

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 97.604

REQUERENTE: FARMITALIA CARLO ERBA S.R.L., italiana, com
sede em Via Carlo Imbonati 24, 20159 Milão,
Itália

EPÍGRAFE: "Processo para a preparação recombinante de hirudinas"

INVENTORES: Luca Benatti, Paolo Carminati,
Jacqueline Lansen,
Guy Mazue',
Romeo Roncucci,
Paolo Sarmientos,
Emanuela Scacheri,
Philippe de Taxis du Poet,

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

Grã-Bretanha, 10 de Maio de 1990, sob o N.º.: 9010552.9

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO RECOMBINANTE DE HIRUDINAS"

A presente invenção refere-se à preparação de hirudina que foi isolada e originalmente a partir de Sanguessuga Hirudo medicinalis assim como para a preparação dos seus derivados.

Os péptidos anticoagulantes mais comuns são provavelmente os que pertencem à família das hirudinas. A hirudina, inicialmente isolada a partir de sanguessuga medicinal, Hirudo medicinalis, é um polipeptído bem conhecido e bem caracterizado inibidor da trombina 1,2. Mais especialmente, esta liga-se com a trombina por interações iônicas, portanto, impedindo a cisão do fibrinogênio com formação de fibrina e a subsequente formação do coágulo de fibrina. Estudos em animais com hirudina demonstraram a eficácia desta para impedir a trombose venosa, a oclusão de desvio vascular e a coagulação intravascular disseminada induzida pela trombina. Além disso, a hirudina exibe baixa toxicidade, pouca ou nenhuma antigenicidade e tem um tempo de depuração muito curto na circulação³.

As três variantes naturais da hirudina são conhecidas. A sequência duma primeira variante designada por HV1 foi determinada por Dodt et al, FEBS 165, 180-184, (1984). A sequência de HV1 é, de acordo com o código de três letras, (Eur. J. Biochem. 138, 9-37, 1984):

Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-

Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln.



A segunda variante designada por HV2, foi descrita por Dodt et al, Biol. Chem. Hope-Seyler 367, 803-811, (1986).

A HV2 difere da HV1 nos aspectos seguintes: Ile na posição 1 em substituição de Val; Thr na posição 2 em substituição de Val; Lys na posição 24 em substituição de Gln; Asn na posição 33 em substituição de Asp; Lys na posição 35 em substituição de Glu; Gly na posição 36 em substituição de Lys; Asn na posição 47 em substituição de Lys; Glu na posição 49 em substituição de Gln e Asn na posição 53 em substituição de Asp.

A terceira variante designada por HV3, foi descrita por Harvey et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1084-1088 (1986). A HV3 é idêntica à HV2 nas posições de 1 a 32 e então difere da HV1 nos seguintes aspectos: Gln na posição 33 em substituição de Asp; Lys na posição 35 em substituição de Glu; Asp na posição 36 em substituição de Lys; Gln na posição 53 em substituição de Asp; Pro na posição 58 em substituição de Glu; Asp na posição 62 em substituição de Glu; Ala na posição 63 em substituição de Tyr (SO₃H); Asp na posição 64 em substituição de Leu e Glu na posição 65 em substituição de Gln.

A nova via para a preparação de hirudinas e polipeptídeos semelhantes a hirudina foi agora planeada. Esta via é baseada na síntese química de uma sequência nucleotídica que codifica uma hirudina ou um polipeptído semelhante a hirudina e à expressão da hirudina ou do polipeptído semelhante a hirudina em organismos recombinantes. A cultura de organismos modificados geneticamente conduz à produção do produto pretendido que apresenta actividade biológica total.

Deste modo, a presente invenção proporciona um vector de expressão que contém uma sequência de DNA que codifica uma hirudina ou um polipeptído semelhante a hirudina. A presente invenção proporciona ainda um hospedeiro transformado com um vector de expressão compatível de acordo com a presente invenção e também proporciona uma DNA sintético que codifica uma hirudina ou um polipeptído semelhante a hirudina. Um fragmento de DNA que codifica uma hirudina ou um polipeptído semelhante a hirudina pode ser de cadeia dupla ou de cadeia simples.

Um hospedeiro em que uma hirudina ou um polipeptído semelhante a hirudina está apto a ser expresso é preparado mediante a transformação de um hospedeiro com um vector de expressão compatível com a presente invenção. O vector de expressão é geralmente preparado por:

- (a) síntese química de DNA que codifica uma hirudina ou um polipeptído semelhante a hirudina; e
- (b) a inserção do referido DNA num vector de expressão.

Uma hirudina ou um polipeptído semelhante a hirudina é consequentemente preparado por obtenção de um hospedeiro transformado de acordo com a presente invenção sob tais condições que a hirudina ou o polipeptído semelhante a hirudina é expresso nesta. A hirudina ou o polipeptído semelhante a hirudina pode depois ser isolado. Neste sentido, pode obter-se sob a forma pura uma hirudina ou um polipeptído semelhante a hirudina.

O termo "uma hirudina ou um polipeptído semelhante a hirudina" como aqui se utiliza, refere-se a hirudina nas suas formas naturais HV1, HV2 e HV3, assim como aos seus derivados, por exemplo, por meio de substituições de aminoácidos, deleções,

inserções, extensões, funcionalização e modificações químicas. Esta invenção, pode, portanto, ser aplicada a derivados de HV1, HV2 ou HV3, exibindo actividade antitrombina.

A sequência de aminoácidos HV1, HV2 ou HV3 pode ser modificada por uma ou mais substituições, inserções e/ou deleções de aminoácidos ou por uma extrusão em qualquer das suas extremidades. Um derivado composto de uma sequência destas modificada deve evidentemente também exibir actividade antitrombina. Tipicamente, existe um grau de homologia de 75% ou mais entre a sequência de aminoácidos de HV1, HV2 ou HV3 e a sequência de aminoácidos de um seu derivado. O grau de homologia pode ser 85% ou mais, ou 95% ou mais.

Por exemplo, um ou mais resíduos de aminoácidos da sequência de HV1, HV2 ou HV3 podem ser substituídos ou delectados ou podem ser inseridos um ou mais resíduos de aminoácidos adicionais.

O carácter fisicoquímico da sequência original pode ser hidrofobicidade/hidrofiliidade, dimensão e configuração.

As substituições candidatas, baseadas no código de uma letra (Eur. J. Biochem. 138, 9-37, 1984):

A para G e vice versa,
V por A, L ou G;
K por R;
S por T e vice versa;
E por D e vice versa; e
Q por N e vice versa.

Tanto quanto as extensões estão em causa, pode ser proporcionada em qualquer dos terminais uma sequência curta até 50 resíduos de aminoácido. A sequência pode ter até 30, por exemplo,

até 20 ou até 10 resíduos de aminoácido.

A hirudina ou o polipeptído semelhante a hirudina podem ser submetidos a uma ou mais modificações pós-translacionais tais como glicosilação, sulfatação, amidação COOH, acilação ou alterações químicas da cadeia polipeptídica. O resíduo Tyr na posição 63, por exemplo, pode ser sulfatado. Uma hirudina ou um polipeptído semelhante a hirudina recombinantes obtidos de acordo com esta invenção não são normalmente sulfatados nesta posição, diferentemente de HV1, HV2 ou HV3 naturais. Além disso, a presente invenção pode ser aplicada à produção de derivados de peso molecular menor que não têm as porções N-terminal ou C-terminal de HV1, HV2 ou HV3.

A presente invenção é aplicável particularmente à produção de HV1 e de um derivado de HV1 composta dos primeiros 46 resíduos de HV1 seguida por uma sequência de aminoácidos do resíduo 47 a 65 da variante HV2: HV1:

Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln

Hybrid HV1/HV2 (designado HV12):

Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Asn-Pro-Glu-Ser-His-Asn-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln

em que a sequência sublinhada constitui a fracção de HV2. O polipeptído HV12, como descrito anteriormente e os seus derivados

constituem um outro aspecto da presente invenção.

As hirudinas e os polipeptídeos semelhantes a hirudinas são preparados por tecnologia da recombinação de DNA. Prepara-se um gene sintético codificador de uma hirudina ou de um polipeptído semelhante a hirudina.

A sequência de DNA codificadora não inclui tipicamente introns. O gene sintético é inserido num vector de expressão apto a dirigir a produção do produto de recombinação. O gene sintético é habitualmente preparado por síntese química de oligonucleótidos que, no total, correspondem ao gene pretendido. Os oligonucleótidos são depois reunidos para se obter o gene.

O gene pode, portanto, ser construído a partir de quatro oligonucleótidos sintetizados por via química representando, cada um, cerca de metade de uma cadeia de um gene de DNA de cadeia dupla. Os oligonucleótidos são ligados e circularizados para se obter o gene pretendido. Se apropriado, a sequência genética pode ser modificada por mutagénese de sítio dirigido para se introduzir uma ou mais alterações de código. Habitualmente, é construído um gene com sítios de restrição em cada extremidade a fim de facilitar a sua manipulação subsequente.

Uma sequência de DNA preferida codificadora de HV1 está representada na figura 1 dos desenhos acompanhantes. A sequência de DNA preferida codificadora de HV2 está representada na figura 3. Qualquer das sequências pode ser modificada para codificar para um derivado.

Pode proporcionar-se uma sequência de DNA que codifique também um péptido leader. O péptido leader é capaz de orientar a secreção da hirudina ou do polipeptído semelhante a hirudina, das células, em que a hirudina ou o polipeptído semelhante a hirudina deve ser expresso. A sequência que codifica o péptido leader é

normalmente fundida na extremidade 5' da sequência de DNA que codifica a hirudina ou um polipeptído semelhante a hirudina.

O péptido leader é, de preferência, o péptido leader OmpA quando se requer a expressão num hospedeiro bacteriano, tal como, E. coli. O péptido leader é, de preferência, a proteína G do vírus de estomatite vesicular (proteína VSV G) quando a expressão se destina a células de insecto. As sequências de DNA apropriadas que codificam OmpA e a proteína leader VSV G estão representadas nas Figuras 5 e 8, respectivamente.

Uma sequência de DNA pode ser proporcionada a qual codifica uma proteína de fusão que é cindível para libertar uma hirudina ou um polipeptído semelhante a hirudina. Pode ser utilizada uma sequência de DNA que codifica uma sequência polipeptídica veicular ligada via uma ligação cindível a um terminal-N de uma hirudina ou de um polipeptído semelhante a hirudina. A ligação cindível pode ser uma ligação cindível por brometo de cianogénio.

Para a expressão de um polipeptído de hirudina ou semelhante a hirudina, constrói-se um vector de expressão que contém uma sequência de DNA que codifica um polipeptído de hirudina ou semelhante a hirudina e que é capaz da expressão da hirudina ou do polipeptído semelhante a hirudina quando proporcionado num hospedeiro apropriado. São fornecidos elementos de controlo transcricional e translacional apropriados que inclui um promotor para a sequência de DNA, um sítio de terminação da transcrição e codões de início da tradução e de paragem. A sequência de DNA é proporcionada na cadeia correcta de tal forma que permite a expressão de polipeptído em um hospedeiro compatível com o vector.

Habitualmente, o vector de expressão contém uma origem de replicação e, se apropriado, um gene marcador seleccionável

tal como um gene de resistência a um antibiótico. Operacionalmente, liga-se um promotor à sequência de DNA que codifica um polipeptídeo de hirudina ou um polipeptídeo semelhante a hirudina. O vector de expressão pode ser um plasmídeo. Neste caso, preferencialmente, o promotor é escolhido entre os promotores P_{trp} e $P_{lcc/lac}$, ligado operacionalmente à sequência de DNA. Alternativamente, o vector de expressão pode ser um vírus. O vírus pode ser um baculovírus recombinante em que o promotor de polihedrina é ligado de forma operacional à sequência de DNA que codifica uma hirudina ou um polipeptídeo semelhante a hirudina.

Um vector de expressão capaz de exprimir hirudina ou um polipeptídeo semelhante a hirudina, pode ser preparado de qualquer modo conveniente. Um fragmento de DNA que codifica hirudina ou um polipeptídeo semelhante a hirudina pode ser inserido num sítio de restrição apropriado num vector de expressão, por exemplo, num vector plasmídico. Pode preparar-se o baculovírus recombinante por:

(i) clonagem de um gene que codifica um polipeptídeo de hirudina ou semelhante a hirudina ou um vector de transferência de baculovírus no sítio de restrição a jusante do promotor de polihedrina; e

(ii) co-transfecção de células de insectos susceptíveis de infectarem baculovírus com o vector de transferência recombinante preparado na fase (i) e DNA de baculovírus do tipo natural intacto.

Ocorre recombinação de homologus, resultante num baculovírus recombinante comportando um gene de hirudina ou um gene que codifica um polipeptídeo idêntico a hirudina a jusante do promotor de polihedrina. O vector de transferência de baculovírus

pode ser um contendo um sítio de clonagem único a jusante do códon de iniciação ATG de polihedrina. O produto que em seguida é expresso pelo baculovírus recombinante resultante será uma proteína de fusão em que uma porção N-terminal de proteína de polihedrina se fundiu com o N-terminal de uma hirudina ou de um polipeptído idêntico a hirudina. Como indicado anteriormente, pode ser proporcionado uma ligação de clivagem na junção da fusão.

As células de insecto empregadas na fase (ii) são tipicamente células de Spodoptera frugiperda. O baculovírus de tipo natural é tipicamente um vírus de poli-hedrose nuclear Autographa californica (AcNPV).

Um vector de expressão que codifica uma hirudina ou um polipeptído semelhante a hirudina é proporcionado num hospedeiro apropriado. As células são transformadas com o gene para uma hirudina ou para um polipeptído idêntico a hirudina. É proporcionado uma hospedeira transformada sob tais condições que a hirudina ou o polipeptído idêntico a hirudina são expressos nesta. As células transformadas, por exemplo, são cultivadas de tal forma que permite a ocorrência da expressão. Qualquer sistema vectorial hospedeiro compatível pode ser utilizado.

A hospedeira transformada pode ser uma hospedeira eucariótica ou procariótica. Pode-se utilizar uma hospedeira bacteriana ou de levedura, por exemplo de E. coli ou de S. cerevisiae. Pode utilizar-se uma bactéria gram-positiva. Um hospedeiro bacteriano preferido é uma estirpe de E. coli do tipo B. As células de insecto podem ser utilizadas alternativamente e neste caso o sistema de expressão baculovírus é o apropriado. As células de insecto são tipicamente células de Spodoptera frugiperda. Como uma outra alternativa, podem ser transformadas células de uma linha de células

las de mamífero. Pode-se proporcionar um animal transgênico, por exemplo, um mamífero não humano em que é produzida uma hirudina ou um polipeptído idêntico a hirudina. A hirudina ou o polipeptído idêntico à hirudina que é expresso podem ser isolados e purificados.

Pode-se utilizar a hirudina ou o polipeptído semelhante a hirudina preparado de acordo com a presente invenção em composições farmacêuticas conjuntamente com um veículo ou excipiente aceitável sob o ponto de vista farmacêutico. Uma composição destas é habitualmente para administração endovenosa e neste caso o veículo é, de um modo geral, uma solução de cloreto estéril ou água de pureza aceitável. A hirudina, ou o polipeptído semelhante a hirudina preparados de acordo com a presente invenção, constitui uma anti-trombina e é apropriado para o tratamento de eventos tromboembólicos tais como a coagulação do sangue, normalmente num doente humano. Num aspecto da presente invenção, administra-se a hirudina ou o polipeptído idêntico a hirudina conjuntamente com um activador do plasminogénio, tal como o activador do plasminogénio de tecido. A hirudina, ou o polipeptído semelhante a hirudina preparado de acordo com a presente invenção, tem-se verificado ser compatível com este último.

Os exemplos seguintes ilustram a presente invenção.

Nos desenhos acompanhantes:

A Figura 1 apresenta a sequência nucleotídica de quatro oligonucleótidos que codificam para a maior parte da cadeia de hirudina HVL. A sequência sublinhada indica o sítio BalI que tem sido utilizado para construções posteriores. A parte inferior da figura mostra o modo de reunião dos quatro oligonucleótidos.

Para permitir posteriores manipulações foram incluídos

sítios HindIII e PstI.

A Figura 2 representa o Esquema da construção do plasmídeo intermediário M13-HV1, que é origem de um fragmento de DNA BalI-BamHI para posteriores construções.

A Figura 3 representa a sequência nucleotídica de quatro oligonucleótidos que codificam a maioria da cadeia de hirudina HV12. A sequência sublinhada indica o sítio BalI que tem sido utilizado para construções posteriores. A parte interior da figura mostra o modo de reunião dos quatro oligonucleótidos. E foram incluídos os sítios HindIII e PstI para manipulações subsequentes.

A Figura 4 representa o Esquema da construção do plasmídeo intermediário M13-HV12 que é origem de um fragmento de DNA BalI-BamHI para todas as construções de hirudina subsequentes.

A Figura 5 apresenta esquematicamente a construção de novos M13s recombinantes designados por OMP-HV1 e OMP-HV12 que transportam respectivamente o gene completo de HV1 e o gene completo de HV12 ligado ao péptido leader OmpA. A sequência peptídica leader está sublinhada duas vezes enquanto que a extremidade cortada BalI ou a extremidade coincidente HindIII estão sublinhadas apenas uma vez.

A Figura 6 apresenta esquematicamente a construção de pFC-HV1 e pFC-HV12 que são os plasmídeos utilizados para a produção de HV1 e HV12 em E. coli.

A Figura 7 representa a estrutura geral do plasmídeo pOMP-HV1 utilizado para a produção de hirudina em E. coli. Utilizaram-se técnicas de manipulação genética tradicionais para preparar este novo plasmídeo em que o gene de hirudina está sob o controlo transcricional do promotor híbrido $P_{lpp/lac}$. Ainda neste caso, o péptido leader OmpA conduz a secreção de hirudina pa-

ra o periplasma de E. coli.

A Figura 8 mostra a sequência nucleotídica e a reunião de oligos sintéticos utilizados para a secreção de hirudina de células de insectos. A sequência sublinhada indica o peptído leader da proteína VSV G.

A Figura 9 é a representação esquemática da construção de um novo M13 recombinante, designado por VSV-HV12 em que o gene completo está ligado ao peptído leader da proteína VSV G.

A Figura 10 mostra a construção esquemática de pAc-HV12 que tem sido utilizada como vector de transferência para o genoma de baculovírus pAcYM1 é o plasmídeo inicial utilizado correntemente como um aceitador de sequências heterólogas para serem transferidas para o vírus.

A Figura 11 mostra a sequência nucleotídica e a reunião de oligos sintéticos que codificam para a iniciação da cadeia de hirudina. O codão ATG que codifica o resíduo metionina adicional está sublinhado.

A Figura 12 mostra esquematicamente a construção de pAcFT1 que tem sido utilizada para a expressão intracelular de hirudina.

A Figura 13 é a representação esquemática dos novos plasmídeos de transferência designados por pAcFT1 e pAcFT1-HV12, que transportam, respectivamente, as sequências de HV1 e HV12 completas ligadas aos primeiros dezoito aminoácidos de polihedrina. Estes plasmídeos têm sido utilizados para transferir a sequência heteróloga para o genoma de baculovírus.

Exemplo 1: Síntese química dos genes de HYL e HYL2

As sequências codificadoras de nucleótido foram designadas com base nos códons preferidos de Escherichia coli⁴.

Além disso, foi construído por técnicas de genética um sítio de restrição BalI muito próximo da extremidade 5' dos genes sintéticos para permitir a inserção de sequências codificadoras em diferentes vectores de expressão.

De facto, os mesmos genes sintéticos foram utilizados para a expressão em células bacterianas e de insectos. No caso de células de insecto os métodos foram desenvolvidos para produzirem produtos segregados ou citoplásmicos.

Todas as manipulações de DNA plasmídico foram realizadas como descrito por Maniatis et al⁵.

Foi sintetizado o gene HYL e reunido do seguinte modo: quatro oligonucleótidos complementares sintéticos foram preparados através da aplicação de um sintetizador de DNA automático (Applied Biosystems) e a sua sequência está representada na Figura 1. Após a fosforilação enzimática dos quatro oligos foram reunidos utilizando-se DNA ligase e a sequência de dupla cadeia resultante foi inserida no vector fágico M13, mpl8, obtendo-se o plasmídeo recombinante M13-HYL que está representado na Figura 2. A fim de permitir a inserção do gene da hirudina no vector M13 foram adicionados também sítios HindIII e PstI nos oligos sintéticos. A sequência nucleotídica correcta foi verificada pelo método de Sanger na cadeia única do DNA fágico⁶.

Foi utilizado o plasmídeo recombinante M13-HYL como fonte do gene HYL para todos os vectores de expressão utilizados nos Exemplos.

O gene HYL2 foi sintetizado e reunido da mesma maneir-

ra. Os oligos utilizados para reunir o gene estão representados na figura 3. Os oligos 3 e 4 codificam para aminoácidos diferentes dos oligos 3 e 4 da Figura 1. Na Figura 3 está representado o plasmídeo recombinante M13-HV12 obtido.

Exemplo 2: Expressão e secreção da hirudina de células de E. coli

A fim de se obter a secreção no periplasma do produto recombinante é necessário sintetizar as moléculas de HV1 e HV12 cada uma na forma de uma pré-proteína. Mais particularmente, deve estar presente, uma sequência de aminoácidos designada por "péptido leader" responsável por uma secreção eficiente na extremidade NH_2 de HV1 ou HV12^{7,8}. Esta sequência extra é depois separada in vivo, durante a secreção, por uma peptidase leader de E. coli específica, produzindo a sequência madura correcta⁹.

Na bibliografia foram descritos muitos exemplos de sistemas secretores^{10,11}. Entre estes seleccionou-se o sistema com base no sinal de secreção da proteína de membrana mais externa de E. coli (OmpA) publicada anteriormente¹². Portanto, designaram-se dois oligonucleótidos complementares adicionais que codificam para o péptido leader OmpA precedido por uma sequência OmpA Shine-Dalgarno conhecida por ser responsável pela tradução eficiente do RNA mensageiro¹³.

A sua sequência, representada na Figura 5, inclui também a iniciação do gene HV1 que codifica para os primeiros dez aminoácidos. A presença do sítio BalI permitiu a junção desta peça sintética ao resto da sequência codificadora de HV1 enquanto que a presença do sítio HindIII a montante permitiu a ligação correctora M13. Portanto, o fragmento sintético HindIII-BalI foi ligado a uma peça BalI-BamHI de M13-HV1 e inserido em

M13mpl8 obtendo-se um novo plasmídeo designado por OMP-HV1.

A representação esquemática desta nova construção plasmídica também está representada na Figura 5. Manipulações equivalentes partindo de M13-HV12 fornecerem OMP-HV12 (Figura 5).

A partir de OMP-HV1 pode ser excisado o gene de hirudina sob a forma de um fragmento HindIII-BamHI que codifica para OmpA Shine-Dalgarno e péptido leader seguido por uma sequência codificadora de hirudina. Este fragmento restrição está de novo pronto para ser inserido no vector de expressão apropriado.

Teoricamente, podem ser utilizados vários sistemas de expressão para se obter uma produção elevada de proteínas heterólogas nas bactérias. O sistema com base no promotor P_{trp} tem sido utilizado com êxito no laboratório, no passado¹³. De novo, no caso do promotor escolhido, os níveis de expressão de um dado polipeptídeo não se podem prever. O uso do promotor P_{trp} para a expressão de hirudina nunca foi referido até ao presente momento.

O plasmídeo pFC33, representado na Figura 6, já tem sido citado na bibliografia (13). Este transporta a resistência à ampicilina e o promotor bacteriano P_{trp} , que orienta a expressão de proapolipoproteína A1. Após a digestão de pFC33 com HindIII e BamHI foi isolado o grande fragmento HindIII-BamHI transportando o gene da resistência ao antibiótico e o promotor e ligado com o fragmento HindIII-BamHI de OMP-HV1 ou de OMP-HV12 que codifica para a hirudina HV1 ou para o seu derivado HV12. Os pormenores desta construção estão apresentados na Figura 6. Isolaram-se novos plasmídeos designados por pFC-HV1 e por pFC-HV12

que são os plasmídios finais para a produção de HV1 de HV12 em E. coli.

O objectivo principal da presente invenção é a utilização das estirpes de E. coli do tipo B para a expressão e secreção no periplasma de hirudina e seus derivados. De facto, verificamos que a inserção do plasmídio pFC-HV1 em estirpes do tipo B da bactéria E. coli confere uma grande produção de hirudina. É interessante que diferentes estirpes de E. coli não são tão eficientes e, portanto, parece que o tipo de estirpe hospedeira é crucial para o sucesso da produção de hirudinas.

Estão disponíveis vários tipos de estirpes B de E. coli e podem ser utilizadas para a produção de uma hirudina ou de um polipeptído idêntico a hirudina. As estirpes preferidas são ATCC 12407, ATCC 11303, NCTC 10537. Em seguida apresenta-se um exemplo da transformação da estirpe NCTC 10537 com o plasmídio pFC-HV1 e subsequente cultura da transformante.

Foram preparadas células competentes da estirpe NCTC 10537 utilizando-se o processo do cloreto de cálcio de Mandel e Higa¹⁴. Transformaram-se aproximadamente 200 μ l de uma preparação destas células na concentração de 1×10^9 células por mililitro, com 2 μ l do DNA plasmídico (concentração aproximada 5 μ g/ml).

As transformantes foram escolhidas em placas de L-agar contendo 100 μ g/ml de ampicilina. Duas pequenas colónias foram inoculadas com palhetas de lâ para dentes (cada uma ao longo de 1 cm aproximadamente) em L-agar contendo o mesmo antibiótico. Após 12 horas de incubação à temperatura de 37°C foram retiradas algumas porções dos sulcos e testadas para a produção de hirudina por inoculação em 10 ml de meio LB (contendo ampici-

lina com uma concentração de 150 µg/ml) e incubadas durante a noite à temperatura de 37°C. No dia seguinte, as culturas foram diluídas 1:100 com um meio M9, contendo a mesma concentração em ampicilina, e incubaram-se de novo durante 6 horas à temperatura de 37°C.

Centrifugaram-se 20 ml desta cultura a 12000 x g à temperatura de 4°C, durante 10 minutos. Resuspendeu-se o aglomerado bacteriano em 2 ml de 33 mM HCl Tris pH 8; em seguida, adicionou-se igual volume de uma segunda solução de 33 mM EDTA, sacarose a 40% e incubou-se a mistura total sob condições de agitação moderada à temperatura de 37°C, durante 10 minutos. Após centrifugação, resuspenderam-se as células permeabilizadas em 2 ml de água arrefecida e abandonaram-se durante 10 minutos sobre gelo. O sobrenadante resultante foi isolado por centrifugação representando a fracção periplasmática da célula bacteriana.

Utilizando-se um ensaio cromogénico que é baseado na inibição da capacidade da trombina para cindir um substrato sintético S-2238¹⁵, mediu-se a presença da actividade anti-trombina na fracção periplasmática das células produtoras de hirudina. Nestas amostras, a actividade de hirudina apresentou-se com um valor aproximado de 50 µg/ml. Esta actividade não se apresentou nas fracções periplasmáticas de controlo. No caso de pFC-HV12, a produtividade da hirudina na variante HV12 foi equivalente a 80 µg/ml.

Com aproximação semelhante também se construiu um novo plasmidio de expressão/secreção para hirudina em que o promotor $P_{lpp/lac}$ ¹⁶ está presente em substituição do promotor P_{trp} . Este plasmidio diferente designado por pOMP-HV1 está represen-

tado na Figura 7. Após a inserção deste plasmídeo em estirpes E. coli do tipo B, obtiveram-se também grandes níveis de hiru-
dina activa (40-80 µg/ml). Como plasmídeo de iniciação para a
construção de pOMP-HV1 utilizou-se o plasmídeo pIN-III-ompA3
descrito por Ghrayb et al¹⁶. As condições para cultura e indu-
ção da expressão com isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG)
foram descritas anteriormente¹⁶.

Exemplo 3: Actividade anticoagulante de HV1 recombinante obtido
em E. coli

A actividade anticoagulante da variante de hirudina
HV1 também foi testada num teste de determinação do tempo de
tromboplastina parcial activada e no teste tempo de trombina
(T.T.). Ambos os testes se realizaram num coagulômetro automá-
tico, ACL300 Research, Instrumentation Laboratory, Milão, Itá-
lia.

Adicionaram-se a plasma humano citratado normal, con-
centrações crescentes de hirudina HV1 produzida por via recom-
binante. As amostras foram em seguida analisadas num coagulôme-
tro automático permitindo a determinação dos tempos de aPTT e
T.T. mediante a adição automática ao plasma de reagentes apro-
priados e registo da velocidade de formação do coágulo. O tem-
po aPTT foi determinado aplicando-se cefalina e cloreto de cálcio
(reagente APTT automatizado, General Diagnostic, USA) e o
T.T. foi determinado com trombina humana (Fibrindex, Ortho Diag-
nostic, Milão, Itália) na concentração de 50 V.I./ml. Prepara-
ram-se os reagentes, concentraram-se e aplicaram-se de acordo
com as instruções dos preparadores.

Os tempos de coagulação obtidos nos testes aPTT e T.T. foram colocados versus concentrações da proteína recombinante. Em cada teste, calcularam-se as concentrações que duplicaram os tempos de coagulação relativos a um plasma normal. O valor obtido para o teste aPTT foi de 210 ng/ml e para o teste T.T. 90 ng/ml.

Exemplo 4: Expressão e secreção de HV12 em células de insectos

Para se obter a secreção de HV12 de células de insectos, juntaram-se a sequência codificadora de HV12 com um péptido leader que é eficaz em reconhecer estas células. Utilizou-se o péptido leader da proteína G do vírus da estomatite Vesicular (VSV)¹⁷. A utilização desta sequência para a produção de hirudina e dos seus derivados em células de insecto nunca fora referida. Identicamente ao descrito anteriormente, preparou-se uma sequência de DNA sintética codificadora para o péptido leader da proteína G (VSV) seguida por a iniciação do gene de HV12 e a sequência nucleotídica está representada na Figura 8. Também neste caso se proporcionaram sítios de restrição convenientes, IndIII, BamHI e BalI para permitir a junção ou o resto do gene de HV12 e para o vector de expressão.

O fragmento sintético HindIII-BalI foi unido com um fragmento purificado BalI-BamHI de M13-HV12 transportando o gene HV12 e inseriu-se em M13mpl8 previamente cortado com HindIII e BamHI. Esta construção que gerou um novo plasmídeo designado por VSV-HV12 está esquematicamente representada na Figura 9. De VSV-HV12 excisou-se um fragmento de DNA BamHI-BamHI transportando o gene HV12 unido com o péptido leader VSV que tinha sido então in

serido no vector pAcYML¹⁸, como se representa na Figura 10. O plasmídeo resultante foi designado por pAc-HV12.

Para se obter a expressão em células de insectos, a sequência codificadora VSV-HV12 teve que ser transferida para o genoma de baculovírus sob o controlo transcricional do promotor de poli-hedrina. Para este fim, co-transfectaram-se células de insecto com um DNA de baculovírus do tipo natural e com um vector de transferência pAc-HV12. Como células de insecto, escolheram-se as células de Spodoptera frugiperda para servirem como células hospedeiras. Os pormenores experimentais são os seguintes:

Transfectaram-se células S. frugiperda com uma mistura de DNA AcNPV infeccioso e DNA plasmídeo representando os vectores de transferência recombinantes individuais por uma modificação do processo descrito por Summers et al¹⁹. Misturou-se um micrograma de DNA viral com 25-100 µg de DNA plasmídico e precipitou-se com (concentrações finais) cloreto de cálcio 0,125M na presença de 20 mM de tampão HEPES, pH 7,5, 1 mM de hidrogeno-ortofosfato dissódico, 5 mM de cloreto de potássio, 140 mM de cloreto de sódio e 10 mM de glucose (volume total 1 ml).

A suspensão de DNA foi inoculada numa monocamada de 10⁶ células S. frugiperda numa placa de cultura de tecidos de 35-mm deixando-se absorver as células durante 1 hora à temperatura ambiente e em seguida substitui-se com 1 ml de meio. Após incubação à temperatura de 28°C, durante 3 dias, recolheram-se os líquidos sobrenadantes e utilizaram-se para a produção de placas em monocamadas de células de S. frugiperda. As placas contendo o vírus recombinante foram identificadas pela sua ausência de polihedra quando examinadas ao microcôscio. O vírus destas pla-

cas foi recuperado e, após posterior purificação da placa, foi utilizado para produzir estoques de vírus negativos a poli-hedrina.

O processo descrito anteriormente permitiu isolar um baculovírus recombinante cujo genoma transportava o gene Hyl2 sob o control do promotor de poli-hedrina e do péptido leader da proteína VSV G. Utilizou-se este vírus para infectar células de S. frugiperda por processos bem reconhecidos¹⁹, numa multiplicidade de infecção de 10. As células infectadas foram em seguida cultivadas numa cultura giratória ou em monocamadas na presença de soro de vitela fetal a 10% de acordo com métodos publicados¹⁹. Em diferentes momentos após a infecção avaliou-se a actividade antitrombina (ATU) no sobrenadante utilizando-se o ensaio cromogénico S-2238. O Quadro seguinte resume os resultados:

Quadro: ACTIVIDADE DE HIRUDINA

ATU/10⁶ células

	<u>tempo pós-infecção</u>			
	<u>0 horas</u>	<u>24 horas</u>	<u>48 horas</u>	<u>72 horas</u>
Cultura Spinner	0,8	0,9	1,4	1,8
Monocamadas	0,8	0,8	2,0	5,1

Exemplo 5: Expressão de Hyl e Hyl2 em citoplasma de células de insecto

A hirudina e os seus derivados podem também ser produzidos e acumulados no citoplasma de células de S. frugiperda. Esta via geralmente fornece um rendimento melhor de proteínas heterólogas, uma vez que utiliza sinais de expressão de poli-hedrina

que é uma proteína viral não segregada.

Esta via, para se obterem grandes quantidades de HVL1 e HVL2 recombinantes, tem como base a expressão de um polipeptído de fusão em que os primeiros 18 aminoácidos da poli-hedrina estão ligados na cadeia com 65 aminoácidos de HVL1 ou HVL2. A presença da sequência da extremidade NH₂ de poli-hedrina permite grandes níveis de expressão²⁰. Além disso, entre a fracção de poli-hedrina e a sequência de HVL1 ou HVL2 colocou-se um resíduo metionina que permite a libertação da fracção de HVL1 ou de HVL2 mediante o tratamento da proteína híbrida com cianeto de bromo.

Identicamente às vias anteriores, preparou-se um fragmento de DNA sintético que permite a ligação do fragmento BalI-BamHI de M13-HVL1 ou M13-HVL2 a um vector de transferência apropriado. A nova peça sintética, apresentada na Figura 11, também inclui os sítios BamHI e BalI para manipulações subsequentes.

Obteve-se um vector de transferência diferente, pAcFT1, transportando a sequência nucleotídica codificadora para os 18 aminoácidos de poli-hedrina (Figura 12). Resumidamente, o fragmento EcoRV-BamHI de pAcYML¹⁸ tinha sido substituído por um oligonucleótido sintético contendo a sequência do gene de poli-hedrina do nucleótido -92 até ao nucleótido +55. Depois desta sequência estava presente um sítio conveniente de BamHI e foi utilizado para a inserção da sequência codificadora completa de HVL1 ou HVL2 de acordo com o esquema representado na Figura 13. Através desta construção obtiveram-se dois plasmídios, designados por pAcFT1-HVL1 e pAcFT1-HVL2, que tinham sido utilizados para transferir os genes híbridos para o genoma de baculovírus.

Obtiveram-se os baculovírus recombinantes como descrito no Exemplo 4. A infecção de células S. frugiperda foi realizada

de acordo com processos convencionais¹⁹.

A cultura de células de insectos infectadas conduziu à acumulação no citoplasma da proteína de fusão. Esta proteína híbrida foi a fonte de HV1 ou HV12 recombinantes. Estão disponíveis vários métodos na bibliografia que se podem utilizar para separar o híbrido com brometo de cianogénio^{21,22}. A aplicação do método de Olson et al²², tem permitido a obtenção de HV1 e HV12 de sequências polipeptídicas correctas. Estas duas moléculas desempenham actividade anti-trombina.

REFERÊNCIAS

- 1) Markwardt, F. 1970, Methods in Enzymology, 19, p. 924
- 2) Markwardt, F. 1985, Biomed. Biochim. Acta. 44, p. 1007
- 3) Markwardt, F. Hauptmann, J., Nowak, G., Klessen, C., and Walsmann, P. 1982. Thromb. Haemostasis 47, p. 226.
- 4) Grosjeans H. and Fiers W. 1982. Gene, 18, p. 199
- 5) Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J. 1982. Cold Spring Harbor, NY
- 6) Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, p. 5463.
- 7) Blobel G. and Dobberstain B. 1975. J. Cell Biology, 67, p. 83
- 8) Pages J.M. 1983, Biochimie, 65, p. 531
- 9) Wolfe P.B. 1983. J. Biol. Chem. 258, p. 12073
- 10) Talmadge K., Stahl S. and Gilbert W. 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, p. 3369
- 11) Oka T., Sakamoto S., Miyoshi K., Fuwa T., Yoda K., Yamasaki M., Tamura G. and Miyake K. 1985. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, p. 7212
- 12) Henning V., Royer H.D., Teather R.M., Hindennach I. and Hollenberg C.P. 1979. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, p. 4360
- 13) Isacchi A., Sarmientos P., Lorenzetti R. and Soria M. 1989, Gene 81, p. 129
- 14) Mandel M. and Higa A.J. 1970. J. Mol. Biology, 53, p. 154
- 15) Krstenansky, J.K., and Mao, S.J.T. 1987. FEBS Lett. 211, p. 10
- 16) Ghrayeb J., Kimura H., Takahara M., Hsiung H., Masui Y. and Inouye M. 1984. EMBO Journal 3, p. 2437
- 17) Bailey, M.J., McLeod, D.A., Kang, C., and Bishop, D.H.L. 1989. Virology 169, p. 323
- 18) Matsuura, Y., Possee, R.D., Overton, H.A. and Bishop. D.H.L. 1987. J. Gen. Virol. 68, p. 1233

- 19) Summers, M.D., and Smith, G.E. 1987, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555
- 20) Luckow, V.A. and Summers, M.D. 1988, Virology, 167, p.56
- 21) Gross E. 1967. Methods in Enzymology, 11, p. 238
- 22) Olson H., Lind P., Pohl G., Henrichson C., Mutt V., Jornvall H., Josephson S., Uhlen M. and Lake M. 1987, Peptides, 9, p. 301

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1.- Processo para a preparação de um polipeptido semelhante a hirudina de HV12 com a sequência seguinte:

Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-
Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-
Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-
Pro-Asn-Pro-Glu-Ser-His-Asn-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-
Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln

caracterizado pelo facto de utilizar a recombinação de ADN e de incluir a obtenção de um hospedeiro transformado com um vector de expressão compatível que comporta uma sequência de ADN codificadora do referido polipeptido semelhante a hirudina de HV12.

...

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a sequência de ADN codificar também um peptido líder capaz de dirigir a secreção do referido polipeptido idêntico à hirudina das células em que é expresso esse polipeptido idêntico à hirudina.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de o peptido líder ser OmpA ou o peptido líder da proteína G de vírus da estomatite vesicular (VSV).

4.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a sequência de ADN codificar uma proteína de fusão que é separável para libertar o referido polipeptido idêntico a hirudina.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o referido vector de expressão ser um plasmídeo.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de um promotor seleccionado entre os promotores P_{trp} e $P_{lpp/lac}$ estar ligado de modo operativo à referida sequência de ADN.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o referido vector de expressão ser um plasmídeo.

terizado pelo facto de o referido vector de expressão ser um vírus.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de o vírus ser um baculovírus recombinante, em que o promotor de poli-hedrina está ligado de modo operativo à referida sequência de ADN.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o hospedeiro ser uma bactéria.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo facto de a bactéria ser de uma estirpe de E. coli tipo B.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o hospedeiro ser um hospedeiro eucariótico seleccionado entre leveduras, linhas de células de mamíferos, linhas de células de insectos e animais.

12.- Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de o hospedeiro ser uma linha de células de Spodoptera frugiperda.

13.- Processo de recombinação de ADN para a prepara-

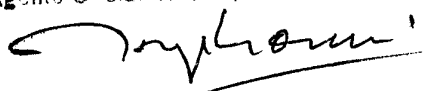
ção de hirudinas ou de polipeptidos semelhantes à hirudina, caracterizado pelo facto de incluir a obtenção de uma linha de células de Spodoptera frugiperda transformada com um vector de expressão de baculovírus recombinante, o qual contém um promotor de poli-hedrina ligado de modo operativo a uma sequência de ADN codificadora de hirudina ou de um polipeptido semelhante a hirudina.

14.- Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de a sequência de ADN também codificar um peptido líder, capaz de dirigir a secreção da hirudina ou do polipeptido semelhante à hirudina, das células de Spodoptera frugiperda.

15.- Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo facto de o peptido líder ser o peptido líder da proteína G de VSV.

16.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 13 a 15, caracterizado pelo facto de o polipeptido de hirudina ser hirudina de HV1.

Lisboa, 8 de Maio de 1991
Agente Oficial da Propriedade Industrial



R E S U M O"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO RECOMBINANTE DE HIRUDINAS"

Descreve-se um processo para a preparação de hirudinas ou de polipeptidos semelhantes à hirudina por meio de técnicas de recombinação de ADN, os quais apresentam actividade antitrombina. A hirudina ou o polipeptido semelhante à hirudina é expresso de preferência em células de E. coli ou células de insectos. O polipetido semelhante à hirudina é de preferência uma proteína híbrida de HV1 ou de HV2 com a sequência de aminoácidos seguintes:

Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-
Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-
Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-
Pro-Asn-Pro-Glu-Ser-His-Asn-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-
Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln

cuja porção sublinhada representa a sequência da porção de HV2.

Lisboa, 8 de Maio de 1991

■ Agente Oficial da Propriedade Industrial



oligo 1 HV1

5' AGCTTTGGCCAGAACCTGTCCTCTGCGAAGGTTCTAAAGTTTGGGTTCAGGGTAAACAATGCATCCTGGGTTCTGAOGGTCAAAAGAAOC 3'

oligo 2 HV1

5' ACTGGTTCCTTTTCAOCTTCAGAACCCAGGATGCATTTTGTTACCCCTGACCCGCAACGTTAGAAOCTTCCACACAGGCACAGGTTCTGGGCCAA 3'

oligo 3 HV1

5' AGTGGTTACCGGTCGACCTGTACCGCGGAAACCGCAGTCTCACAAOAGCGGTGACTTGGAGAAATCCCGGAAGTAATACCTGCAATAGTAACIGCA 3'

oligo 4 HV1

5' GTTACTATTGCAGGTAATCTTCCGGGATTTCTTGGAAAGTCACCGTCTGTTGTCAGACTGCGGTTTGGGGTTACCTTCACCGGTAAOCC 3'

ASSEMBLING:

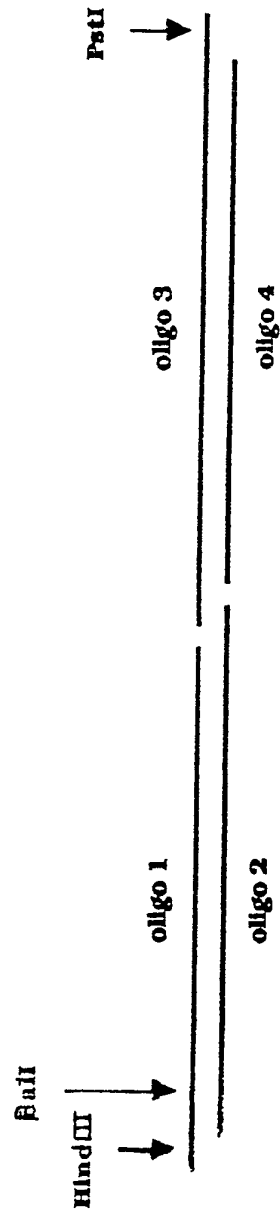
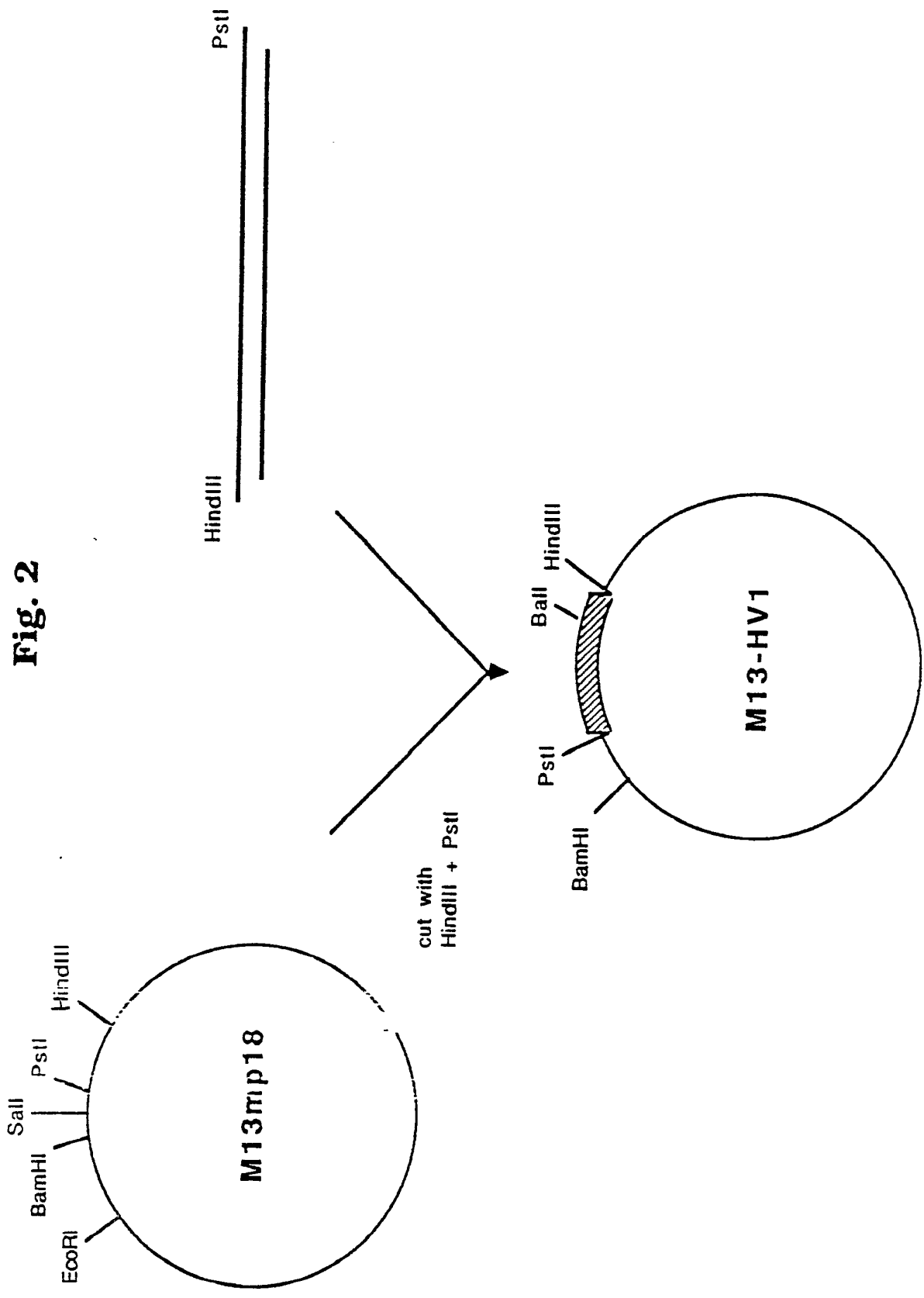


Fig.1

Fig. 2



5

oligo 1 HV12

5' AGCTTTGCGCCAGAACCTGTGGCTGTGCGGAAGGTTCTPAAAGTTTTCGGGTCAAGGGTAACAATGCATCCTGGGTTCTGAOGGTGAAGAACC 3'

oligo 2 HV12

5' ACTGGTTCCTTTTCACCGGTCAGAAACCCAGGATGCATTTCGTTACCCCTGACCGCAACGTTTGAACCTTCGCACAGGCACAGGTTCTGGGCCAA 3'

oligo 3 HV12

5' AGTGGGTTACCGGTGAAGGTACCCGAAACCTGAAAGCCATAATAACGGCGATTTCGAAGAAATTCAGAGAATATTTACAATGAACCTGCA 3'

oligo 4 HV12

5' GTTCATTGTAAATATTCCTCTGGGAATTCCTTCGAAATCGOOGTTATTTATGCCCTTCAGGGTTCGGGGTACCTTCAOCCGTAAOCC 3'

ASSEMBLING:

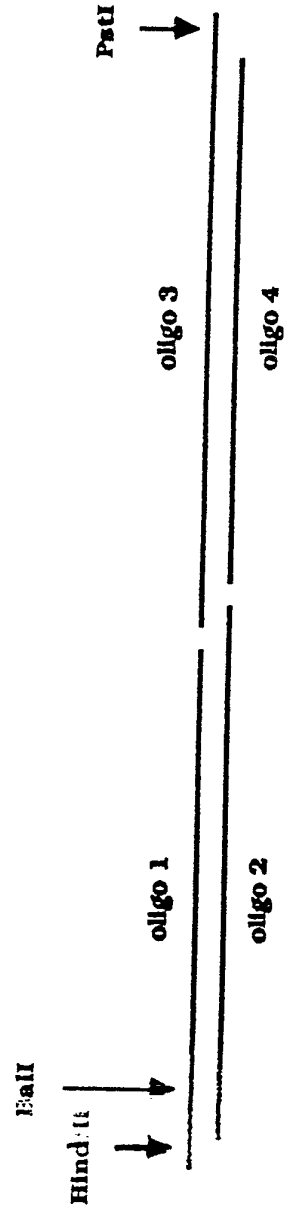
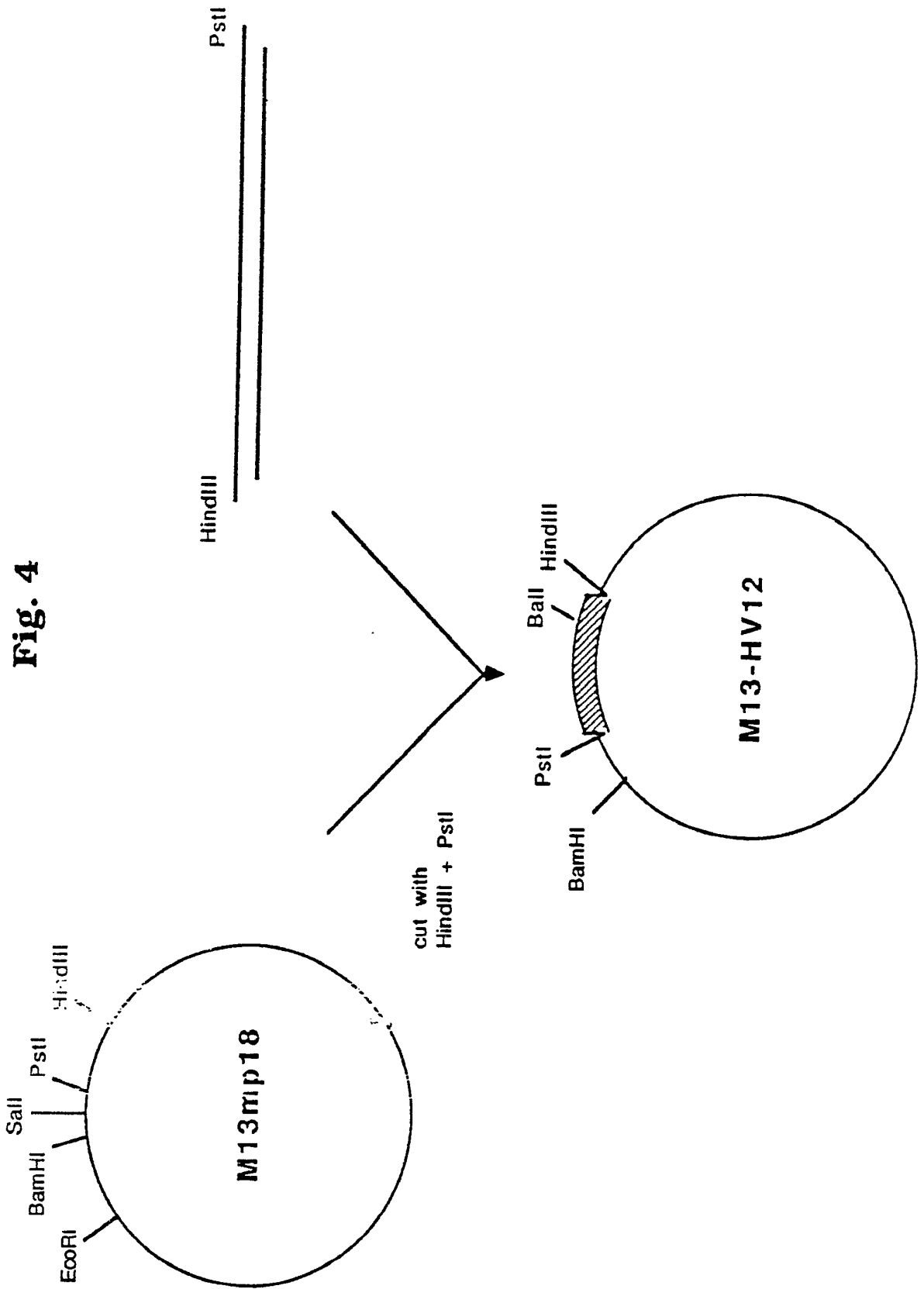


Fig.3

Fig. 4



oligo 1 OmpA-Hirudin

5' AGCCTTTCATTAACGAGGCGCAAAAATGAAAAGACAGCCTATGCGCATTCAGATGGCACTGGCTGGTTTGGCTAACGGTACGGCAGGCGGTTGTTTACACTGCTGCAACGGAATCTGG 3'

oligo 2 OmpA-Hirudin

5' CCAGATTGGGTGCAGTCAGTGTAAACAACGGCCCTGGCGCTAACGGTACGGTACGGTAAACACAGCCAGTGCACCTGCAATGCGATAGCCTGCTTTTTCATTTTGTGGCCCTGGTTATCAA 3'

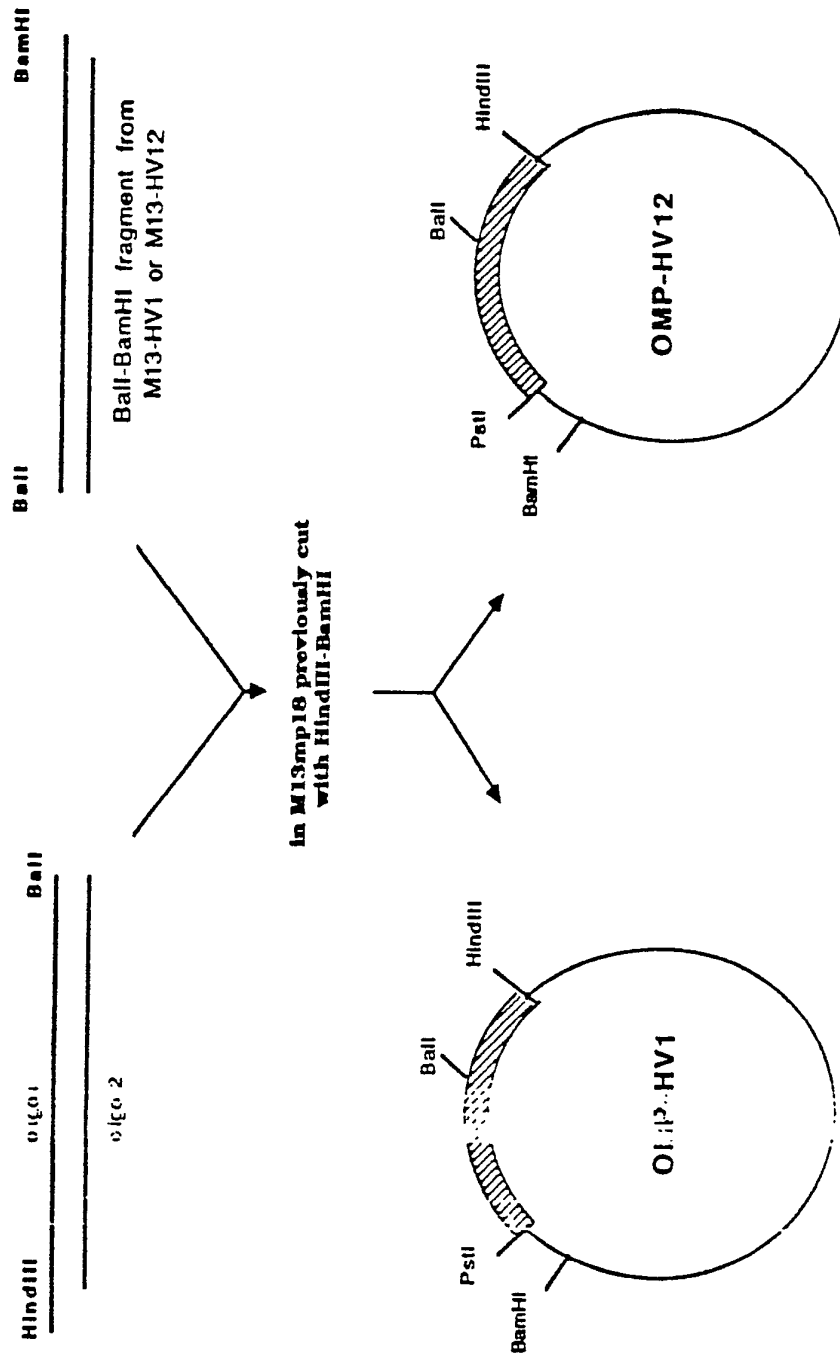


Fig.5

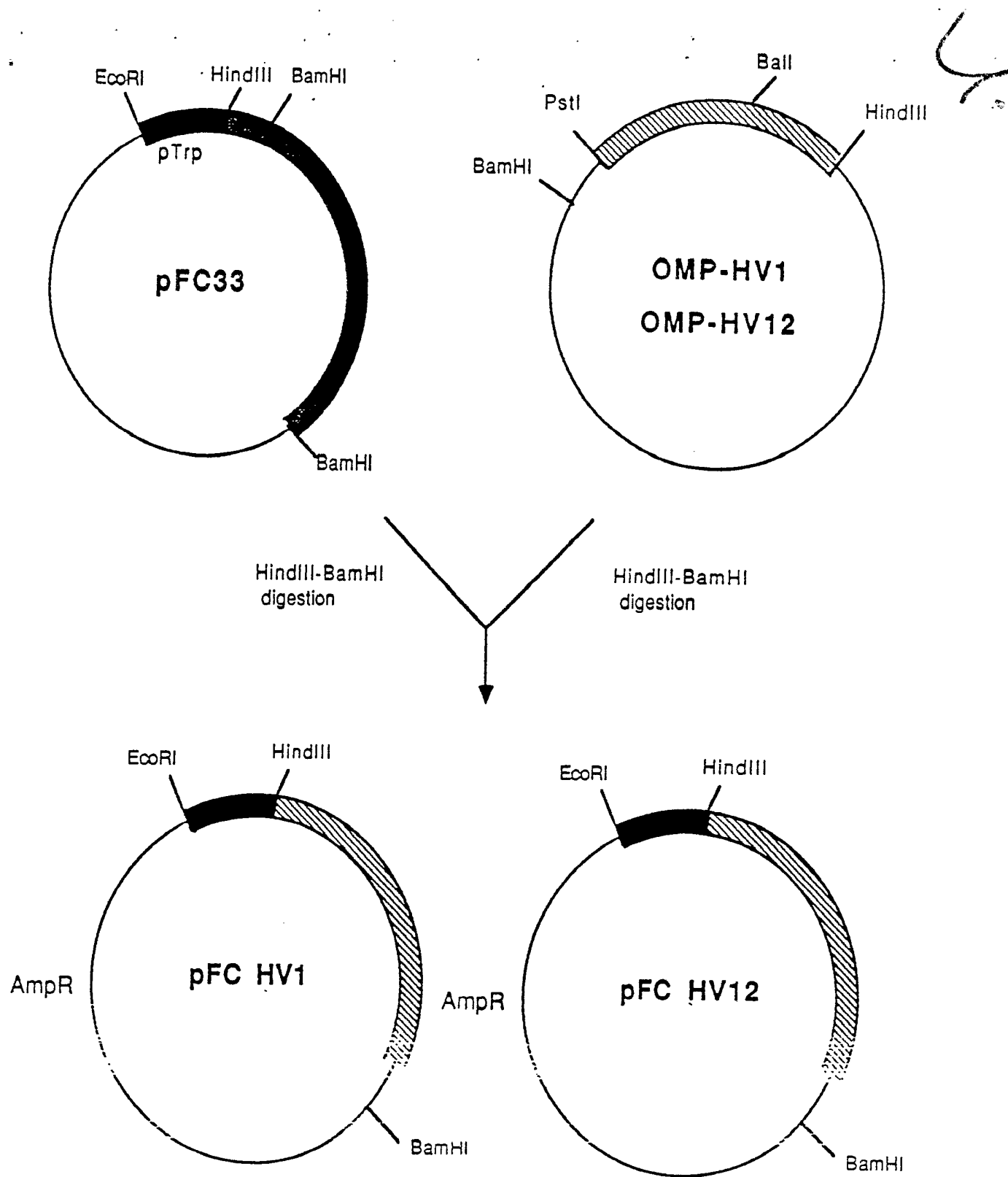


Fig.6

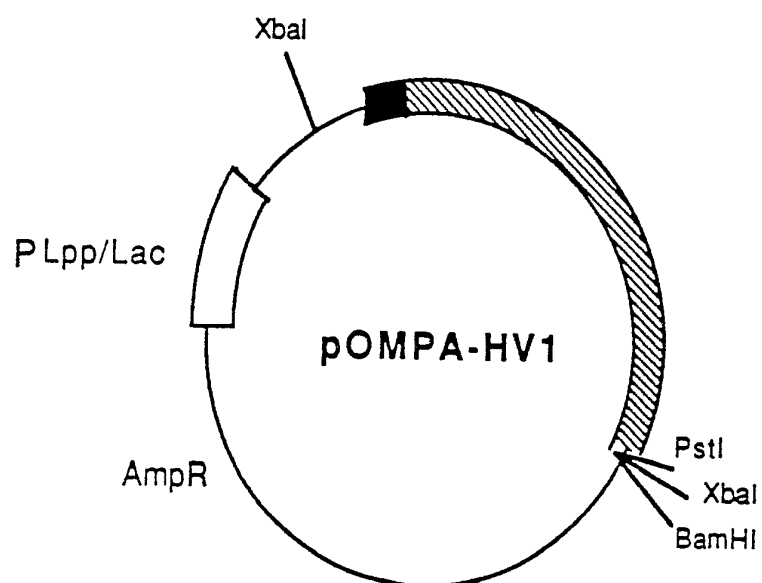


Fig.7

oligo 1 VSV

5' AGCTTGGATCCACTATGTAAGTGCCCTTTTGTACTTTPAGCCCTTTTATTCATTTGGGGTGAATTGCGTTTCTTACACCGACTGCACCGAATCTGG 3'

oligo 2 VSV

5' CCAGATTCCGGTGCCAGTCGGGTAAAGAAACGCCAATTGACCCCAATGAATAAAGGCTTAAGTACAAAGGCCACTTTCATAGTGGATCCA 3'

ASSEMBLING:

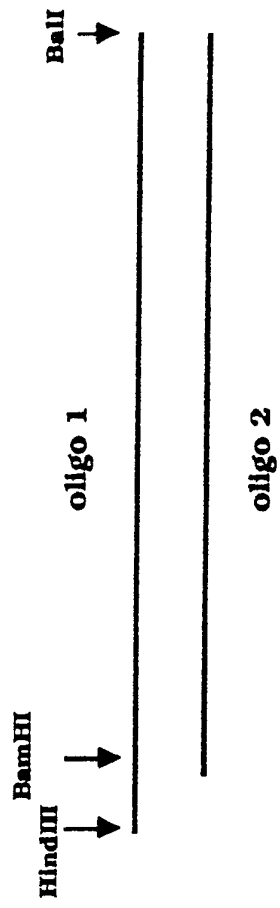


Fig. 8

✓

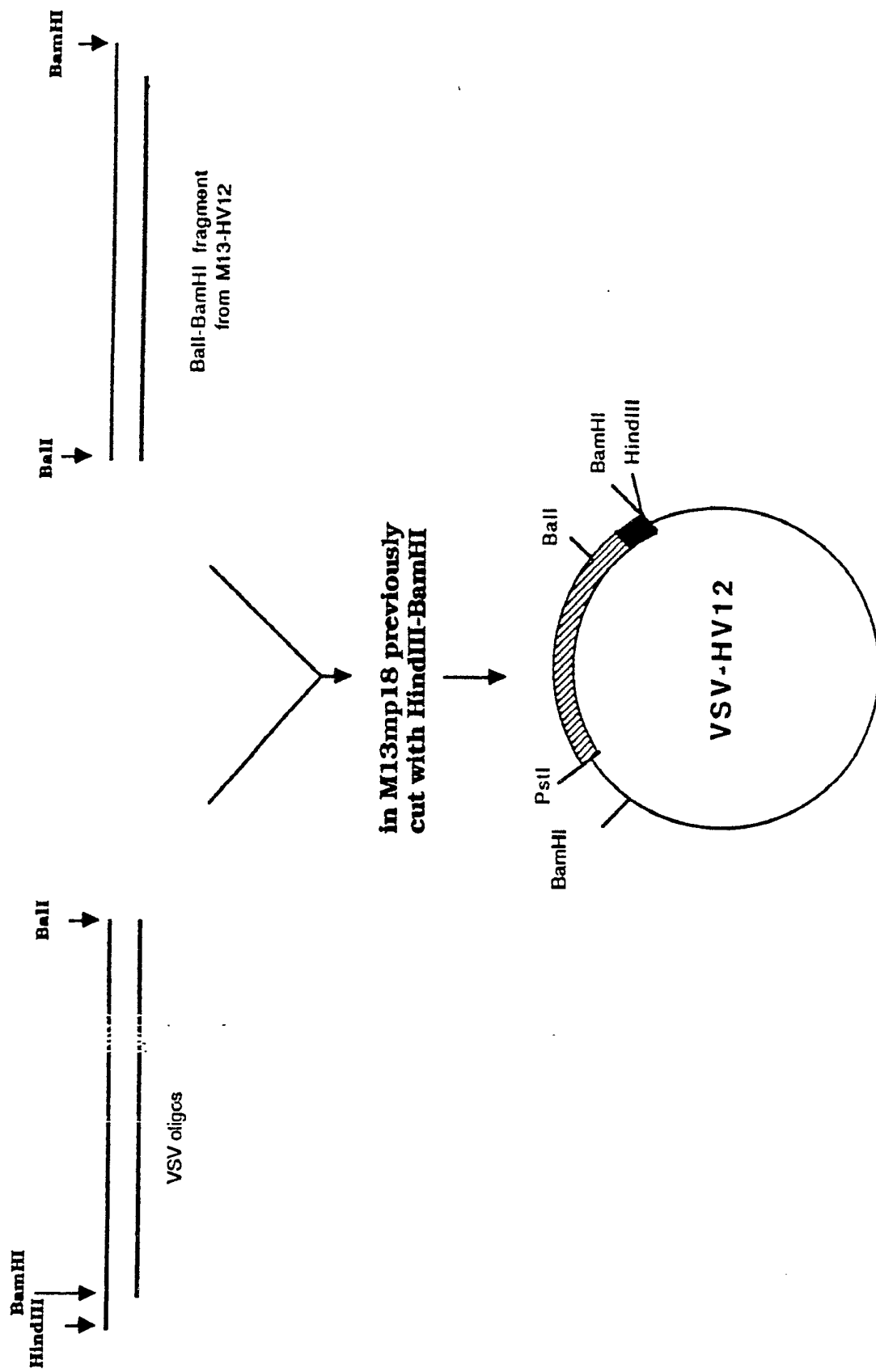


Fig. 9

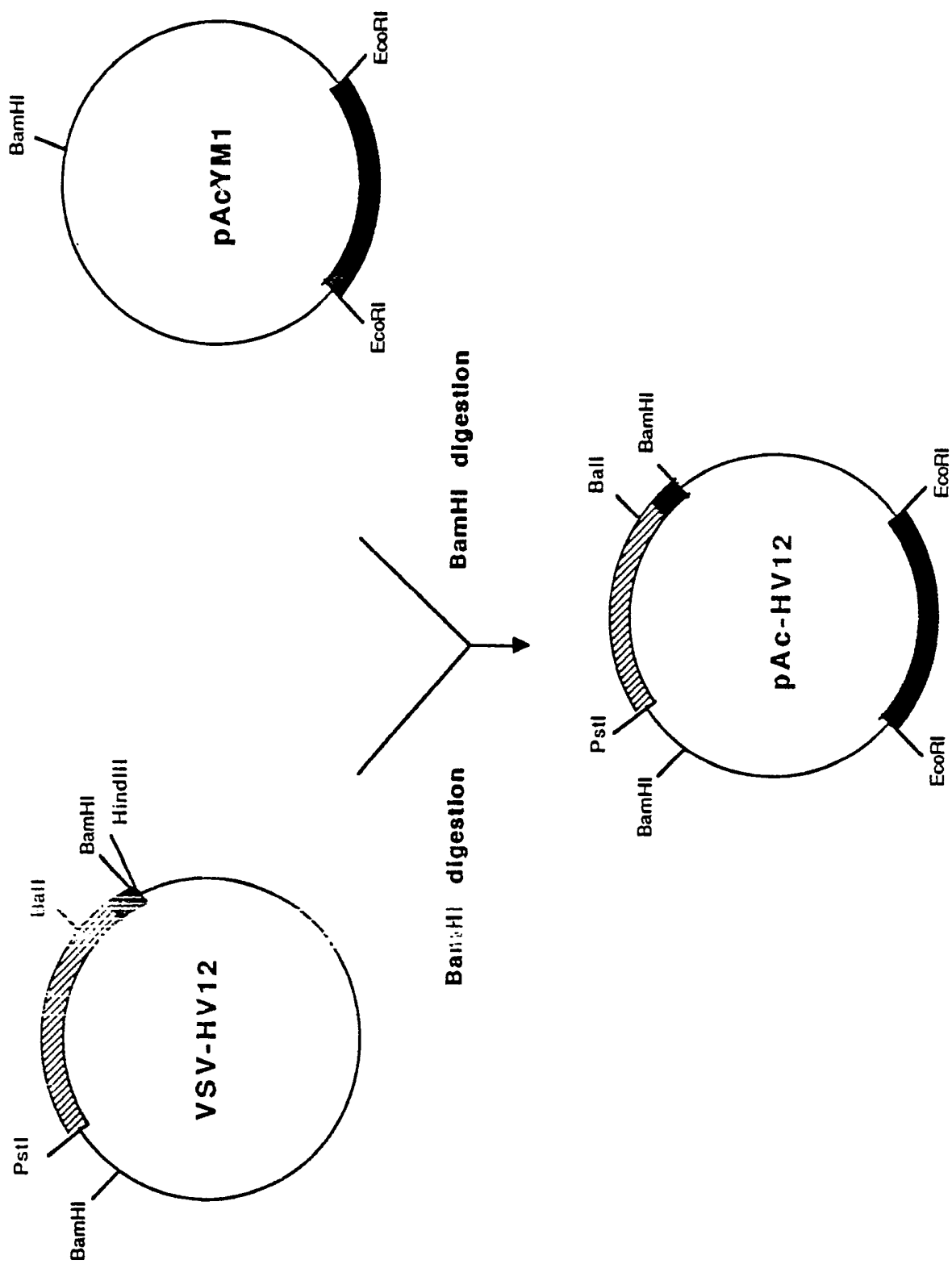


Fig. 10

oligo 1 fusion

5' GATCCATGGGTTTCTTACACCGACTGCACCGAATCTGG 3'

oligo 2 fusion

5' CCAGATTTCGGTGCAGTCGGTCTAAGAAACATG 3'

ASSEMBLING:

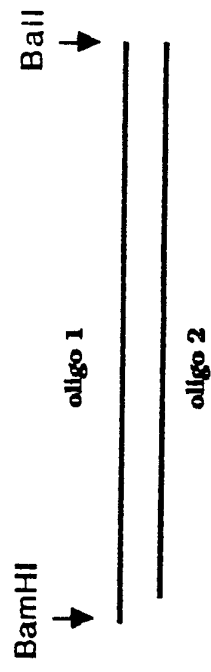


Fig. 11

✓

Oligo 1 polyhedrin

5'ATCATGGACATATTAAATGATATACCATCTCCCAATATATATTTTACTGTTTTTCGTACAGTTTTGTATATAAAACCTATATATATGCCGGATTATTCATACCGTCCACCATCGGG
CGTACCTACGTTGTACGACACACCG 3'

Oligo 2 polyhedrin

5'GATCCGGTGTGTCGTACACGTAGGTACGCCCGATGGACGATGATATATCCGGCATATTTATAGGTTTTTTTATTACAAACTGTTACGAAACAGTAAATACTTATTTTGGCAG
ATGGTTATCATTTTATTTATTC-CCATGAT 3'

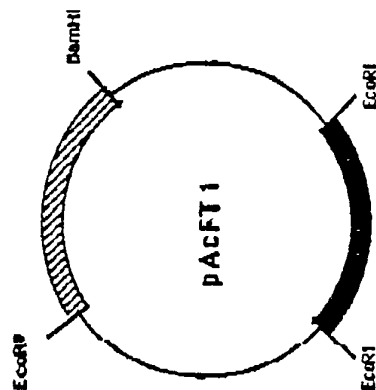
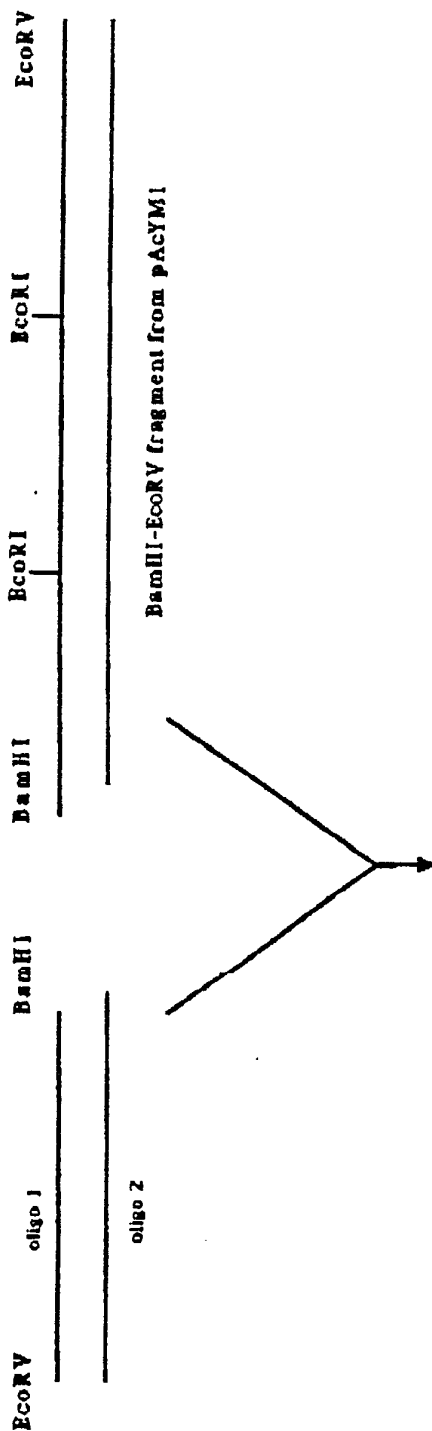


Fig. 12

✓

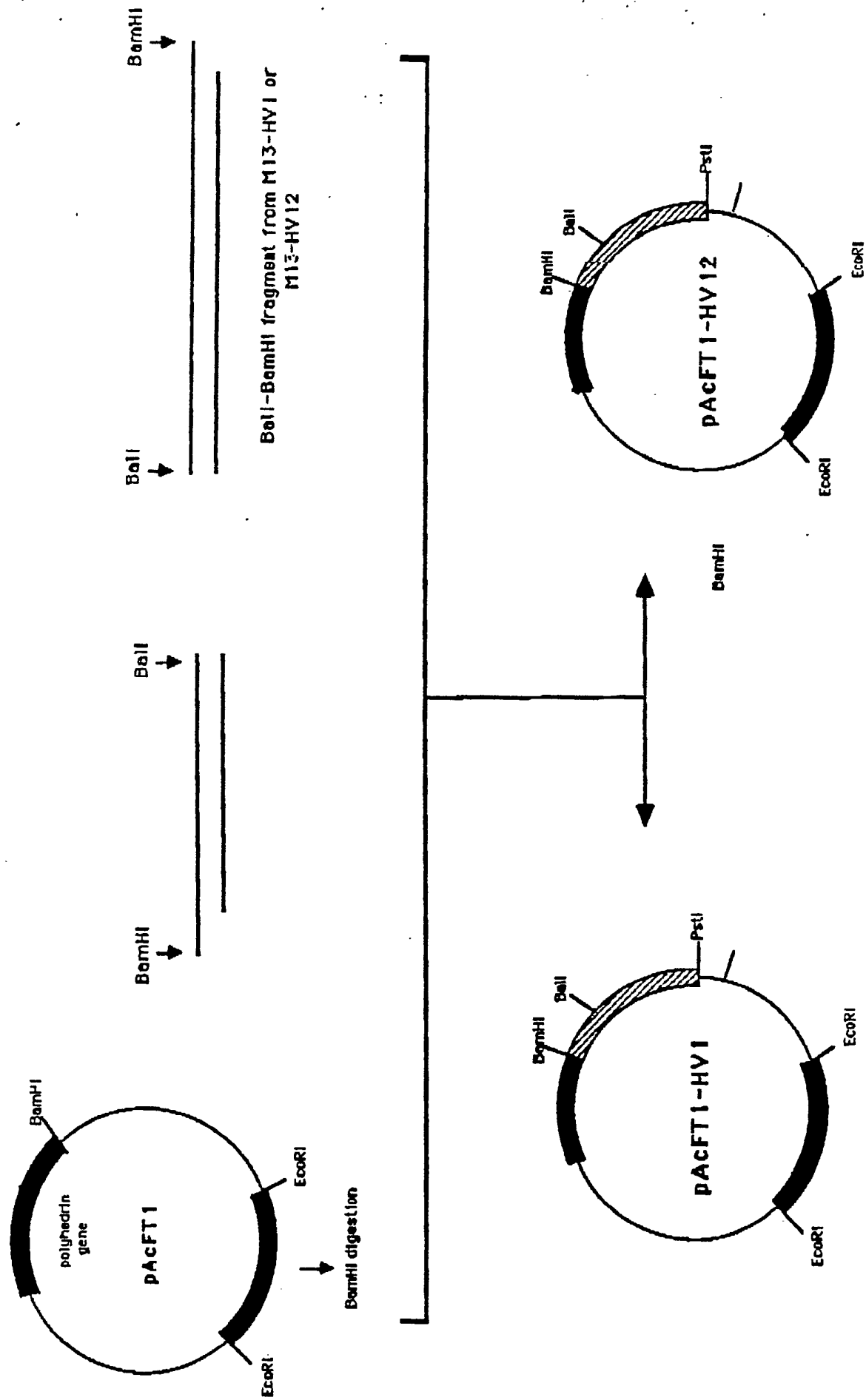


Fig.13