que esta é então muito pouco reconhecida por anti-corpos
30 de indivíduos seropositivos. Foi portanto empreendida a construção de um vírus recombinante exprimindo a proteína F ligada a um péptido hidrófobo em N-terminal. Este péptido desempenharia assim o papel do ácido mirístico, assegurando ao mesmo tempo uma fixação mais sólida da proteína na membrana celular. Este recombinante foi cons-
35 truído a partir do recombinante VV.TG.FLAV.1145 descrito

16 JUN 1987



1 atrás. O presente exemplo refere-se portanto à utiliza-
ção de um vector viral que exprime uma proteína F mais
imunogénica que a proteína F não modificada, e que tem uma
5 conformação similar à da proteína nativa.

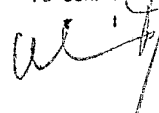
O plasmideo PTG1165 contém portanto o gene F cuja
parte codificando para a extremidade NH₂ terminal da pro-
teína foi posta em fase com a sequência de sinal da gli-
coproteína rábica, e esta sequência de sinal foi mutada
10 a fim de suprimir a clivagem in vivo entre o péptido de
sinal hidrofobo e a proteína F. As construções derivam
do bacteriófago M13TG171 descrito atrás (exemplo 5).

O local de clivagem está situado entre a glicina
terminal do péptido sinal e a lisina N-terminal da glico-
15 proteína rábica. A fim de suprimir a clivagem, a glici-
na situada em -1 do local de clivagem foi mutada em tri-
ptofano, a fenilalanina em -2 foi mutada em isoleucina
e a prolina em -5 em leucina. Estas mutações foram rea-
lizadas por meio do oligonucleótido com a sequência:

20 5' AGGGAATTTCCATAAACACAATAGAAAAACCAG 3'

Obtém-se assim o bacteriófago M13TG1107. A sequên-
cia de sinal mutada da glicoproteína rábica fundida com
25 o gene F é em seguida transferida para o plasmideo pTG186-
poli.

Para isto, faz-se a clonagem do fragmento PstI-PstI
de M13TG1107 no pTG186-poli aberto no local PstI. O
30 plasmideo resultante é denominado pTG1165. O gene F fun-
dido com a sequência sinal da raiva mutada é transferido
para a vacina como se descreveu atrás.



EXEMPLO 14

Imunoprecipitação das proteínas sintetizadas pelo
vírus recombinante VV.TG.FLAV.1165

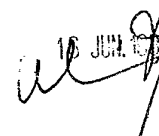
Operando como foi descrito para o plasmideo pTG1147, obtém-se o vírus da vacina recombinante que corresponde ao plasmideo pTG1165 e denominado VV.TG.FLAV. As proteínas obtidas como foi descrito atrás são testadas por imunoprecipitação (figura 5).

Os imunoprecipitados obtidos com o produto de VV.TG.FLAV.1165 fizeram aparecer uma proteína cujo peso molecular aparente é de 26000 daltons. A proteína está ausente nos sobrenadantes de cultura. Uma manipulação de marcação com a ^{35}S metionina na presença de tunicamicina indica que a proteína obtida não é glicosilada.

EXEMPLO 15

Colocacação em evidência dos anti-corpos anti-F
nos ratos vacinados com os vírus VV.TG.FLAV.1165

Vacinam-se ratos Balb/C fêmeas com 7 semanas por escarificação na base da cauda como se descreveu no exemplo 8. A detecção dos anti-corpos efectua-se pela técnica de "Western blot". A proteína F produzida no E. coli é transferida sobre nitrocelulose, são recortadas pequenas faixas e incubadas com soros dos animais vacinados (figura 6a). A reacção observada é de cerca de 3 a 5 vezes mais forte para o recombinante VV.TG.FLAV.1165 que para o recombinante VV.TG.FLAV.1147, e equivalente à do recombinante VV.TG.FLAV.1196 (figura 6b). Contudo, prefere-se a utilização do recombinante VV.TG.FLAV.1165 porque a proteína sintetizada é perfeitamente reconhecida pelos anti-corpos de indivíduos de seropositivos, e portanto

16 JUN 1987


a sua conformação é correcta. O recombinante VV.TG.FLAV. 1165 parece ser o melhor candidato para uma vacina contra a proteína T.

Depósito das estirpes representativas do invento :

O bacteriófago M13mp701 e o plasmideo pTG1134 estão descritos no pedido de patente nº. 86 05043 de 8 de Abril de 1986.

O plasmideo pJ19-6 foi depositado em 16 de Novembro de 1984 na Colecção Nacional de Culturas de Microorganismos do Instituto Pasteur sob o nº 84 29099.

A estirpe seguinte foi depositada em 6 de Junho de 1986 na Colecção Nacional de Culturas de Microorganismos do Instituto Pasteur:

-E. coli transformado pTG1147 sob o nº. I-561.

REFERÊNCIAS

1. Allan J.S., Coligan J.E., Lee T.H., McLane M.F., Kanki P.J., Groopman J.E. e Essex M. (1985) Science 230, 810-813.
2. Auffray C. (1986) C.R. Acad. Ac. Paris 302 série III. Nº. 8, 287-292.
3. Arya K.S. e Gallo R.C. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 83 2209-2213.
4. Drillen E., Spehner D. (1983) Virology 131, 385-393.
5. Gould K.L., Woodgett J.R., Cooper J.A., Buss J.E., Shalloway D.F. e Hunter T. Cell 42, 849-857 (1985)

16 JUN 1987

W. G.

6. Guyader M., Guerneau M., Sonigo P., Clavel F.,
Montagnier L. e Alizon M. Nature 328, 662-669
(1987).5.
7. Kieny M.P., Lathe R. e Lecocq J.P., 1983, Gene
26 : 91-99.
8. Kieny M.P., Lathe R., Drillien R., Spehner D.,
Skory, S., Schmitt D., Wiktor T., Koprowski H. e
Lecocq. J.P. (1984) Nature 312: 163-166.
9. Lathe R., Hirth P., Dewilde M., Harford N e Lecocq
J.P., 1980, Nature 284 : 473-474.
10. Lathe R., Kieny M.P., Schmitt D., Curtis P., Le-
cocq J.P. (1984) J. Mol. Appl. Genet., vol. 2,
331-342.
11. Lathe R. Kieny M.P., Skory S. e Lecocq J.P. (1984)
DNA, vol. 3, 173-182.
12. Lusky M., Botchan M. (1981) Nature 293? 79-81.
13. Mackett M., Smith G.L., e Moss B., (1982) Proc.
Natl. Acad. Sci. 79 : 7415-7419.
14. Maniatis T., Fritsch E.F. Sambrook J. (1982) Cold
Spring Harbor Lab. N.Y.
15. Muesing M.A., Smith D.H., Cabradilla C.D., Benton C.V.,
Laskey L.A., e Capon D.J. (1985) Nature 313 : 450-
-458.

16 JUN 1987



- 1 16. Messing e Vieras, Gene 19, (1982) 269-276.
17. Kishizuka Y., (1986) Science 233, 305-312.
- 5 18. Panicali D. e Paoletti E. (1982) Proc. Natl.
Acad. Sci. e 79 : 4927-4931.
19. Panicali D., Davis S.W., Weinberg R.L., Paoletti
E. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 5364-5368.
- 10 20. Ratner L., Haseltine V., Patarca R., Livak K.J.,
Starcich B., Josephs S.F., Doran E.R., Rafalski
J.A., Whitehorn E.A., Baumeister K., Ivanoff L.,
Petterway Rr, S.R. Pearson M.L., Lautenberger J.A.,
15 Papas T.S. Ghayeb J. Chang N.T., Gallo R.C. e
Wong-Staal F. (1985) 313 : 277-284.
21. Ratner L., Stracich B., Joseph S.F., Hahn B.H.,
Reddy R.P., Livak K.J., Petterway S.R., Pearson
M.L., Haseltine V.A., Arya K.S. e Wong-Staal F.
20 (1985) Nucleic Acids Research, 13, 8219-8229.
22. Sanchez-Pescador e al. (1985) Science 227 :
484-492.
- 25 23. Smith G.L., Mackett M. Moss V. (1983) Nature 302 :
490-495.
24. Smith G.L., Murphy B.R., Moss B. (1983) Proc.
30 Natl. Acad. Sci. 80, 7155-7159.
25. Ullrich e al. Nature 309 : 418-425 (1984).
26. Venkatesan S., Baroudy B.M., Moss B. (1981) Cell
35 125 : 805-813.

Al

- 1 27. Vain-Hobson S., Sonigo P., Danos O., Cole S. e
 Alizon M. (1985) Cell 40 : 9-17.
- 5 28. Weir J.P., Moss B. (1983) J. Virol 46 : 530-537.
29. Woodgett J.R., Gould K.L. e Hunter T. Eur. J.
 Biochem. 161 : 177-184 (1986).
- 10 30. Zoller M.J. e Smith M. (1983) Methods in Enzymo-
 logy (Wu, Grossman, Moldave, eds.) 100 : 468-500.

15 O depósito do primeiro pedido para o invento acima
 descrito foi efectuado em França, em 16 de Junho de 1986
 sob o nº. 86 08698.

20 - R E I V I N D I C A Ç Õ E S -

 1ª. - Vector viral caracterizado por compreender pelo
 menos:

- 25 . uma parte do genoma de um vírus,
 . um gene codificando para a proteína F do vírus respon-
 sável pela SIDA.
 . Assim como os elementos que asseguram a expressão des-
 ta proteína nas células.

30 2ª. - Vector viral de acordo com a reivindicação 1,
 caracterizado por a parte do genoma de um vírus ser uma
 parte do genoma de um poxvirus.

35 3ª. - Vector viral de acordo com a reivindicação 2,
 caracterizado por o poxvirus ser a vacina.

16 JUN. 1987



1 4ª. - Vector viral de acordo com uma das reivindica-
ções 1 a 3, caracterizado por compreender uma sequência
de sinal e/ou uma sequência transmembranária proveniente
5 de um vírus heterólogo.

 5ª. - Vector viral de acordo com a reivindicação 4,
caracterizado por a sequência de sinal e/ou a sequência
transmembranária proveniente de um vírus heterólogo pro-
vir do vírus da raiva.
10

 6ª. - Vector viral de acordo com uma das reivindica-
ções 1 a 5, caracterizado por o gene que codifica ser o
gene F total que compreende desde a extremidade 5' :

- 15
- . a sequência de sinal do gene G do vírus da raiva.
 - . o gene F total.
 - . a zona transmembranária (TM) do gene G.

20 7ª. - Vector viral de acordo com uma das reivindica-
ções 1 a 6, caracterizado por a sequência de ADN codifi-
cando para a proteína F estar sob a dependência de um pro
motor de um gene do poxvírus.

25 8ª. - Vector viral de acordo com a reivindicação 7,
caracterizado por o motor ser um promotor do gene da va-
cina.

30 9ª. - Vector viral de acordo com a reivindicação 8,
caracterizado por a sequência de ADN codificando para a
proteína F estar sob o controle do promotor do gene da
proteína 7,5k da vacina.

35 10ª. - Vector viral de acordo com uma das reivindica-
ções 7 a 9, caracterizado por a sequência codificando pa-
ra a proteína F ser clonada no gene TK da vacina.

16 JUN 1987



1

11ª. - Processo para a preparação de ADN recombinante caracterizado por se preparar o ADN correspondente ao vector viral de acordo com uma das reivindicações 1 a 10.

5

12ª. - Cultura de células de mamíferos caracterizada por os mamíferos serem infectados por um vector viral de acordo com uma das reivindicações 1 a 10 ou por compreender um ADN de acordo com a reivindicação 11.

10

13ª. - Processo para a preparação da proteína F do vírus responsável pela SIDA, caracterizado por se cultivarem células de acordo com a reivindicação 12 e de se recuperar a proteína F produzida.

15

14ª. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por se preparar uma proteína que compreende ainda uma parte de glicoproteína da raiva.

20

15ª. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por se preparar uma proteína que compreende ainda um péptido hidrófobo em posição N-terminal.

25

16ª. - Processo para a preparação de uma vacina caracterizado por se incorporar um vector viral de acordo com uma das reivindicações 1 a 10 e/ou uma proteína de acordo com uma das reivindicações 13 a 15.

30

17ª. - Anti-corpos lançados contra a proteína F do vírus responsável pela SIDA, caracterizados por incluírem um organismo vivo com um vector viral de acordo com uma das reivindicações 1 a 10 ou com as proteínas obtidas de acordo com uma das reivindicações 13 a 15 e por se recuperarem os anti-corpos formados depois de um período de tempo determinado.

35

58243

D 11686/333 469

1

Lisboa, 16 JUN 1937

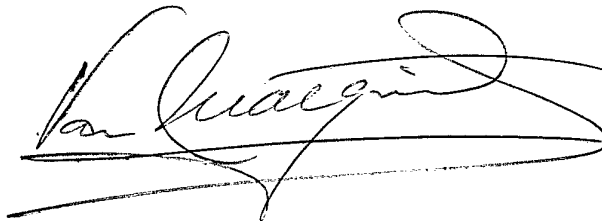
5

Por TRANSGEN S.A. Société Anonyme e

INSTITUT PASTEUR

O AGENTE OFICIAL

10

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Van Quagrin', is written over a horizontal line. The signature is fluid and cursive, with a large loop at the end.

15

20

25

30

35

5/10/97
16 JUN 1997
[Signature]

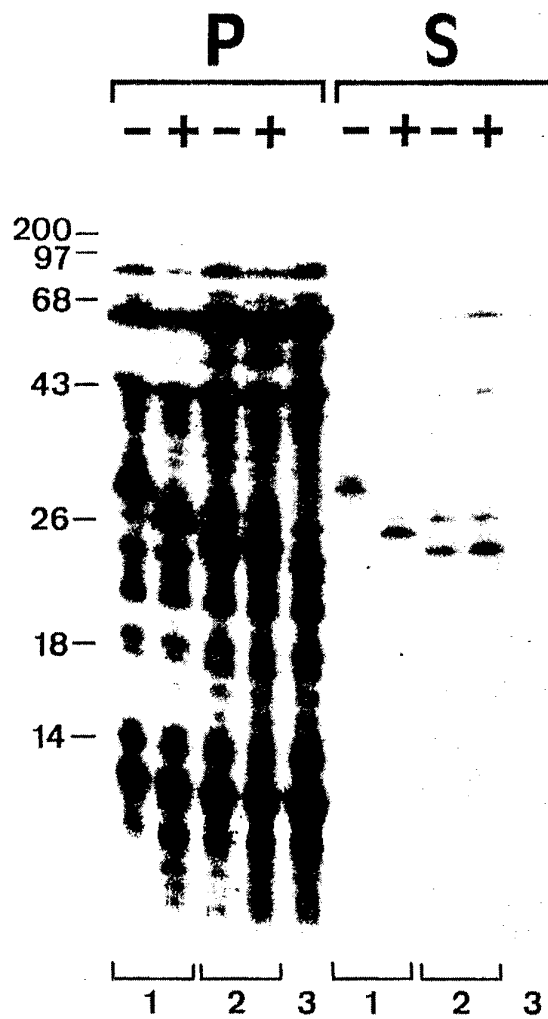


FIG.1

16 JUN 1997
Ali

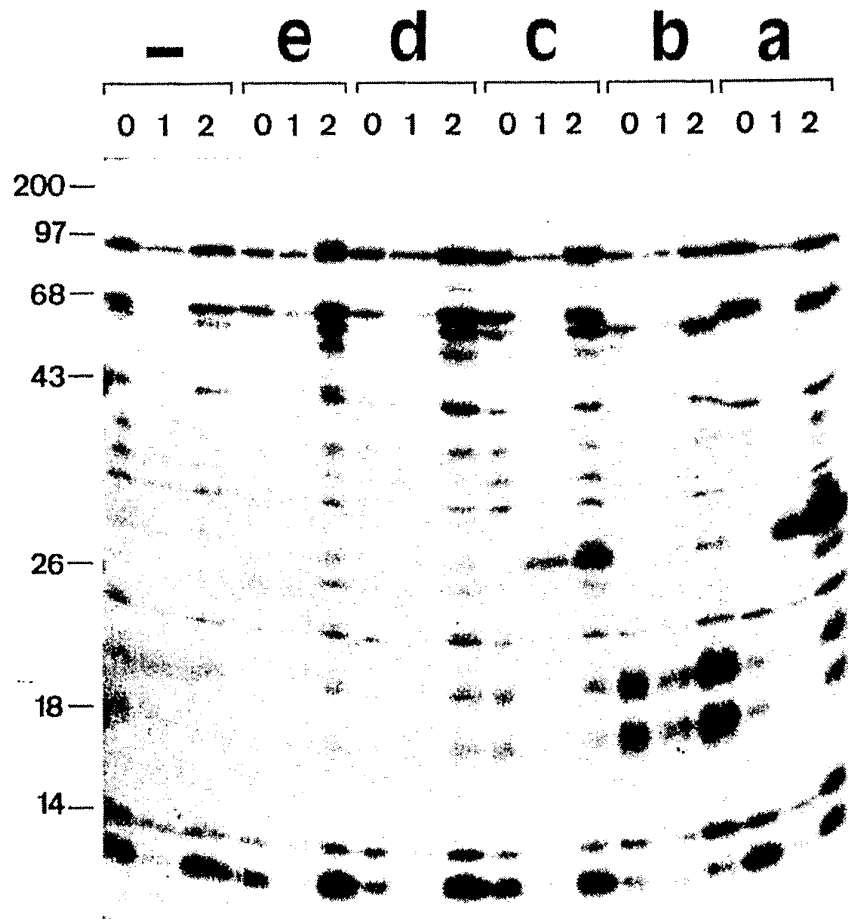


FIG 2

10/10/97
al-9

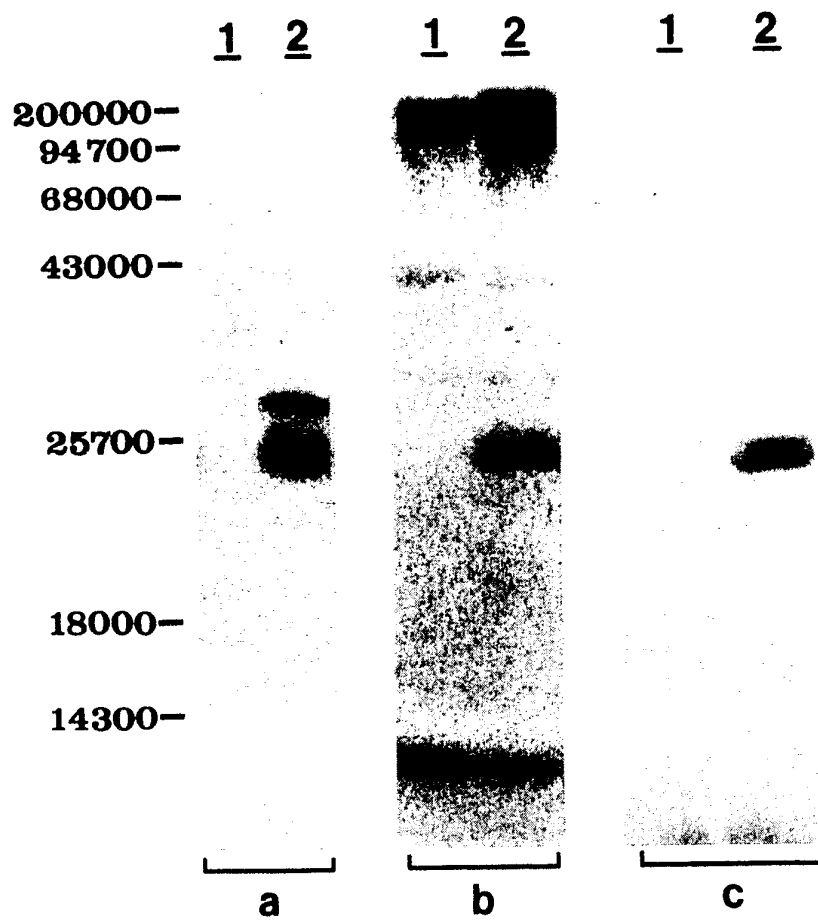
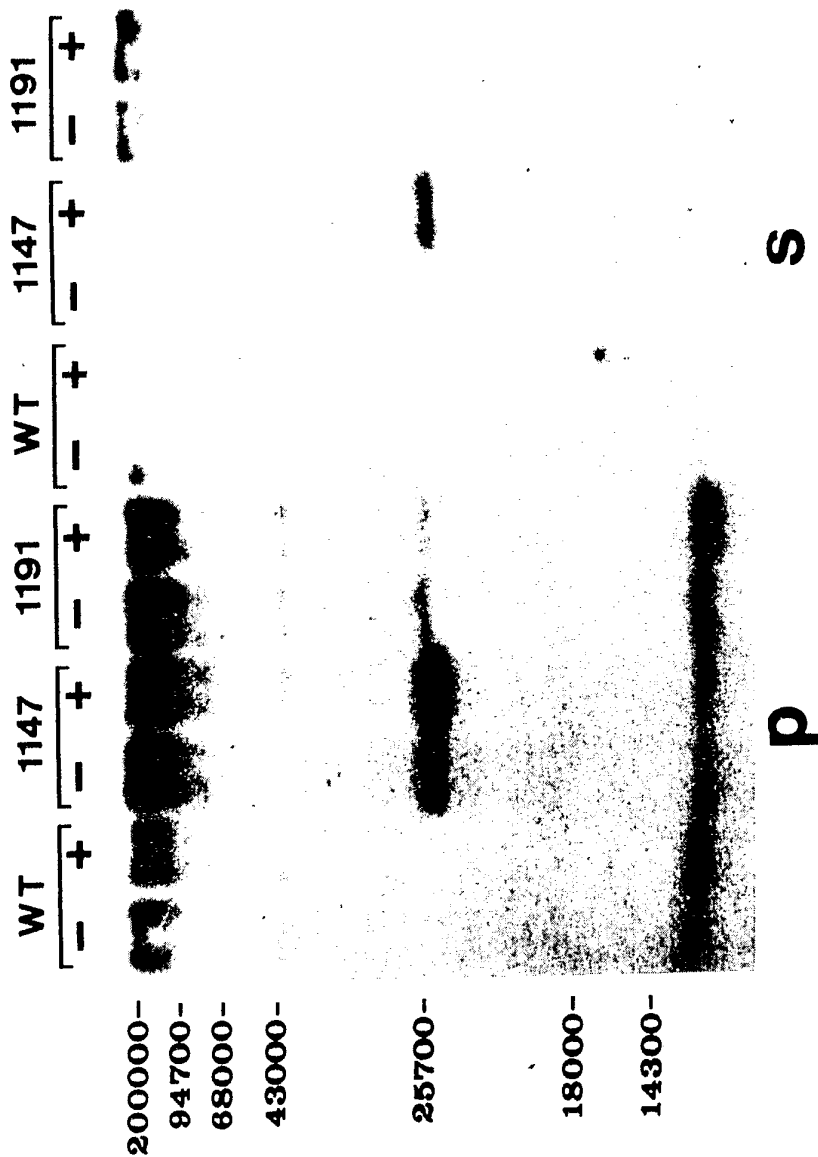


FIG. 3

16 JUN 1997
al



FIG_4

16 JUN 1987

alip

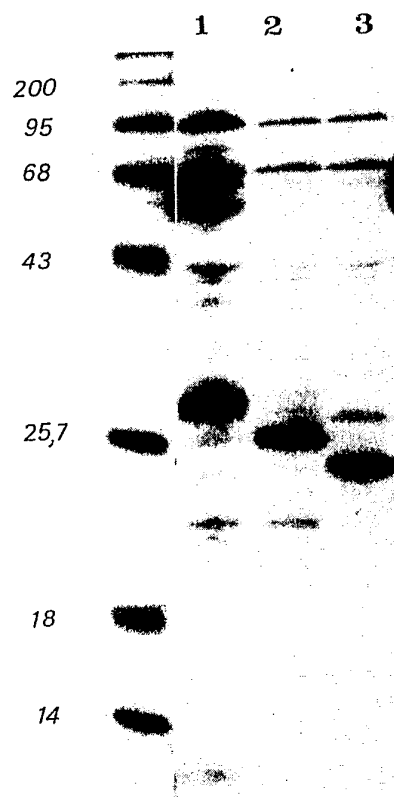
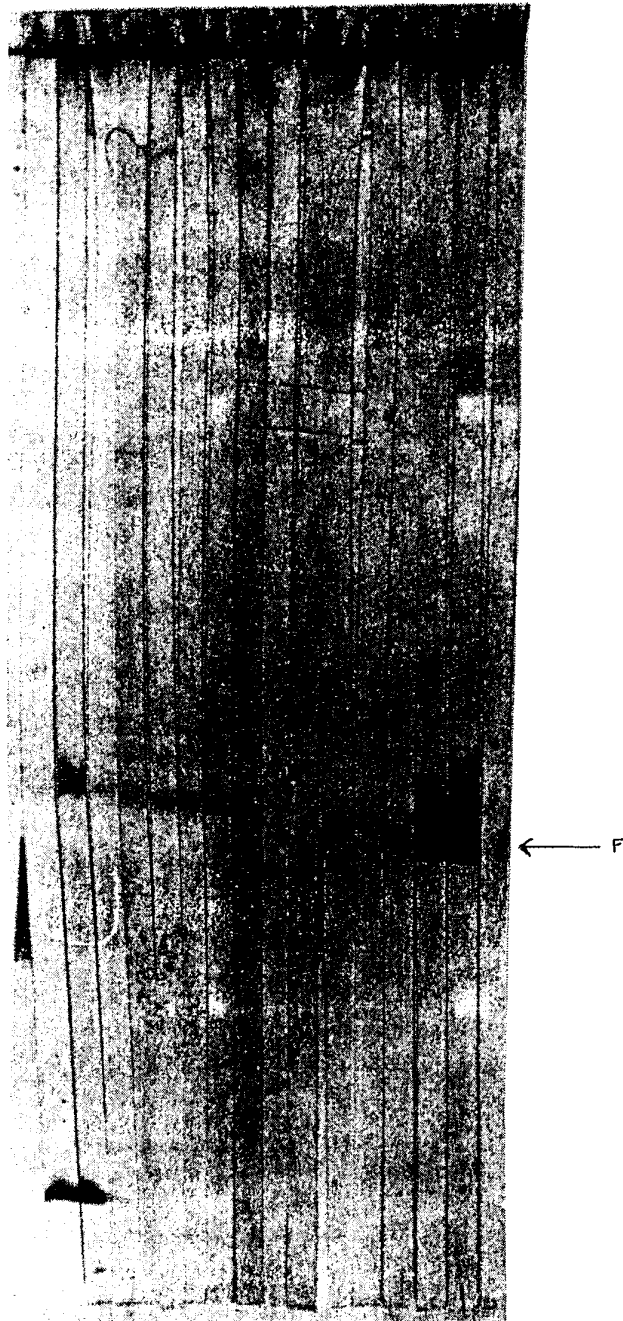


FIG. 5

52.25
16 JUN 1967
all



FIG_6a

16 JUN 1967

al:8

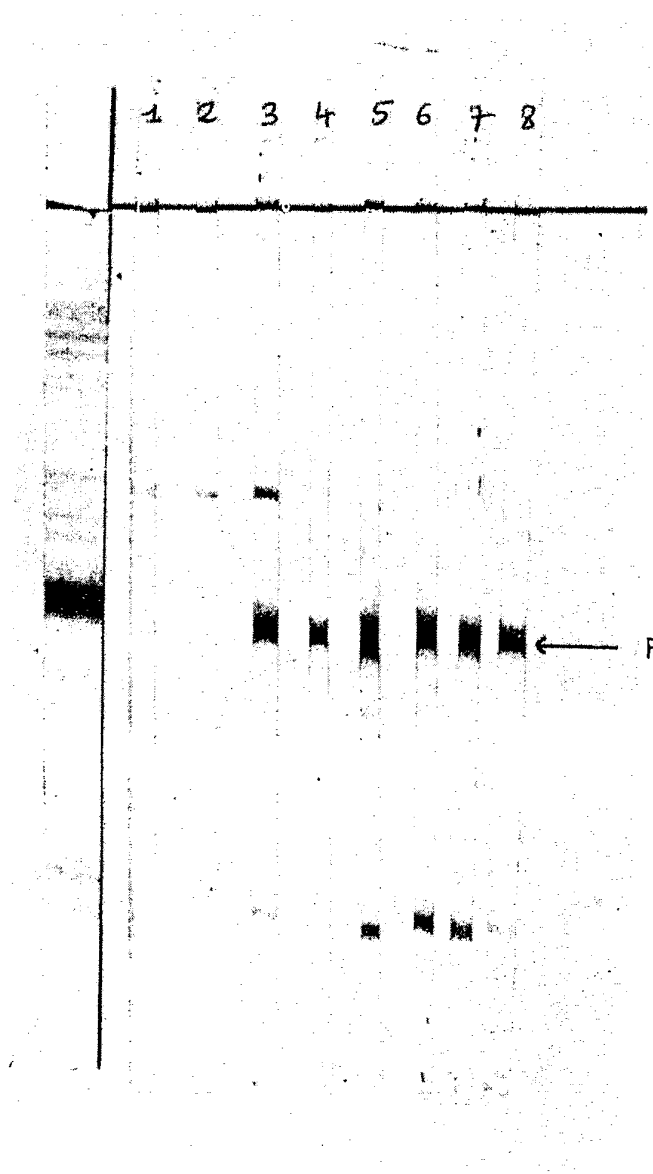


FIG. 6b