

**DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO**

N.º 87 239

REQUERENTE: THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED, britanica,
com sede em 183-193 Euston Road, London NW1
Reino Unido.

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PEPTÍDEOS".

INVENTORES: Michael James Francis e Berwyn Ewart Clarke

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883. Reino Unido em 16 de Abril de 1987, sob
o nº 8709274

Memória descritiva referente à patente de invenção de THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED, britânica, industrial e comercial, com sede em 183-193 Euston Road, London NW1, Inglaterra, (inventores: Michael James Francis e Berwyn Ewart Clarke, residentes na Inglaterra), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PEPTÍDEOS".

MEMÓRIA DESCRIPTIVA

A presente invenção refere-se a um processo para a preparação de peptídeos sintéticos do rinovírus humano (HRV), bem como à preparação de vacinas que contêm estes peptídeos.

A partícula HRV é constituída por uma molécula de ARN de cadeia simples mais 60 cópias das proteínas estruturais VP1 e VP3, 58 cópias das proteínas VP2 e VP4 e 2 cópias do seu precursor VPO (Medappa et al., 1971; Rueckert, 1976). A recente publicação da estrutura atómica do HRV tipo 14 (HRV14) (Rossmann et al., 1985) forneceu uma informação pormenorizada sobre a localização e a estrutura das proteínas VP1, VP2 e VP3 tal como ocorrem na superfície do vírião intacto.

As posições das substituições de ácidos aminados encontrados em mutantes resistentes à neutralização seleccionados por vários anticorpos monoclonais foram usa

das para a identificação de quatro locais antigenicos na partícula HRV14 (Sherry e Rueckert, 1985; Sherry et al., 1986). Estes locais foram designados por NIM-IA, NIM-IB, NIM-II e NIM-III, de acordo com a proteína viral na qual estes locais estão fundamentalmente situados. Mediante o uso de um anticorpo monoclonal foi também efectuado o mapeamento de um epítopo de neutralização na proteína VP2 de HRV2. Este epítopo inclui os resíduos de ácidos aminados de 153 a 164 (Skern et al., 1987). Estes doze resíduos são, usando o código de uma letra:

GREVKAETRLNP.

De acordo com Skern et al., verificou-se por análise das propriedades de ligação das proteínas expressas a partir de plasmídeos contendo um gene truncado da proteína VP2 que o local de ligação do anticorpo monoclonal se mantinha desde que as supressões da extremidade carboxi não se estendessem para além do ácido aminado 164. Não foi observada qualquer ligação logo que a supressão alcançou o ácido aminado 153. No entanto, a falta de um local de restrição adequado na sequência entre a extremidade N-terminal da proteína VP2 e a região VP2 de interesse impede uma definição da fronteira N-terminal do local de ligação do anticorpo monoclonal.

Os locais antigenicos que até agora foram identificados para HRV foram todos previstos a partir de trabalho sobre a partícula vírica. Não foi relatado qualquer trabalho usando peptídeos sintéticos. No entanto tem havido um interesse crescente no desenvolvimento de peptídeos sintéticos para uso em vacinas contra outros picornavírus, tais como o vírus da doença de pés-e-boca e o vírus de polio.

Nós produzimos agora peptídeos de seis determinantes imunogénicos previstos de HRV2. Verificou-se que quatro destes peptídeos reagem com soro de coelho anti-HRV2. Destes quatro, três produziam anti-soro que reagia bem com partículas víricas em análises por ELISA indirecta e por técnica de mancha de Western. No entanto, o anti-soro contra um destes peptídeos reagia com vírus numa análise por ELISA de sanduíche e num ensaio de imunoprecipitação e neutralisava in vitro a infectividade deste. Este peptídeo é:

VKAETRLNPDLQPTEC.

Por outras palavras, o peptídeo corresponde aos resíduos de ácidos aminados 156 a 170 da proteína VP2 de HRV2. Este peptídeo possui também um resíduo de cisteína carboxi-terminal não natural. Apenas nove dos resíduos de ácidos aminados do epítopo NIm-II propostos por Skern et al. estão presentes no peptídeo. Os peptídeos sintéticos que contêm esta sequência nonapeptídica são deste modo capazes de suscitar um anticorpo neutralisante contra HRV2.

Por conseguinte, a presente invenção proporciona peptídeos adequados para serem usados como vacinas, peptídeos estes que apresentam um epítopo que contém os resíduos de ácidos aminados 156 a 164 da proteína VP2 de HRV2 ou resíduos de ácidos aminados equivalentes de outro HRV. Estes ácidos podem ser substituídos por outros ácidos aminados que não afectem a antigenicidade do peptídeo. Os peptídeos podem ser preparados sob a forma de um conjugado ligado a um suporte fisiologicamente aceitável. Em alternativa, os peptídeos podem conter um suporte.

Os peptídeos da presente invenção contêm uma sequência eficaz antigenicamente. Esta sequência será designada como sequência NIm-II. Para HRV2, esta sequência é:

VKAETRLNO.

São resíduos de ácidos aminados equivalentes de outros HRV os resíduos de ácidos aminados de VP2 correspondentes aos resíduos de ácidos aminados de VP2 156 a 164 de HRV2. Por outras palavras, estes resíduos podem ser correspondentes aos resíduos de VP2 de outro serótipo de HRV. Estes resíduos podem ser facilmente determinados através do alinhamento da sequência VP2 de outro HRV com a sequência VP2 de HRV2. Esta determinação é possível devido à homologia entre as sequências VP2 de diferentes tipos de HRV. A Figura 1 anexa ilustra este facto. Nesta figura, foram alinhadas as sequências VP2 de HRV2 e de HRV14. É possível verificar-se que os resíduos 156 a 161 de HRV14 correspondem aos resíduos 156 a 164 de HRV2. Estes resíduos de HRV14, sublinhados na figura, são:

LSSANE.

É possível substituir um ou vários

ácidos aminados das sequências NIm-II definidas por um ou vários outros ácidos aminados que não afectem a antigenicidade do epítopo. Em consequência, um ácido aminado pode ser substituído por outro que conserve o carácter fisicoquímico do epítopo original, isto é, em termos de densidade de carga, hidrofilicidade/hidrofobocidade, dimensão e configuração, e deste modo conserve a estrutura imunológica. Por exemplo A pode ser substituído por G ou vice-versa; V por A, I ou G; K por R; S por T ou vice-versa; E por D ou vice-versa; e Q por N ou vice-versa. Tal como mencionado anteriormente, estas substituições são possíveis desde que não seja afectada a antigenicidade do epítopo.

Na sua forma mais simples, um peptídeo pode ser constituído pelos resíduos de ácidos aminados 156 a 164 da proteína VP2 de HRV2 ou pelos resíduos de ácidos aminados correspondentes de outro HRV. Para HRV2 e HRV14 estes peptídeos são, respectivamente:

VKAETRLNP e LASSANE.

Em alternativa, podem ser previstos peptídeos mais compridos apresentando o epítopo NIm-II. Podem ser adicionados outros resíduos de ácidos aminados adicionais numa ou a ambas as extremidades da sequência NIm-II. Deste modo, é possível construir um peptídeo com até 50 ou por exemplo com até 20 resíduos de ácidos aminados. Podem ser adicionados a qualquer das extremidades um, dois, três ou mais ácidos aminados. De acordo com uma forma de concretização da presente invenção, apenas se adicionam resíduos de ácidos aminados extra à extremidade carboxi-terminal. É possível adicionar até 30, por exemplo até 15 ou até 6 resíduos de ácidos aminados adicionais independentemente a cada extremidade do epitopo NIm-II.

Os resíduos de ácidos aminados que são adicionados à sequência NIm-II deriváveis de um HRV particular podem ser os existentes nas posições correspondentes da sequência VP2 para esse HRV. Por exemplo, o resíduo de ácido aminado na posição 165 da proteína VP2 de HRV2 é D. De preferência, por conseguinte, este é o primeiro resíduo na extremidade de carboxi-terminal do epítopo básico de HRV2. Os peptídeos preferidos construídos deste modo a partir de sequências de VP2 de HRV2 e de HRV14 são, respectivamente:

VKAETRLNPDLQPTE e LSSANEVGGPVK.

Para além disso, os peptídeos mais compridos podem conter também cópias múltiplas do epítopo NIm-II ou de sequências tal como as definidas anteriormente englobadas naquele epítopo. Também pode ser adicionado um resíduo de cisteína (C) a qualquer das extremidades ou a ambas as extremidades dos peptídeos presentes. Em particular, pode adicionar-se um resíduo de C apenas à extremidade carboxi-terminal. Este resíduo é adicionado a fim de facilitar o acoplamento ao suporte e/ou a fim de aumentar a imunogenicidade de um peptídeo.

O peptídeo pode ser ligado a um suporte a fim de criar um conjugado que é imunologicamente activo. Pode ser utilizado qualquer suporte apropriado fisiologicamente aceitável. Por exemplo, o suporte pode ser albumina de soro de bovino, tiroglobulina, ovalbumina ou hemocianina de Megathura crenulata ("keyhole limpet hemocyanin"). O peptídeo pode ser ligado a toxoide de tétano e/ou a toxoide de difteria, proporcionando simultaneamente tanto um imunogénio como uma vacina multivalente.

Para além deste procedimento em que uma sequência suporte é ligada a um peptídeo, é possível preparar um peptídeo que incorpora em si mesmo um sequência suporte para o epítopo de VP2. A sequência NIm-II ou a sequência de um peptídeo mais comprido podem ser ligadas a uma sequência suporte ou conter em si essa sequência suporte. Proporciona-se uma sequência suporte heterologa. Por sequência suporte heterologa entende-se que a sequência total do peptídeo, por exemplo uma proteína de fusão contendo a sequência NIm-II e a sequência suporte não correspondem à totalidade ou a parte da sequência da proteína VP2 de um HRV particular. A sequência suporte pode nem ser uma sequência de HRV. A proteína suporte é escolhida de tal modo que o produto resultante seja fisiologicamente aceitável.

Os peptídeos da presente invenção são peptídeos sintéticos. Podem ser preparados por síntese química a partir de ácidos aminados isolados e/ou de peptídeos já formados contendo dois ou mais resíduos de ácidos aminados. Podem ser utilizados métodos de síntese em fase sólida ou em solu-

ção. Em alternativa, os peptídeos podem ser preparados por metodologias de ADN recombinante. Para este fim, prepara-se uma sequência de ADN que codifica para uma sequência NIm-II ou para uma sequência mais comprida que englobe a sequência NIm-II. Prepara-se um vector de expressão contendo a sequência de ADN que tem a capacidade de expressão do peptídeo quando fornecido a um hospedeiro adequado. A sequência de ADN está localizada entre os sinais de início e de fim de tradução. Também se proporcionam elementos de regulação de transcrição adequados, em particular um promotor para a sequência de ADN e um local de terminação de transcrição. A sequência de ADN é proporcionada no quadro correcto de modo a permitir a ocorrência da expressão do peptídeo num hospedeiro compatível com o vector.

Pode ser utilizado qualquer sistema hospedeiro-vector apropriado. O vector pode ser um plasmídeo. Nesse caso pode utilizar-se um hospedeiro bacteriano ou uma levedura. Em alternativa, o vector pode ser um vector viral. Este pode ser usado para transfetar células ou uma linha de células de mamífero a fim de causar a expressão de peptídeos.

O vector viral pode ser um vírus de variola bovina recombinante. Normalmente, insere-se uma sequência de ADN que codifique para uma sequência NIm-II ou para uma sequência mais longa que inclua a sequência NIm-II num vector plasmídico a juntar de um promotor do vírus de variola bovina e flanqueado por sequências de quinase de timidina (TK) de variola bovina. O vector de recombinação resultante é introduzido em células infectadas pelo vírus de variola bovina. Como resultado de recombinação homóloga, gera-se um vírus de variola bovina recombinante TK⁻ que expressa o peptídeo.

Um exemplo da utilização de tecnologia de ADN recombinante para tornar o epítopo de NIm-II parte dumha proteína de fusão é o seguinte. É o possível proporcionar uma sequência de ADN que codifique para uma proteína de fusão contendo hemaglutinina (HA) do vírus da gripe num local do qual se proporciona o epítopo NIm-II normalmente ocupado por um epítopo antigénico natural. Por outras palavras, a totalidade ou parte de um epítopo antigénico natural de HA podem ser substituídas por um elemento epítopo NIm-II ou por uma sequên-

cia mais comprida contendo a sequência NIm-II.

Para a expressão da proteína de fusão, integra-se a sequência de ADN num vector de expressão. A sequência de ADN é integrada num vector de tal modo que o vector, quando fornecido a uma célula procariótica, tenha a capacidade de expressar a proteína de fusão. Torna-se necessária uma célula hospedeira para a glicosilação correcta de HA. O vector pode ser um vector viral que integra uma sequência de ADN de tal modo que a proteína de fusão seja expressa pelas células infectadas pelo vector. Uma vacina pode conter um vector viral como estes e uma substância veicular ou um diluente fisiologicamente aceitável. Neste caso, o vector viral é de preferência um vírus da varíola bovina recombinante que contém a sequência de ADN. Em alternativa, uma vacina pode conter uma proteína de fusão e uma substância veicular ou um diluente fisiologicamente aceitável.

A HA do vírus da gripe é uma proteína de membrana integral. Quando expressa em células infectadas por vírus recombinantes de varíola bovina, a proteína HA de fusão está normalmente glicosilada e é transportada para a superfície da célula através da qual fica saliente. Aqui apresenta o epítopo NIm-II do lado de fora da superfície celular. Normalmente, prevê-se o epítopo NIm-II no local antigénico A de HA.

Outro exemplo do uso da tecnologia de ADN recombinante para preparar uma proteína de fusão para apresentar o epítopo NIm-II ao sistema imune consiste na produção de uma proteína de fusão contendo HBcAg a cuja extremidade amino-terminal está ligado um epítopo NUM-II. Esta proteína de fusão pode ser expressa do mesmo modo que a proteína de fusão HA excepto em que se pode empregar qualquer sistema hospedeiro compatível e não apenas um hospedeiro eucariótico. Também apenas a proteína de fusão que pode ser usada para vacina como HBcAg não é uma proteína de superfície. O epítopo NIm-II pode ser fundido directamente à proteína HBcAg. Em alternativa, o epítopo pode ser fundido à proteína HBcAg por meio da intervenção dum adaptador. Este adaptador pode ser constituído por um ou mais, por exemplo até dez, resíduos de ácidos aminados.

Os peptídeos da presente invenção podem aumentar o nível de anticorpos de neutralização. Estes peptídeos podem portanto ser usados em seres humanos como vacinas. A vacinação é efectuada por administração a um paciente de uma quantidade eficaz de um peptídeo. Pode ser adoptada uma via oral ou via parenteral, como seja a via sub-cutânea, intravenosa ou intramuscular. Normalmente, administra-se um peptídeo numa quantidade de 1 a 1000 ug por dose, de preferência 10 a 100 ug por dose, quer por via oral ou por via parenteral. No caso de se utilizar um vector viral capaz de expressar uma proteína de fusão HA como vacina, as vias de administração e a quantidade de vírus dada são as mesmas. Para um vírus recombinante da varíola bovina, este pode ser administrado por via dermal.

Para finalidade de vacinação, formula-se normalmente um peptídeo com uma substância veicular ou com um diluente farmaceuticamente aceitável. Podem ser usadas formulações, substâncias veiculares, adjuvantes e diluentes normais. Estes serão evidentemente determinados pela via de administração.

As vacinas administradas a pacientes incluirão de preferência não apenas um peptídeo contendo um epítopo NIm-II mas também outros抗原es. Estes podem estar sob a forma de peptídeos contendo um epítopo NIm-II ou um tipo diferente de HRV e/ou outros epítopos de HRV.

Os seguintes exemplos ilustram a invenção.

Nos desenhos anexos:

A Figura 1 mostra as sequências VP2 para HRV2 e para HRV14;

A Figura 2 é o Espectro de Massa de Bombardamento por Atomos Rápidos (FABMS) da região do ião molecular do peptídeo 4 (Exemplo 1);

A Figura 3 mostra os resultados da imunoprecipitação de HRV2 purificado por soros anti-peptídeo para a sequência NIm-II (Exemplo 2); e

A Figura 4 mostra os resultados da análise de mancha de Western de soros anti-peptídeo de HRV2.

Exemplo 1: Preparação de peptídeos

Por referência a um modelo gráfico de computador de HRV14 (gerado por Dr. D. Stuart, Departamento de Biofísica Molecular, Universidade de Oxford, GB usando coordenadas fornecidas por Dr. M.G. Rossmann) e por alinhamento de sequências de HRV14 com HRV2, outro serótipo do vírus (Stanway et al., 1984; Skern et al., 1985; Callahan et al., 1985), nós seleccionámos um certo número de locais imunogénicos potencialmente importantes de HRV2 (três de VP1, um de VP2 e dois de VP3) para avaliação usando peptídeos sintéticos. As sequências e as localizações dos peptídeos de HRV2 produzidos são dados no Quadro 1. Realizou-se a síntese usando uma adaptação da técnica de Marrifield (1963) descrita por Houghten (1985). Cada peptídeo tinha um resíduo adicional de cisteína não natural na extremidade C-terminal a fim de facilitar o acoplamento da hemocianina de *Megathura crenulata* (Keyhole limpet haemocyanin = KLH).

Na figura 2 apresenta-se um Espectro de Massa de Bombardamento por Atomos Rápidos (FABMS) da região do ião molecular do peptídeo 4 (peso molecular 1811, 922). O espectro de FAB mostra um ião $(M + H)^+$ para o composto esperado a M/Z 1813, confirmando deste modo o peso molecular proposto.

Exemplo 2: Ensaios dos peptídeos

Os peptídeos foram inicialmente ensaiados in vitro a fim de determinar a respectiva reactividade com soro de coelho anti-HRV2 usando uma análise por ELISA indirecta na qual se escrutinou uma gama de concentrações de peptídeos ligados à fase sólida com um excesso de anti-soro. Esta técnica identificou quatro peptídeos reactivos, dois de VP1, um de VP2 e um de VP3 (Quadro 1).

Estes quatro peptídeos foram portanto seleccionados para imunização após acoplamento a KLH pelo método de MBS (Liu et al., 1979). Inocularam-se pares de coelhos intramuscularmente com 500 ug de cada peptídeo emulsionado com adjuvante de Freund completo e reinoculou-se por via subcutânea 42 dias mais tarde com a mesma dose emulsionada com adjuvante de Freund incompleto. Monitorizaram-se amostras de soro a intervalos de 14 dias para verificação de actividade anti-peptídeo.

Todos os coelhos produziram anticorpos anti-peptídeo que podiam ser detectados 14 dias após a primeira inoculação e nas amostras de sangue final colhidas 28 dias após a revacinação a actividade anti-peptídica ia de $3,7 \log_{10}$ a $4,7 \log_{10}$ de acordo com determinações por ELISA indirecta (Quadro 2).

Os soros anti-peptídeo foram subsequentemente analisados para detecção de actividade anti-HRV2 usando vários sistemas diferentes de análise, nomeadamente ELISA indirecta, ELISA de "sandwich", imunoprecipitação e neutralização (Quadro 2). Todos os anti-soros reagiam com HRV2 numa análise por ELISA indirecta, dando os anti-soros relativos aos peptídeos 3, 4 e 6 títulos significativamente mais elevados ($3,1 \log_{10}$ a $5,2 \log_{10}$) do que os anti-soros relativos ao peptídeo 2 ($1,5 \log_{10}$ a $1,8 \log_{10}$). No entanto, apenas o anti-soro de coelho número 5 inoculado com o peptídeo 4 de VP2 reagiu bem numa análise por ELISA de "sandwich".

A diferença nos resultados com as duas análises está provavelmente relacionada com o grau de distorção das partículas víricas induzida pelo método de ligação à fase sólida (McCullough et al., 1985). A ligação directa a uma superfície plástica, como na ELISA indirecta, causa uma distorção de outro picornavírus, o vírus da doença de pés-e-boceca, por exposição de locais antigénicos não normalmente acessíveis a anticorpos peptídicos. A análise por ELISA de "sandwich" impõe uma menor alteração física das partículas víricas uma vez que estas estão aprisionadas pelo antícorpo imobilizado.

Uma vez que ambas as técnicas de ELISA podem distorcer o vírus, em maior ou menor grau, deixou-se também que os soros reagissem em solução com partículas de HRV2 purificadas marcadas com ^{32}S -metionina e precipitou-se usando espectros de estafilococos A. Apenas os soros relativos ao peptídeo 4 mostraram qualquer precipitação significativa do vírus (Quadro 2). No entanto, o grau de precipitação observado era significativamente diferente entre os dois soros de coelho ensaiados (Fig. 1). O anti-soro do coelho número 5 (●—●) precipitou >90 % do vírus marcado, enquanto que o do coelho número 6 (○—○) precipitou apenas 58 % (na mesma análise (■—■) representa anti-soro de coelho normal). Este resultado é prova-

velmente devido a uma diferença nas afinidades funcionais globais dos dois anti-soros para com partículas nativas de rinovírus. O anti-soro que era mais activo na precipitação do vírus era também o que reagia na ELISA de "sandwich".

Todos os anti-soros de peptídeos foram também experimentados para avaliação da respectiva capacidade de neutralizar o vírus. Incubaram-se os anti-soros sem diluição e com uma diluição de 1:4 cada um com uma série de diluições de vírus e obteve-se a diferença de título em log_{io} com vírus mais soro de coelho normal, tomando-se o vírus mais soro anti-peptídeo como índice de neutralização. Usando esta técnica apenas o anti-soro relativo ao peptídeo 4 revelou actividade de neutralização, detectando-se uma actividade significativamente mais elevada com o anti-soro do coelho número 5 em relação ao do coelho número 6 (Quadro 2). Era este anti-soro que reagia melhor nas análises por ELISA de "sandwich" e de imunoprecipitação. Uma vez que ambos os soros tinham níveis semelhantes de actividade anti-peptídica, a diferença observada na análise de neutralização de anticorpos deve ser devida a diferenças qualitativas nas populações de anticorpos com respeito à conformação do epítopo que reconhecem.

Finalmente, levou-se a efeito uma análise de mancha de Western a fim de determinar se os anti-soros de peptídeos reconheciam proteínas virais isoladas de modo específico. Em contraste com o soro anti-HRV2 policlonal (pista 1), que não reagiu, todos os anti-peptídeo reagiram com a proteína viral correspondente, tendo os anti-soros relativos aos peptídeos 3 (pista 3), 4 (pista 4) e 6 (pista 5) a reactividade mais alta (Figura 4; pista 2 é o anti-soro relativo ao peptídeo 2). Estas observações confirmam os resultados da ELISA indirecta. Para além disso o anticorpo monoclonal descrito por Skern et al., (1987) que cobre o local do nosso peptídeo 4 também reagiu em análise de mancha de Western. Em geral as reacções eram específicas para cada proteína, se bem que o anti-soro relativo ao peptídeo 3 apresentasse reacção cruzada com VP2 e VP3 e o anti-soro relativo ao peptídeo 4 apresentasse reacção cruzada num grau limitado com VP1. No entanto o nível da reactividade cruzada é tão baixo que os anti-soros

constituirão reagentes de marcação úteis para as proteínas viais.

Exemplo 3: peptídeo de HRV 14

Foi sintetizado um peptídeo para a sequência LSSANEVGGPVKC usando uma adaptação da técnica de Merrifield (1963) descrita por Houghten (1985). Na extremidade C-terminal do peptídeo colocou-se um resíduo de cisteína não natural. O peptídeo foi acoplado a KLH (5 mg de peptídeo/3,2 mg de KLH).

A actividade do peptídeo foi analisada. No dia 0 inocularam-se por via intramuscular (i.m.) 500 ug do peptídeo acoplado a KLH em dois coelhos usando adjuvantes de Freund completo. No dia 42 inocularam-se i.m. outros 500 ug do peptídeo acoplado a KLH em cada coelho usando adjuvante de Freund incompleto. Sangraram-se os dois coelhos no dia 84. Mediram-se as actividades anti-peptídeo e anti-HRV14 por ELISA indirecta. Os resultados são apresentados no Quadro 3 abaixo.

QUADRO 3

	ELISA indirecta (50% de DO máx.)	Indice de neutralização
	<u>Peptídeo</u>	<u>HRV14</u>
Coelho nº. 1	3,7*	3,8
Coelho nº. 2	4,1	>4,0

* log₁₀

REFERÉNCIAS

Callahan et al. (1985) Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 82, 732-736

Houghten (1985) Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 82, 5131-5135

Liu et al (1979) Biochemistry 18, 690-697

McCullough et al (1985) Journal of Immunological Methods 82, 91-100

Medappa et al (1971) Virology 44, 259-270

Merrifield (1963) Journal of the American Chemical Society 85, 2149-2154

Rossmann et al (1985) Nature, London 317, 145-153
 Rueckert (1976) In Comprehensive Virology, Vol 6, pp.
 131-213. Edited by H. Fraenkel-Conrat & R.R. Wagner,
 Plenum Press, New York
 Sherry and Rueckert (1985) Journal of Virology 53, 137-143
 Sherry et al (1986) Journal of Virology 57, 246-257
 Skern et al (1985) Nucleic Acids Research 13, 2111-2126
 Skern et al (1987) Journal of General Virology 68, 315-323
 Stanway et al (1984) Nucleic Acids Research 12, 7859-7875

Quadro 1 - PEPTÍDEOS DO RINOVÍRUS HUMANO TIPO 2: LOCALIZAÇÃO,
SEQUÊNCIA E REACTIVIDADE COM SORO ANTI-HRV2.

Número do peptídeo	Proteína viral	Localização	Sequência de ácidos aminados	Reactividade com soros anti-HRV2* (ELISA INDIRECTA)
1	VPI	NIm-IIA/ NIm-IB	KLEVTLANYNKENFTC	-
2	VPI	duas partes de NIm-II	KHIHKDIGHC [†]	++
3	VPI	Extremidade carboxi-terminal Parte de NIm-II	IQTAIIVTRPITTACPSIMYC	++++
4	VP2	NIm-II	VKAETRLNPDIQPTEC	+++
5	VP3	NIm-III	VLQSSINAPDKC	-
6	VP3	Extremidade carboxi-terminal "Edge of canyon" [‡]	FCLRMARDINLHQSGATAQC	++

- * Concentração de peptídeo reactivo com anti-soro:
++++ 0,01 ug/ml, +++ 0,1 ug/ml, ++ 1 ug/ml, + 10 ug/ml e
- 100 ug/ml.
- + Rossmann et al., 1985.
- † Esta sequência não é contígua na estrutura primária de VPl.

Quadro 2 - Análise de soros de peptídeos anti-HRV2 de coelho

Número do peptídeo	Proteína viral	Coelho número	ELISA indirecta*		ELISA de "sandwich" +	Indice de neutralização (Log ₁₀)	
			Anti-peptídeo	anti-vírus		Não diluição 1:4	Não diluição 1:4
1	VPI	1	3,7	1,5	1,0	0,3	0
		2	4,2	1,8	1,0	0,3	0
2	VPI	3	3,8	4,9	1,0	0,3	0
		4	4,3	3,9	1,0	0,3	0,1
3	VP2	5	4,7	5,2	1,6	3,7	2,4
		6	4,6	4,2	1,0	2,5	0,6
4	VP3	7	4,3	3,1	1,0	0,3	0
		8	4,0	3,8	1,0	0,3	0
6							

* Log₁₀ da diluição que dá 50% de D.O.

+ Log₁₀ da diluição que precipita 50% do conteúdo.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

- 1^a -

Processo para a preparação de um peptídeo sintético adequado para utilização como vacina contra um rinovírus humano (HRV) e que apresenta um epítopo que comprehende os resíduos dos ácidos aminados 156 a 164 de VP2 ou de HRV tipo 2 ou resíduos de ácidos aminados equivalentes de outro HRV, sendo opcionalmente um ou mais destes resíduos substituídos por um ou mais resíduos de outros ácidos aminados de modo a que a antigenicidade do peptídeo não seja afectada, caracterizado por compreender as fases de sintetizar por via química o referido peptídeo a partir de ácidos aminados isolados e/ou de peptídeos de dois ou de mais resíduos de ácidos aminados previamente preparados.

- 2^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por o referido peptídeo ser composto de um máximo de 20 resíduos de ácidos aminados.

- 3^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por o referido peptídeo conter um máximo de 15 resíduos de ácidos aminados depois da extremidade carboxi-terminal do referido epítopo.

- 4^a -

Processo de acordo com qualquer das

~~CONFIDENCIAL~~

- reivindicações 1 a 3 caracterizado por o referido peptídeo conter adicionalmente um resíduo de cisteína não natural numa das extremidades ou em ambas.

- 5^a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4 caracterizado por o referido peptídeo ter incorporado numa sequência suporte heteróloga em relação ao referido epítopo.

- 6^a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4 caracterizado por compreender adicionalmente uma fase de ligação do peptídeo protegido a um suporte fisiológicamente aceitável.

- 7^a -

Processo para a preparação de um peptídeo sintético adequado para utilização como vacina contra um rinovírus humano (HRV) e que apresenta um epítopo que comprehende os resíduos dos ácidos aminados 156 a 164 de VP2 ou de HRV tipo 2 ou resíduos de ácidos aminados equivalentes de outro HRV sendo opcionalmente um ou mais destes resíduos substituídos por um ou mais resíduos de outros ácidos aminados de modo a que a antigenicidade do peptídeo não seja afectada; ou uma proteína de fusão na qual o referido peptídeo se encontra ligado a uma sequência de suporte heteróloga adequada para esse fim; caracterizado por compreender as fases de:

(i) preparação de um vector de expressão incorporando uma sequência de ADN que codifica para o referido peptídeo ou proteína de fusão e que possui a capacidade de expressar o

referido peptídeo ou proteína de fusão quando presente num hospedeiro apropriado e

(ii) integrar o referido vetor de expressão no referido hospedeiro de modo a possibilitar a ocorrência da expressão do peptídeo ou proteína de fusão.

- 8^a -

Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por o referido peptídeo ser composto de um máximo de 20 resíduos de ácidos aminados.

- 9^a -

Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por o referido peptídeo conter um máximo de 15 resíduos de ácidos aminados depois de extremidade carboxi-terminal do referido epítopo.

- 10^a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 7 a 9 caracterizado por a sequência suporte referida ser HBcAg.

- 11^a -

Processo para a preparação de uma vacina caracterizado por se incorporar numa formulação um peptídeo quando preparado de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 9 em conjunto com uma substância veicular ou um diluente farmaceuticamente aceitáveis.

A requerente declara que o primeiro pedido desta patente foi apresentado no Reino Unido em 16 de Abril de 1987, sob o nº. 8709274.

Lisboa, 14 de Abril de 1988.

A handwritten signature in black ink, appearing to be a stylized form of the name "José M. Gómez".

RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PEPTÍDEOS"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de um peptídeo sintético adequado para utilização como vacina contra um rinovírus humano (HRV) e que apresenta um epítopo que comprehende os resíduos dos ácidos aminados 156 a 164 de VP2 ou de HRV tipo 2 ou resíduos de ácidos aminados equivalentes de outro HRV, sendo opcionalmente um ou mais destes resíduos substituídos por um ou mais resíduos de outros ácidos aminados de modo a que a antigenicidade do peptídeo não seja afectada; que comprehende as fases de sintetizar por via química o referido peptídeo a partir de ácidos aminados isolados e/ou de peptídeos de dois ou de mais resíduos de ácidos aminados previamente preparados.

SPTVEACGYSDRIIQITRGDSTITSQDVANAIVAYGVWPHYLSSKADASIDKPSQPDTSNNRFYTLRSVTWSSS-SKGWW
 SPNVEACGYSDRVQQITLGNSTITQEAAANAVCYAEWPEYLPPDVADSVNKTSKPDTSVCRFYTLDSKTW-TTGSKGWC
 WKLPDALKDMGIFGENMFYHYLGRSGYTIHVCNAASKFHQGTILIVALIPEHQIASALHGNVNNGYNTHPGETGREVKAE
 WKLPDALKDMGVFQNMFFHSLGRSGYTVHWQCNATKFHSGCCLVVVIPEHQLASHEGGNVSVKTFTHPGERGIDLSSA
 TRLNPDLQPTEEYWLNF-DGTLGNITIFPHQFINLRSNNNSATIIAPYVNAVPMDSMRSRSHNNWSLVIIPICPLE-TSSAI
 ---NEVG-GPVKDVIYNMNGTLLGNLLIFPHQFFINLRTNNATIVIPIYINSWP1DSMTRHNNVSLMVIPIAPLTVPIGAT
 NTIPITISISPMCAEFSGAR---AKRQ
 PSLPITVTAAPMCTEFSGIRSXSIVP-Q

FIG. 1

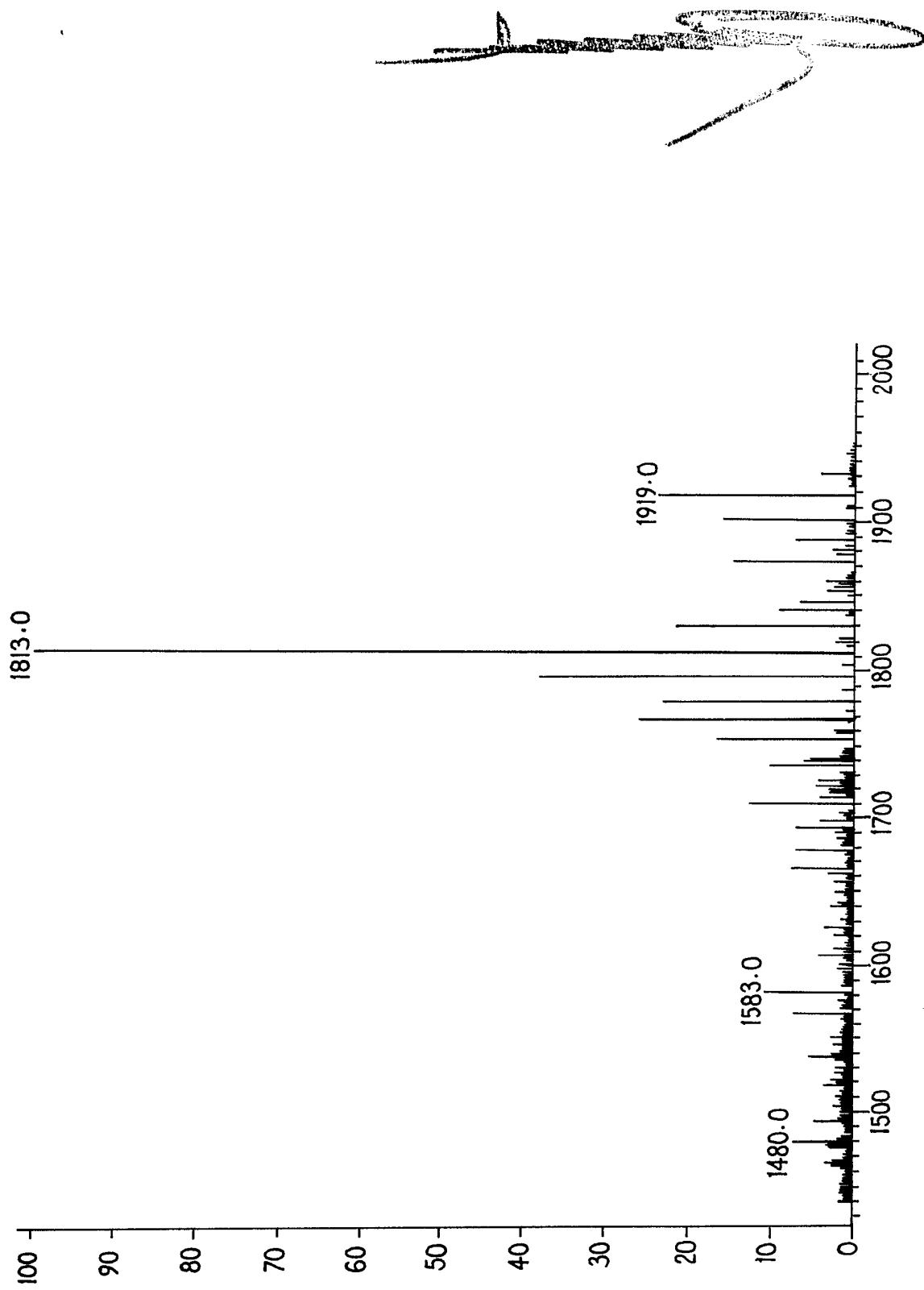


FIG.2

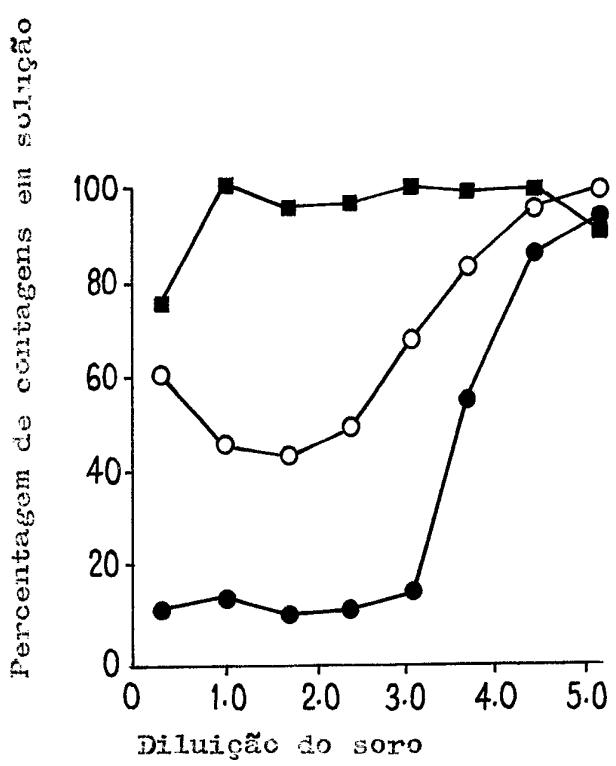


FIG. 3

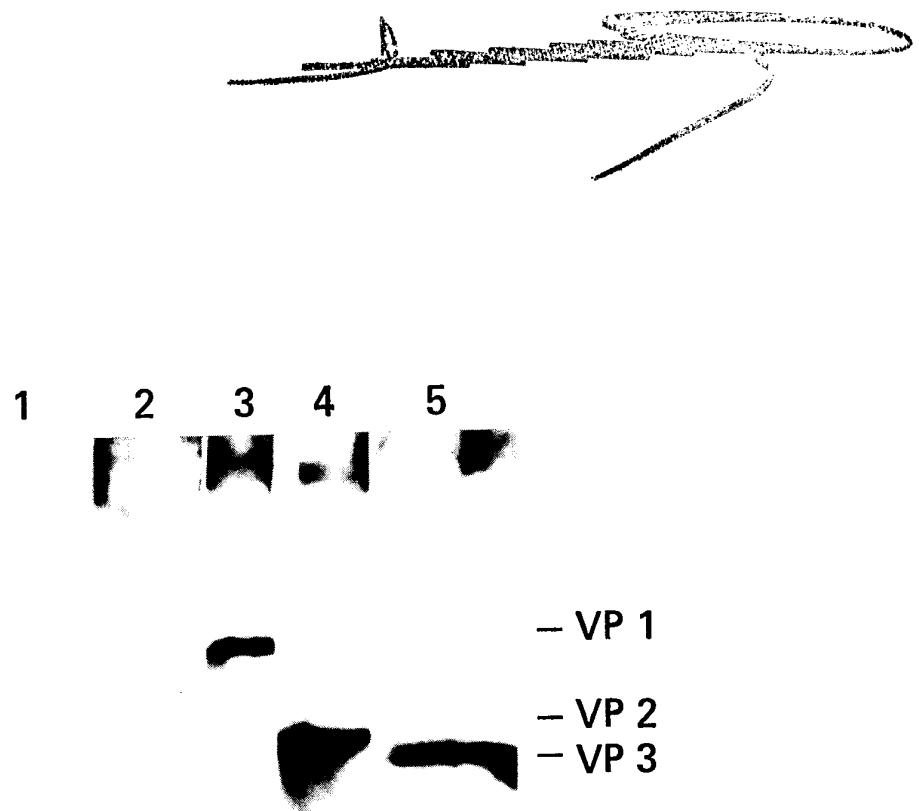


FIG.4