(11) Número de Publicação: **PT 1480671 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 39/155 (2006.01) ***C07K 14/135*** (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2001.11.28**

(30) Prioridade(s): **2000.11.28 US 724416**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.12.01**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.08.08**
125/2007

(73) Titular(es):
MEDIMMUNE VACCINES, INC.
297 NORTH BERNARDO AVENUE MOUNTAIN VIEW, CA 94043 **US**

(72) Inventor(es):
HONG JIN **US**
RODERICK TANG **US**
SHENGQIANG LI **US**
MARTIN BRYANT **US**

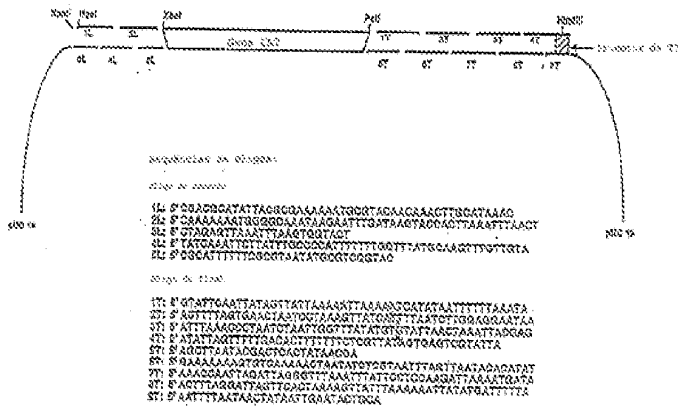
(74) Mandatário:
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE VÍRUS RSV RECOMBINANTE E VACINAS**

(57) Resumo:

RESUMO

"Sistemas de expressão de vírus RSV recombinante e vacinas"



O presente invento refere-se a vírus sinciciais respiratórios recombinantes e concebidos por engenharia genética e vectores virais que contêm deleções de diferentes genes virais acessórios quer sozinhos quer em combinação. De acordo com o presente invento, os vectores virais e os vírus sinciciais respiratórios recombinantes são concebidos por engenharia genética para conterem deleções completas dos genes virais acessórios M2-2, NS1, NS2 ou SH ou diferentes combinações dos mesmos. Adicionalmente, o presente invento refere-se à atenuação de vírus sincicial respiratório por mutagénese do gene M2-1.

DESCRIÇÃO

"Sistemas de expressão de vírus RSV recombinante e vacinas"

1. INTRODUÇÃO

O presente invento refere-se a moldes de ARN de vírus de cadeia negativa recombinantes que podem ser utilizados para expressar produtos génicos heterólogos em sistemas hospedeiros apropriados e/ou para construir vírus recombinantes que expressam, empacotam e/ou apresentam o produto do gene heterólogo. Os produtos de expressão e vírus quiméricos podem ser vantajosamente utilizados em formulações de vacinas. Nomeadamente, o presente invento refere-se a métodos de gerar vírus sinciciais respiratórios recombinantes e à utilização destes vírus recombinantes como vectores de expressão e vacinas. O invento é descrito através de exemplos nos quais se utilizam genomas de vírus sinciciais respiratórios recombinantes para gerar partículas virais infecciosas.

2. ANTECEDENTES DO INVENTO

Vários vírus de ADN têm sido modificados por engenharia genética para dirigir a expressão de proteínas heterólogas em sistemas de células hospedeiras (por exemplo, vírus *vaccinia*, baculovírus, etc.). Recentemente, têm sido efectuados avanços semelhantes com vírus de ARN de cadeia positiva (por exemplo, poliovírus). Pensa-se que os produtos de expressão destas construções, ou seja, o produto génico heterólogo ou o vírus quimérico que expressa o produto génico heterólogo são potencialmente úteis em formulações de vacinas (quer vacinas de subunidades quer vacinas de vírus completo). Uma desvantagem da utilização de vírus tais como *vaccinia* para construir vírus recombinantes ou quiméricos para utilização em vacinas é a ausência de variação dos seus epítopos principais. Esta ausência de variação das estirpes virais coloca limitações estritas sobre a utilização repetida de *vaccinia* quimérica, pelo que vacinações múltiplas gerarão resistência do hospedeiro à estirpe de modo que o vírus inoculado não pode infectar o hospedeiro. A inoculação de um

indivíduo resistente com *vaccinia* quimérica não induzirá portanto estimulação imunitária.

Contrariamente, vírus de ARN de cadeia negativa tal como vírus influenza e vírus sincicial respiratório demonstram uma grande variabilidade dos seus epítopos principais. De facto, foram identificados milhares de variantes de influenza; cada estirpe evoluindo por deriva antigénica. Os vírus de cadeia negativa tal como os vírus influenza e o vírus sincicial respiratório seriam candidatos atraentes para a construção de vírus quiméricos para utilização em vacinas porque a sua variabilidade genética permite a construção de um vasto repertório de formulações de vacinas que estimularão a imunidade sem risco de desenvolver tolerância.

2.1. VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO

As famílias de vírus contendo ARN genómico de sentido negativo em cadeia simples em invólucro são classificadas em grupos apresentando genomas não segmentados (*Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*) ou os que apresentam genomas segmentados (*Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae* e *Arenaviridae*).

Paramyxoviridae foram classificados em três géneros: paramixovírus (vírus sendai, vírus parainfluenza dos tipos 1-4, papeira, vírus da doença de Newcastle); morbillivírus (vírus do sarampo, vírus da esgana e vírus da peste bovina); e pneumovírus (vírus sincicial respiratório e vírus sincicial respiratório bovino).

O vírus sincicial respiratório (RSV) humano é a principal causa de doença grave do tracto respiratório inferior em bebés e crianças jovens e é responsável por morbilidade e mortalidade consideráveis. Estão presentes dois subgrupos de RSV, A e B, antigenicamente diferentes em populações humanas. Também se reconhece o RSV como um agente importante de doença em adultos imunocomprometidos e em idosos. Devido à resistência incompleta a reinfecção por RSV induzida por infecção natural, o RSV pode infectar várias vezes durante a infância e vida. O objectivo da imunoprofilaxia de RSV é induzir resistência suficiente para evitar a doença grave que pode estar associada com infecção por RSV. As estratégias

actuais para desenvolver vacinas contra RSV centram-se principalmente na administração de antigénio viral purificado ou no desenvolvimento de RSV atenuado vivo para administração intranasal. Contudo, até à data ainda não existem vacinas aprovadas ou terapia antiviral altamente eficaz para RSV.

A infecção com RSV pode variar desde uma infecção que passa despercebida até pneumonia grave e morte. O RSV apresenta um genoma de ARN de sentido negativo não segmentado em cadeia simples com 15 221 nucleótidos (Collins, 1991, em "The paramyxoviruses" p. 103-162, D.W. Kingsbury (ed.) Plenum Press, New York). O genoma de RSV codifica 10 ARNm (Collins et al., 1984, J. Virol. 49: 572-578). O genoma contém uma sequência de comando de 44 nucleótidos nos terminais 3' seguido por NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L e uma sequência de final de 155 nucleótidos nos terminais 5' (Collins. 1991, atrás). Cada unidade de transcrição génica contém uma curta porção conservada de sequência de início de gene (GS) e de sequência de finalização de gene (GE).

O ARN genómico viral não é infeccioso como acontece com o ARN nu. O genoma de ARN de RSV está firmemente encapsulado com a proteína de nucleocápside principal (N) e está associado com a fosfoproteína (P) e a subunidade grande (L) de polimerase. Estas proteínas formam o centro da nucleocápside que se reconhece como a unidade mínima de infecciosidade (Brown et al., 1967, J. Virol. 1: 368-373). As proteínas N, P e L de RSV formam a ARN transcriptase dependente de ARN viral para transcrição e replicação do genoma de RSV (Yu et al., 1995, J. Virol. 69: 2412-2419; Grosfeld et al., 1995, J. Virol. 69: 5677-86). Estudos recentes indicam que os produtos do gene M2 (M2-1 e M2-2) estão envolvidos em transcrição e são necessários para a ocorrência desta (Collins et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 81-5).

A proteína M é expressa como uma proteína de membrana periférica, enquanto que as proteínas F e G são expressas como proteínas integrais de membrana e estão envolvidas na ligação do vírus e na entrada do vírus nas células. As proteínas G e F são os principais antigénios que desencadeiam anticorpos neutralizantes *in vivo* (tal como revisto em

McIntosh e Chanock, 1990 “Respiratory Syncytial Vírus” 2ª ed. “Virology” (D.M. Knipe et al., Ed.) Raven Press, Ltd., New York). O dimorfismo antigénico entre os subgrupos de RSV A e B está principalmente ligado à glicoproteína G, enquanto que a glicoproteína F é mais parecida entre os subgrupos.

Apesar de décadas de investigação científica não foi até agora desenvolvida qualquer vacina RSV segura e eficaz para a prevenção da morbilidade grave e da mortalidade associadas com a infecção por RSV. Uma vacina de vírus inactivado com formalina não proporcionou protecção contra infecção por RSV e contra os seus sintomas exacerbados durante a infecção subsequente pelo vírus de tipo selvagem em crianças pequenas (Kapikian et al., 1969, Am. J. Epidemiol. 89: 405-21; Chin et al., 1969, Am. J. Epidemiol. 89: 449-63). Os esforços têm-se centrado no desenvolvimento de mutantes sensíveis à temperatura atenuados vivos por mutagénese química ou passagem a frio de RSV de tipo selvagem (Gharpure et al., 1969, J. Virol. 3: 414-21; Crowe et al., 1994, Vaccine 12: 691-9). Contudo, tentativas iniciais forneceram resultados desencorajadores com esses mutantes sensíveis à temperatura atenuados vivos. Os vírus candidatos foram quer sub-atenuados quer sobre-atenuados (Kim et al., 1973, Pediatrics 52: 56-63; Wright et al., 1976, J. Pediatrics 88: 931-6) e algumas das vacinas candidatas foram geneticamente instáveis o que resultou na perda do fenótipo atenuado (Hodes et al., 1974, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145: 1158-64).

Foram também feitas tentativas para conceber racionalmente vectores *vaccinia* recombinantes que expressem as glicoproteínas F ou G do invólucro de RSV. Contudo, a utilização destes vectores como vacinas para proteger contra infecção por RSV em estudos animais demonstrou resultados inconsistentes (Olmsted et al. 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 7462-7466; Collins et al., 1990, Vaccine 8: 164-168).

Assim, os esforços passaram a centrar-se na concepção racional de RSV recombinantes para gerar vacinas. Durante muito tempo os vírus de ARN de sentido negativo foram resistentes ao estudo. Só recentemente é que foi possível recuperar vírus de ARN de cadeia negativa utilizando uma abordagem de genética inversa recombinante (patente U.S.

n.º 5 166 057 de Palese et al.). Apesar deste método ter sido originalmente aplicado à concepção racional de genomas virais de influenza (Luytjes et al. 1989, Cell 59: 1107-1113; Enami et al. 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11563-11567), o método tem sido aplicado com sucesso a uma grande variedade de vírus segmentados e não segmentados de ARN de cadeia negativa, incluindo raiva (Schnell et al. 1994, EMBO J. 13: 4195-4203); VSV (Lawson et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci USA 92: 4477-81); vírus do sarampo (Radecke et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-84); vírus da peste bovina (Baron e Barrett, 1997, J. virol. 71: 1265-71); vírus da parainfluenza humana (Hoffman e Banerjee, 1997, J. Virol. 71: 3272-7; Dubin et al., 1997, Virology 235: 323-32); SV5 (He et al., 1997, Virology 237: 249-60); vírus sincicial respiratório (Collins et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9663-9667) e vírus Sendai (Park et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5537-5541; Kato et al. 1996, Genes to Cells I: 569-579). Apesar desta abordagem ter sido utilizada para salvar RSV com sucesso, vários grupos relataram que RSV é ainda resistente ao estudo com base em determinadas propriedades do RSV que o distinguem dos paramixovírus melhor caracterizados do género Paramixovírus, Rubulavírus e Morbillivírus. Estas diferenças incluem um maior número de ARN, uma ordem génica não usual no terminal 3' do genoma, extensa diversidade de sequências entre estirpes, várias proteínas não apresentadas por outros vírus de ARN de cadeia negativa não segmentados e um requisito para que a proteína M2 (ORF1) efectue processamento completo dos produtos de transcrição completos e salvamento de um genoma completo (Collins et al. PCT WO97/12032; Collins, P. L. et al. p 1313-1357 do volume 1, Fields Virology, et al., Eds. (3ª ed., Raven Press, 1996).

3. SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento refere-se a vírus RS e vectores virais recombinantes concebidos por engenharia genética que contêm genes heterólogos para utilização como vacinas. De acordo com o presente invento, os vírus RS e vectores virais recombinantes são concebidos racionalmente para conterem genes heterólogos incluindo genes de outros vírus, patogénios, genes celulares, antigénios de tumor ou para codificar combinações de genes de diferentes estirpes de RSV.

O presente invento, num primeiro aspecto, proporciona uma partícula isolada de vírus sincicial respiratório apresentando um fenótipo atenuado incluindo um antigenoma ou genoma de vírus sincicial respiratório em que o referido genoma ou antigenoma tem: (a) uma sequência heteróloga que codifica uma proteína G e F de RSV estirpe B9320; e (b) uma deleção do quadro de leitura aberto M2-2.

Descrevem-se moldes de ARN virais de cadeia negativa recombinantes que podem ser utilizados para transfectar células transformadas que expressam a ARN-polimerase dependente de ARN e permitem complementação. Alternativamente, pode utilizar-se um plasmídeo que expressa as componentes da ARN-polimerase a partir de um promotor apropriado para transfectar células para permitir complementação dos moldes de ARN virais de cadeia negativa. A complementação pode também ser obtida com a utilização de um vírus auxiliador ou vírus de tipo selvagem para proporcionar a ARN-polimerase dependente de ARN. Os moldes de ARN são preparados por transcrição das sequências de ADN adequadas com uma ARN-polimerase dirigida por ADN. Os moldes de ARN resultantes são de polaridade negativa ou positiva e contêm sequências terminais apropriadas que permitem que o aparelho de síntese de ARN viral reconheça o molde. Podem construir-se ARNm bicistrónicos para permitir iniciação interna da tradução de sequências virais e permitir expressão de sequências de codificação de proteína heteróloga a partir do local de iniciação terminal habitual ou vice-versa.

Tal como demonstrado pelos exemplos aqui descritos, o genoma de RSV recombinante com orientação no sentido positivo ou no sentido negativo é co-transfectado com vectores de expressão que codificam a proteína de nucleocápside (N) viral, a fosfoproteína (P) de nucleocápside associada e uma proteína de subunidade grande (L) de polimerase, com ou sem a proteína M2/ORF1 de RSV para gerar partículas virais infecciosas. Os plasmídeos que codificam polipéptidos de vírus RS são utilizados como a fonte de proteínas que foram capazes de replicar e transcrever RNP derivados sinteticamente. O subconjunto mínimo de proteínas RSV necessárias para replicação e expressão específicas da RNP

viral revelou ser as três proteínas do complexo de polimerase (N, P e L). Tal sugere que a função de todo o gene M2-1, fornecido por um plasmídeo independente que expressa M2-1, pode não ser absolutamente necessária para a replicação, expressão e salvamento de RSV infeccioso.

Os produtos de expressão e/ou viriões quiméricos obtidos podem ser vantajosamente utilizados em formulações de vacinas. Nomeadamente, pode utilizar-se um RSV recombinante concebido racionalmente por engenharia genética para demonstrar um fenótipo atenuado como uma vacina RSV viva. De acordo com o invento, pode conceber-se racionalmente RSV recombinante para expressar polipéptidos G e F heterólogos de RSV estirpe B9320 para gerar um RSV quimérico para servir como uma vacina, que é capaz de desencadear respostas imunitárias em vertebrados tanto humorais como mediadas por células. A utilização de RSV recombinante com este objectivo é especialmente atractiva dado que estes vírus demonstram uma tremenda variabilidade na estirpe que permite a construção de um vasto repertório de formulações de vacinas. A capacidade de seleccionar de entre milhares de variantes de vírus para construir vírus quimérico obvia o problema de resistência do hospedeiro que se encontra quando se utilizam outros vírus tais como *vaccinia*.

O presente invento refere-se adicionalmente à atenuação do vírus sincicial respiratório humano por deleção do quadro de leitura aberto M2-2.

3.1. DEFINIÇÕES

Tal como aqui utilizadas, as seguintes expressões terão os significados indicados:

ARNc = ARN anti-genómico

HA = hemaglutinina (glicoproteína de invólucro)

VIH = vírus da imunodeficiência humana

L = subunidade grande da polimerase

M = proteína de matriz (reveste o interior do invólucro)

MDCK = células de rim canino Madin Darby

MDBK = células de rim bovino Madin Darby

moi = multiplicidade de infecção

N = proteína de nucleocápside

NA = neuraminidase (glicoproteína de invólucro)

NP = nucleoproteína (associada com ARN e necessária para actividade de polimerase)

NS = proteína não estrutural (função desconhecida)

nt = nucleótido

P = fosfoproteína de nucleocápside

PA, PB1, PB2 = componentes da polimerase de ARN dirigida por ARN

RNP = ribonucleoproteína (ARN, PB2, PB1, PA e NP)

rRNP = RNP recombinante

RSV = vírus sincicial respiratório

ARNv = ARN genómico viral

complexo de polimerase viral = PA, PB1, PB2 e NP

WSN = vírus influenza A/WSN/33

vírus HK: vírus de rearranjo contendo sete genes do vírus WSN e o gene NA do vírus influenza A/HK/8/68.

4. DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da construção RSV/CAT (pRSVA2CAT) utilizada em experiências de salvamento. Construíram-se as regiões de comando com aproximadamente 100 nt de comprimento e de final com aproximadamente 200 nt de comprimento de RSV pela hibridação controlada de oligonucleótidos sintéticos contendo complementaridade com sobreposição parcial. Os oligonucleótidos de comando sobrepostos são indicados por 1L - 5L apresentados na construção. Os nucleótidos de final sobrepostos são indicados por 1T - 9T apresentados na construção. Ligaram-se as sequências de nucleótidos dos ADN de comando e de final a ADN de gene CAT purificado nos locais XbaI e PstI indicados, respectivamente. Ligou-se então esta construção completa a pUC 19 digerido com KpnI/HindIII. A inclusão de uma sequência

de promotor T7 e de um local HgaI flanqueando as sequências de final e de comando, respectivamente, permitiu síntese *in vitro* de produtos de transcrição de ARN de RSV/CAT contendo as sequências genómicas exactas dos terminais 3' e 5'.

Figura 2. Cromatograma de camada fina (TLC) apresentando a actividade CAT presente em extractos celulares 293 após infecção e transfecção com ARN transcrito a partir da construção RSV/CAT apresentada na figura 11. Infectaram-se monocamadas confluentes de células 293 em placas de seis poços (~10^6 células) quer com RSV A2 quer com B9320 a uma m.o.i. de 0,1-1,0 pfu por célula. 1 hora após a infecção transfectaram-se células com 5-10 µg de CAT/RSV utilizando o protocolo Transfect-Act™ de Life Technologies. Às 24 horas após a infecção recolheram-se as monocamadas infectada/transfectada e processaram-se para subsequente ensaio CAT de acordo com "Current Protocols in Molecular Biology", Vol. 1, capítulo 9.6.2; Gorman, et al., (1982) Mol. Cell. Biol. 2: 1044-1051. As pistas 1, 2, 3 e 4 apresentam a actividade CAT presente em (1) células 293 não infectadas, células 293 infectadas transfectadas com CAT/RSV-A2, co-infectadas com sobrenadante de (2) atrás. A actividade CAT observada em cada pista foi produzida a partir de 1/5 do extracto celular total de 10^6 células.

Figura 3. Representação esquemática do genoma da estirpe A2 de RSV apresentando as posições relativas dos pares de iniciadores utilizados para a síntese de ADNc incluindo o genoma completo. Indicam-se os locais de endonuclease utilizados para juntar estes clones; estes locais estavam presentes na sequência de RSV nativa e incluíram-se nos iniciadores utilizados para síntese de ADNc. Utilizou-se aproximadamente 100 ng de ARN genómico viral em reacções de RT/PCR para a síntese independente de cada um dos sete ADNc. Apresentam-se igualmente os iniciadores para a síntese da primeira e da segunda cadeia de ADNc a partir do molde de ARN genómico. Para cada ADNc, os iniciadores para a síntese da primeira cadeia são n.º 1-7 e os iniciadores para a síntese da segunda cadeia são n.º 1'-7'.

Figura 4. Representação esquemática de RSV subgrupo B estirpe B9320. Criaram-se locais BamHI nos oligonucleótidos

iniciadores utilizados para RT/PCR de modo a clonar os genes G e F da estirpe B9320 em ADNc anti-genómicos de RSV subgrupo A2 (figura 4A). Subclonou-se inicialmente um fragmento de ADNc que continha os genes G e F desde 4326 nucleótidos até 9387 nucleótidos da estirpe A2, para pUC 19 (pUCRVH). Criaram-se locais BglII nas posições de 4630 (junção intergénica SH/G) (figura 4B) e 7554 (junção intergénica F/M2 (figura 4C). O ADNc A-G e F de B93260 foi inserido em pUCR/H que está eliminado dos genes A-G e F. O clone de ADNc antigenómico resultante foi denominado pRSVB-GF e foi utilizado para transfectar células Hep-2 para gerar vírus RSVB-GF infecciosos.

Figura 5. O vírus RSVB-GF recombinante foi caracterizado por RT/PCR utilizando iniciadores específicos de RSV subgrupo B. Incubaram-se iniciadores específicos da região G de RSV subgrupo B com alíquotas dos genomas virais RSV recombinantes e submeteram-se a PCR. Analisaram-se os produtos de PCR por electroforese num gel de agarose a 1% e visualizaram-se por coloração com brometo de etídio. Tal como apresentado, não se produziu qualquer produto de ADN na reacção de RT/PCR utilizando RSV A2 como um molde. Contudo, observou-se um produto previsto de 254 pares de bases em RT/PCR de ARN de RSVB-GF e controlo de PCR do ADN do plasmídeo pRSV-GF como molde, indicado que o vírus salvo continha os genes G e F derivados do vírus B9320.

Figura 6. Identificação de rRSVA2 (B-G) quimérico por RT/PCR e análise de hibridação de *Northern* de expressão de ARN. Figura 6A. Análise de RT/PCT de rRSV A2 (B-G) quimérico em comparação com A2 de tipo selvagem (A2). O ARN de virião extraído de rRSVA2 (B-G) (pistas 1,2) e rRSVA2 (pistas 3,4) foi submetido a transcrição inversa utilizando um iniciador hibridado com ARNv em sentido (-) no gene F de RSV na presença (+) ou ausência (-) de transcriptase inversa (RT), seguido por PCR com um par de iniciadores flanqueando o local de inserção B-G. Não se detectou qualquer ADN em RT/PCR na ausência de transcriptase inversa (RT) (pistas 2,4). Produziu-se um fragmento de ADNc, que tem um tamanho cerca de 1 kb maior que o ADNc derivado de A2, a partir de rRSVA (B-G). Este ADN produto de PCR foi digerido pela enzima de restrição *StuI* que é única no gene B-G inserido (pista 5).

Indica-se o marcador de tamanho de ADN de 100 pb (M). Figura 6B. Análise de hibridação de *Northern* da expressão do ARNm de G. Infectaram-se células Hep-2 com RSV B9320, rRSVA2 e rRSVA2 (B-G) quimérico. Às 48 horas após infecção, extraiu-se o ARN celular total e submeteu-se a electroforese num gel de agarose a 1,2% contendo formaldeído. Transferiu-se o ARN para membrana de *nylon* Hybond e hibridou-se o filtro com uma sonda de oligonucleótido marcada com ^{32}P específica para ARNm de A2-G ou específica para ARNm de B9320-G. Detectaram-se ambos os produtos de transcrição específicos A2 G e B9320 G nas células infectadas rRSVA2 (B-G). Indica-se igualmente o produto de transcrição de ARN excedentário (G-M2) de células infectadas rRSV A2 (B-G).

Figura 7. Análise de expressão de proteína por rRSVA2 (B-G). Submeteram-se células Hep-2 a infecção simulada (pistas 1, 5), infecção por RSV B9320 (pistas 2, 6), rRSVA2 (pistas 3, 7) e rRSV A2 (B-G) (pistas 4, 8). Às 14-18 horas após infecção, marcaram-se as células infectadas com ^{35}S-promix e imunoprecipitaram-se polipéptidos com anti-soro policlonal de cabra contra estirpe A2 de RSV (pistas 1-5) ou com anti-soro policlonal de ratinho contra estirpe B9320 de RSV (pistas 5-8). Separaram-se os polipéptidos imunoprecipitados num gel de poliacrilamida a 10%. Tanto a proteína G específica de RSV A2 como a proteína G específica de RSV B9320 foram produzidas em células infectadas por rRSV A2 (B-G). A migração da proteína G é indicada por *. Indica-se a mobilidade da glicoproteína F1 e de N, P e M. Apresentam-se os tamanhos moleculares à esquerda em quilodaltons.

Figura 8. Morfologia de placas de rRSV, rRSVC4G, rRSVA2 (B-G) e vírus A2 de tipo selvagem (wt A2). Infectaram-se células Hep-2 com cada vírus e incubaram-se a 35°C durante seis dias. Fixaram-se as monocamadas celulares, visualizaram-se por imunocoloração e fotografaram-se.

Figura 9. Curva de crescimento de rRSV, rRSVC4G, A2 RSV de tipo selvagem (wt A2) e rRSVA2 (B-G) quimérico. Infectaram-se células Hep-2 com cada vírus a uma moi de 0,5 e recolheu-se o meio a intervalos de 24 h. Determinou-se o

título de cada vírus em duplicado por ensaio de placas em células Hep-2 e visualizou-se por imunocoloração.

Figura 10. Agregados de resíduos carregados de proteína L de RSV que são alvos para mutagénese dirigida. Resíduos de aminoácidos carregados em agregados foram convertidos para alaninas por mutagénese dirigida do gene L de RSV utilizando o kit de mutagénese dirigida QuikChange (Stratagene).

Figura 11. Resíduos de cisteína da proteína L de RSV que são alvos para mutagénese dirigida. Resíduos de cisteína foram convertidos para resíduos de alanina por mutagénese dirigida do gene L de RSV utilizando o kit de mutagénese dirigida QuikChange (Stratagene).

Figura 12. Identificação dos mutantes de deleção M2-2 e SH de RSV. Geraram-se deleções M2-2 por digestão com HindIII de pET (S/B) seguido de reclonagem de um fragmento SacI remanescente para um fragmento BamHI num clone de comprimento completo. As deleções em SH foram geradas por digestão de SacI de pET (A/S) seguido de reclonagem de um fragmento AvrII SacI remanescente para um clone de comprimento completo. Figura 12A. A identificação dos rRSVΔSH e rRSVΔM2-2 recuperados foi efectuada por RT/PCR utilizando pares de iniciadores específicos para o gene SH ou para o gene M2-2, respectivamente. Figura 12B. Detectou-se também rRSVΔSHΔM2-2 por RT/PCR utilizando pares de iniciadores específicos para os genes M2-2 e SH. Correram-se os produtos RT/PCR num gel de agarose de brometo de etídio e visualizaram-se bandas com luz ultravioleta (UV).

Figura 13. Estrutura do genoma rA2ΔM2-2 e recuperação de rA2ΔM2-2. (A). As sequências apresentadas são a região do gene M2 que é sobreposto pelos quadros de leitura aberto M2-1 e M2-2. Eliminaram-se um total de 234 nt que codificam os 78 aminoácidos do terminal C de M2-2 através dos locais HindIII introduzidos (sublinhado). Os 12 resíduos de aminoácidos do terminal N do quadro de leitura aberto M2-2 são mantidos uma vez que este se sobrepõe com o gene M2-1. (B). Produtos de RT/PCR de ARN virais rA2ΔM2-2 e rA2 utilizando iniciadores V1948 e V1581 na presença (+) ou

ausência (-) de transcriptase inversa (RT). Indica-se o tamanho do produto de ADN derivado de rA2 ou rA2ΔM2-2.

Figura 14. Expressão de ARN viral por rA2ΔM2-2 e rA2. (A). Extraiu-se o ARN total de células Vero infectadas com rA2 ou rA2ΔM2-2 às 48 horas após infecção, separou-se por electroforese em géis de agarose a 1,2%/formaldeído 2,2 M e transferiu-se para membranas de *nylon*. Hibridou-se cada transferência com ribossonda marcada com Dig específica para o gene M2-2, M2-1, F, SH, G ou N. A dimensão do marcador de ARN está indicada à esquerda. (B). Infectaram-se células Hep-2 e Vero com rA2 ou rA2ΔM2-2 durante 24 h e extraiu-se ARN celular total. Hibridou-se uma transferência de *Northern* de ARN com uma ribossonda marcada com ^{32}P específica para o gene F de sentido negativo para detectar ARN genómico viral ou uma ribossonda marcada com ^{32}P específica para o gene F de sentido positivo para detectar ARN antigenómico viral e ARNm de F. O painel superior da transferência de *Northern* do lado direito foi obtido da porção superior do gel apresentado no painel inferior e foi exposto durante 1 semana para apresentar antigenoma. O painel inferior da transferência de *Northern* foi exposto durante 3 h para apresentar o ARNm de F. Indicam-se o genoma, antigenoma, ARNm de F e ARN de F-M2 dicistrónico.

Figura 15. Expressão de proteína viral em células infectadas por rA2ΔM2-2 e rA2. (A). Marcaram-se metabolicamente células Vero com infecção simulada, infectadas com rA2ΔM2-2 e infectadas com rA2 com ^{35}S-promix (100 µCi/ml) entre 14 e 18 h após infecção. Prepararam-se lisados celulares para imunoprecipitação com anti-soros anti-RSV policlonal de cabra ou anti-M2-2 policlonal de coelho. Separaram-se os polipéptidos imunoprecipitados num gel de poliacrilamida a 17,5% contendo ureia 4 M e processaram-se para autorradiografia. Indicam-se as posições de cada proteína viral à direita e indicam-se à esquerda os marcadores de tamanho de peso molecular. (B). Cinética de síntese de proteínas em células Hep-2 e Vero por hibridação de *Western*. Infectaram-se células Hep-2 e Vero com rA2 ou rA2ΔM2-2 e às 10 h, 24 h ou 48 h após infecção separaram-se os polipéptidos totais de células infectadas num gel de poliacrilamida a 17, 5% contendo ureia 4 M. Transferiram-se

as proteínas para uma membrana de *nylon* e sondou-se a transferência com soros policlonais contra M2-1, NS 1 ou SH tal como indicado.

Figura 16. Morfologia de placas de rA2ΔM2-2 e rA2. Infectaram-se células Hep-2 ou Vero com rA2ΔM2-2 ou rA2 em camada semi-sólida composta por metilcelulose a 1% e meio 1 X L15 contendo FBS a 2% durante 5 dias. Visualizaram-se placas de vírus por imunocoloração com um anti-soro anti-RSV policlonal de cabra e fotografaram-se ao microscópio.

Figura 17. Curvas de crescimento de rA2ΔM2-2 em células Hep-2 e Vero. Infectaram-se células Vero (A) ou células Hep-2 (B) com rA2ΔM2-2 ou rA2 a uma m.o.i. de 0,5 e recolheram-se alíquotas do meio a intervalos de 24 h como indicado. Determinaram-se os títulos de vírus por ensaio de placas em células Vero. O título de vírus em cada ponto temporal é a média de duas experiências.

Figura 18. Análise de hibridação de *Northern* de rA2ΔNS1, rA2ΔNS2 e rA2ΔNS1ΔNS2. Extraiu-se o ARN celular total de células Vero infectadas com rA2, rA2ΔNS1, rA2ΔNS2 e rA2ΔNS1ΔNS2 às 24 h após infecção, separou-se por electroforese em géis de agarose a 1,2%/formaldeído 2,2 M e transferiu-se para membranas de *nylon*. Hibridou-se cada transferência com uma ribossonda marcada com Dig específica para o gene NS1, NS2 ou M2-2 tal como indicado.

Figura 19. Morfologia de placas de mutantes de deleção. Infectaram-se células Hep-2 ou Vero com cada mutante de deleção tal como indicado sob camada semi-sólida composta por metilcelulose a 1% e meio 1 X L15 contendo FBS a 2% durante 6 dias. Visualizaram-se placas de vírus por imunocoloração com um anti-soro anti-RSV policlonal de cabra e fotografou-se ao microscópio.

Figura 20. Curvas de crescimento de rA2ΔNS1 em células Vero. Infectaram-se células Vero com rA2 ΔNS1 ou rA2 a uma m.o.i. de 0,5 e recolheram-se alíquotas do meio a intervalos de 24 h tal como indicado. Determinaram-se os títulos de vírus por ensaio de placas em células Vero.

Figura 21. Curvas de crescimento de rA2ΔNS2 em células Vero. Infectaram-se células Vero com rA2 ΔNS2 ou rA2 a uma m.o.i. de 0,5 e recolheram-se alíquotas do meio a intervalos de 24 h tal como indicado. Determinaram-se os títulos de vírus por ensaio de placas em células Vero.

Figura 22. Curvas de crescimento de rA2ΔSHΔM2-2 em células Vero. Infectaram-se células Vero com rA2ΔSHΔM2-2 ou rA2 a uma m.o.i. de 0,5 e recolheram-se alíquotas do meio a intervalos de 24 h tal como indicado. Determinaram-se os títulos de vírus por ensaio de placas em células Vero.

Figura 23. Análise de hibridação de *Northern* de vários mutantes de deleção. Extraiu-se o ARN celular total de células Vero infectadas com cada mutante de deleção como indicado às 24 h após infecção, separou-se por electroforese em géis de agarose a 1,2%/formaldeído 2,2 M e transferiu-se para membranas de *nylon*. Hibridou-se cada transferência com uma ribossonda marcada com Dig específica para o gene NS1, NS2 ou M2-2 tal como indicado.

Figura 24. Curvas de crescimento de rA2ΔNS2ΔM2-2 em células Vero. Infectaram-se células Vero com rA2ΔNS2ΔM2-2 ou rA2 a uma m.o.i. de 0,5 e recolheram-se alíquotas do meio a intervalos de 24 h tal como indicado. Determinaram-se os títulos de vírus por ensaio de placas em células Vero.

Figura 25. Curvas de crescimento de rA2ΔNS1ΔNS2 em células Vero. Infectaram-se células Vero com rA2ΔNS1ΔNS2 ou rA2 a uma m.o.i. de 0,5 e recolheram-se alíquotas do meio a intervalos de 24 h tal como indicado. Determinaram-se os títulos de vírus por ensaio de placas em células Vero.

Figura 26. Inserção dos genes G e F de RSV estirpe B9320 na estirpe A2 recombinante. Amplificaram-se os genes G e F de B9320 por RT/PCR utilizando iniciadores que continham os locais de enzimas de restrição BamHI. Introduziu-se então uma cassete de ADN contendo os genes G e F de B9320 no subclone pRSV (R/H) utilizando os locais de enzima de restrição BglII introduzidos que flanqueavam os genes G e F de RSV estirpe A2. Permutou-se subsequentemente o fragmento de ADNc contendo os genes G e F de B9320 para o ADNc antigenómico

completo de A2 por ligação nos locais XhoI e BamHI. O sinal de início de gene do gene G e o sinal de terminação de gene do gene F de B9320 encontram-se sublinhados e indicam-se os locais de enzimas de restrição utilizados para clonagem.

Figura 27. Expressão específica da estirpe de RSV rA-G_BF_B e rA-G_BF_BΔM2-2 quiméricos. **A.** Expressão de ARN viral. Extraiu-se o ARN celular total de células Vero infectadas com vírus e hibridaram-se as transferências de *Northern* com sondas específicas para o gene G ou F quer do subgrupo A quer do subgrupo B de RSV. A expressão génica de M2-2 foi analisada utilizando uma ribossonda específica para o quadro de leitura aberto M2-2. **B.** Expressão de proteína viral. Marcaram-se as células Vero infectadas com ^{35}S-metionina e ^{35}S-cisteína e imunoprecipitou-se o lisado celular com anticorpo policlonal anti-RSV ou anticorpo anti-M2-2. Para detectar expressão da proteína G, submeteram-se os extractos de células infectadas a hibridação de *Western* utilizando anticorpo monoclonal específico de subgrupo contra a proteína G. Tanto rA-G_BF_B como rA-G_BF_BΔM2-2 expressaram as proteínas G e F específicas do subgrupo B e mantiveram expressão normal dos outros genes derivados do esqueleto do subgrupo A2. Não foi expressa qualquer proteína de M2-2 em células infectadas com rA-G_BF_BΔM2-2. Pista 1: rA2, pista 2: rA2ΔM2-2, pista 3: B9320, pista 4: rA-G_BF_B, pista 5: rA-G_BF_BΔM2-2.

Figura 28. Cinética de crescimento dos vírus quiméricos em células Hep-2 e Vero. Infectaram-se células Hep-2 ou Vero com vírus em duplicados a uma moi de 0,1 ou de 0,01. A intervalos de 24 horas recolheram-se os sobrenadantes das culturas infectadas e determinaram-se os títulos de vírus por ensaio de placas em células Vero.

5. DESCRIÇÃO DO INVENTO

O presente invento refere-se a vírus RS recombinante e vectores virais concebidos por engenharia genética que expressam genes G e F heterólogos e incluem uma deleção de um quadro de leitura aberto M2-2. O invento refere-se à construção e utilização de moldes de ARN virais RS de cadeia negativa recombinantes que podem ser utilizados com ARN-polimerase dirigida para ARN viral para expressar produtos

génicos heterólogos em células hospedeiras apropriadas e/ou para salvar o gene heterólogo em partículas virais. Os moldes de ARN do presente invento podem ser preparados por transcrição das sequências de ADN apropriadas utilizando uma ARN-polimerase dirigida por ADN tal como polimerase de bacteriófago T7, T3 ou Sp6. Os moldes de ARN recombinantes podem ser utilizados para transfectar linhas celulares contínuas/transfectadas que expressam proteínas de ARN-polimerase dirigidas a ARN, permitindo complementação.

O invento é demonstrado através de exemplos de trabalho nos quais RSV infeccioso é salvo de ADNc contendo o genoma RSV no sentido genómico ou antigenómico introduzido nas células que expressam as proteínas N, P, e L do complexo de polimerase RSV. Os exemplos de antecedentes demonstram adicionalmente que a expressão do plasmídeo de expressão M2-1 não é necessária para recuperação de RSV infeccioso de ADNc, o que contraria o anteriormente relatado (Collins et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11563-7). Além disso, a deleção de M2-ORF2 de ADNc de RSV recombinante resulta no salvamento de partículas de RSV atenuadas. RSV com deleção M2-2 é um excelente veículo para gerar RSV quimérico que codifica produtos génicos heterólogos, tendo esses vectores virais quiméricos e partículas virais salvas utilidade como vectores de expressão para a expressão de produtos génicos heterólogos e como vacinas de RSV atenuadas vivas que expressam quer polipéptidos antigénicos de RSV quer polipéptidos antigénicos de outro vírus.

O invento é adicionalmente demonstrado através de exemplos de trabalho nos quais se utiliza um clone de ADNc que contém o genoma completo de RSV, além de um promotor de T7, uma ribozima de vírus delta da hepatite e um terminador de T7, para gerar uma partícula viral infecciosa quando co-transfectado com vectores de expressão que codificam as proteínas N, P, L de RSV. Além disso, os exemplos de trabalho descrevem produtos de transcrição de ARN de ADN clonado contendo a região de codificação - em orientação de sentido negativo - do gene de cloranfenicol-acetiltransferase (CAT) ou do gene de proteína fluorescente verde (GFP) flanqueados pelos nucleótidos 5' terminais e 3' terminais do genoma de RSV. Os exemplos de trabalho demonstram adicionalmente que um

promotor RSV mutado para apresentar actividade aumentada resultou no salvamento de partículas de RSV infecciosas a partir de um ADNc de RSV de tamanho completo com elevada eficácia. Estes resultados demonstram a utilização com sucesso de moldes de cadeia negativa viral recombinante e polimerase de RSV com actividade aumentada para salvar RSV. Este sistema é uma excelente ferramenta para conceber racionalmente vírus RSV com propriedades biológicas definidas, por exemplo vacinas vivas atenuadas contra RSV e para utilizar RSV recombinante como um vector de expressão para a expressão de produtos génicos heterólogos.

Este invento refere-se à construção e utilização de moldes de ARN virais de cadeia negativa recombinantes que podem ser utilizados com ARN-polimerase dirigida para ARN viral para expressar produtos génicos G e F heterólogos de RSV estirpe B9320 em células hospedeiras apropriadas, para salvar o gene heterólogo em partículas virais e expressar moldes de ARN virais de cadeia negativa recombinantes quiméricos mutados (consultar patente U.S. n.º 5 166 057 de Palese *et al.*, aqui incorporada por referência na sua globalidade). O produto génico heterólogo é um péptido ou proteína derivado de RSV estirpe B9320. Os moldes de ARN podem estar na orientação de sentido positivo ou negativo e são preparados por transcrição de sequências de ADN apropriadas utilizando uma ARN-polimerase dirigida por ADN tal como polimerase de bacteriófago T7, T3 ou Sp6.

A capacidade de reconstituir RNP *in vitro* permite a concepção de novos vírus quiméricos de influenza e RSV que expressam genes heterólogos. Um modo de atingir este objectivo envolve modificação de genes virais existentes. Por exemplo, o gene G ou F pode ser modificado para conter sequências heterólogas tais como o gene HA de influenza nos seus domínios externos. Nos casos em que as sequências heterólogas são epítopos ou antigénios de patogénios, esses vírus quiméricos podem ser utilizados para induzir uma resposta imunitária protectora contra o agente da doença do qual se derivaram esses determinantes. Por exemplo, pode construir-se um ARN quimérico no qual se inseriu uma sequência de codificação derivada da região de codificação gp120 do vírus da imunodeficiência humana na sequência de

codificação de RSV e produzir-se vírus quimérico pela transfecção deste segmento de ARN quimérico para uma célula hospedeira infectada com RSV de tipo selvagem.

Além de modificar genes que codificam para proteínas de superfície, podem alterar-se genes que codificam para proteínas que não são de superfície. Demonstrou-se que estes últimos genes estão associados com a maioria das respostas imunitárias celulares mais importantes do sistema de vírus RS. Assim, a inclusão de um determinante heterólogo no gene G ou F de RSV pode, após infecção, induzir uma resposta imunitária celular eficaz contra este determinante. Tal abordagem pode ser particularmente útil em situações nas quais a imunidade protectora depende fortemente da indução de respostas imunitárias celulares (por exemplo, malária, etc.).

O presente invento também se refere adicionalmente à geração de RSV atenuados recombinantes produzidos pela introdução de deleção específica do M2-2, gene acessório viral. Adicionalmente, o presente invento refere-se especificamente à geração de RSV atenuados recombinantes apresentando uma deleção combinada de qualquer dos genes acessórios virais M2-2/SH, genes acessórios virais M2-2/NS2 ou genes acessórios virais NS1/NS2.

O invento demonstra-se através de exemplos de trabalho aqui apresentados nos quais RSV infeccioso atenuado é salvo por ADNc de RSV apresentando deleções no M2-2, gene(s) acessório(s) viral(s) quer sozinhos quer em combinação, tais como RSV com deleção M2-2/SH, RSV com deleção M2-2/NS2, representando excelentes veículos para a geração de vacinas de RSV atenuadas vivas.

5.1. CONSTRUÇÃO DOS MOLDES DE ARN RECOMBINANTE

Podem construir-se sequências de codificação de gene heterólogo flanqueado pelo complementar do local de ligação/promotor da polimerase viral, por exemplo, o complementar dos terminais 3'-RSV ou dos terminais 3'-RSV e 5'-RSV, utilizando técnicas conhecidas na arte. As sequências de codificação de gene heterólogo podem ser também flanqueadas pelo complementar do local de ligação/promotor da

RSV polimerase, por exemplo, as sequências de comando e de final de RSV utilizando técnicas conhecidas na arte. Podem clonar-se moléculas de ADN recombinantes contendo essas sequências híbridas e transcritas por uma ARN-polimerase dirigida por ADN, tal como polimerase de bacteriófago T7, T3 ou Sp6 e semelhantes, para produzir os moldes de ARN recombinantes que apresentam as sequências virais adequadas que permitem reconhecimento e actividade de polimerase viral.

Numa concretização preferida do presente invento, as sequências heterólogas são derivadas do genoma de outra estirpe de RSV, por exemplo, concebe-se racionalmente o genoma de RSV estirpe A para incluir as sequências de nucleótidos que codificam os polipéptidos antigénicos G e F de RSV estirpe B9320 ou seus fragmentos. Em tal concretização do invento, podem utilizar-se sequências de codificação heterólogas de outra estirpe de RSV para substituir sequências de nucleótidos que codificam polipéptidos antigénicos da estirpe de partida, ou podem ser expressas adicionalmente aos polipéptidos antigénicos da estirpe parental de modo a que o genoma RSV recombinante seja concebido racionalmente para expressar os polipéptidos antigénicos de uma, duas ou mais estirpes de RSV.

Uma abordagem para construir estas moléculas híbridas consiste em inserir a sequência de codificação heteróloga num ADN complementar do ARN genómico de RSV de modo a que a sequência heteróloga seja flanqueada pelas sequências virais necessárias para actividade de polimerase viral; ou seja, o local de ligação/promotor da polimerase viral, doravante referida como local de ligação de polimerase viral. Numa abordagem alternativa, oligonucleótidos que codificam o local de ligação de polimerase viral, por exemplo, o complementar do terminal 3' ou ambos os terminais dos segmentos genómicos virais podem ligar-se à sequência de codificação heteróloga para construir a molécula híbrida. A colocação de um gene ou segmento heterólogo de um gene heterólogo no interior de uma sequência alvo era anteriormente ditada pela presença de locais de enzimas de restrição apropriados no interior da sequência alvo. Contudo, avanços recentes em biologia molecular fizeram diminuir muito este problema. Podem colocar-se facilmente locais de enzimas de restrição em

qualquer local no interior de uma sequência alvo por utilização de mutagénese dirigida (consultar, por exemplo, as técnicas descritas por Kunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82; 488). Variações na tecnologia de reacção de polimerização em cadeia (PCR), descritas adiante, permitem também inserção específica de sequências (ou seja, locais de enzimas de restrição) e permitem construção fácil de moléculas híbridas. Alternativamente, poderiam utilizar-se reacções de PCR para preparar moldes recombinantes sem necessidade de clonagem. Por exemplo, poderiam utilizar-se reacções de PCR para preparar moléculas de ADN em cadeia dupla contendo um promotor de ARN-polimerase dirigida por ADN (por exemplo, de bacteriófago T3, T7 ou Sp6) e a sequência híbrida contendo o gene heterólogo e o local de ligação da polimerase viral de influenza. Os moldes de ARN poderiam então ser transcritos directamente a partir deste ADN recombinante. Ainda noutra concretização, os moldes de ARN recombinante podem ser preparados por ligação de ARN especificando a polaridade negativa do gene heterólogo e o local de ligação da polimerase viral utilizando uma ARN-ligase. Descrevem-se nas subsecções adiante requisitos da sequência para actividade de polimerase viral e construções que podem ser utilizadas de acordo com o invento.

5.1.1 INSERÇÃO DE GENES HETERÓLOGOS

O gene que codifica para a proteína L contém apenas um quadro de leitura aberto. Os genes que codificam para M2 contêm dois quadros de leitura abertos para ORF1 e 2, respectivamente. NS1 e NS2 são codificadas por dois genes, NS1 e NS2. As proteínas G e F, codificadas por dois genes independentes são as glicoproteínas de superfície mais importantes do vírus. Consequentemente, estas proteínas são os principais alvos para a resposta imunitária humoral após infecção. A inserção de uma sequência génica heteróloga em qualquer destas regiões de codificação poderia ser conseguida quer por uma adição das sequências heterólogas a expressar quer por uma substituição completa da região de codificação viral com o gene heterólogo quer por uma substituição parcial. As sequências heterólogas inseridas no genoma de RSV podem ter qualquer comprimento até aproximadamente 5 quilobases. A substituição completa seria provavelmente

melhor conseguida através da utilização de mutagénese dirigida por PCR.

Alternativamente, poderia construir-se um ARNm bicistrónico para permitir iniciação interna da tradução de sequências virais e permitir a expressão de sequências de codificação de proteína heterólogas a partir do local de iniciação terminal normal. Alternativamente, poderia construir-se uma sequência de ARNm bicistrónico em que a sequência viral é traduzida a partir do quadro de leitura aberto terminal normal, enquanto que a sequência heteróloga é iniciada a partir de um local interno. Podem utilizar-se determinadas sequências de locais internos de entrada de ribossoma (IRES). As sequências IRES que são escolhidas devem ser suficientemente curtas para não interferirem com as limitações do empacotamento do vírus RS. Assim, é preferível que os IRES escolhidos para tal abordagem bicistrónica não tenham um comprimento superior a 500 nucleótidos preferindo-se menos de 250 nucleótidos. Além disso, é preferível que o IRES utilizado não partilhe homologia de sequência ou estrutural com elementos de picornavírus. Constituem elementos IRES preferidos, entre outros, IRES BiP de mamífero e o IRES do vírus da hepatite C.

5.2. EXPRESSÃO DE PRODUTOS GÉNICOS HETERÓLOGOS UTILIZANDO MOLDES DE ARN RECOMBINANTE

Os moldes recombinantes preparados tal como descrito atrás podem ser utilizados de vários modos para expressar os produtos génicos heterólogos em célula hospedeiras apropriadas ou para criar vírus quiméricos que expressam os produtos génicos heterólogos. Numa concretização, o molde recombinante pode ser combinado com complexo de polimerase viral purificado adiante para produzir rRNP que são infecciosos. Com este propósito, o molde recombinante pode ser transcrito na presença do complexo de polimerase viral. Alternativamente, o molde recombinante pode ser misturado com ou transcrito na presença do complexo de polimerase viral preparado utilizando métodos de ADN recombinante (consultar, por exemplo, Kingsbury et al., 1987, Virology 156: 396-403). Ainda noutra concretização, o molde recombinante pode ser utilizado para transfectar células hospedeiras apropriadas

para dirigir a expressão dos produtos génicos heterólogos em níveis elevados. Constituem sistemas de células hospedeiras que proporcionam níveis de expressão elevados, entre outros, linhas celulares contínuas que apresentam funções virais tais como linhas celulares super-infectadas com RSV, linhas celulares concebidas racionalmente para complementar funções virais RSV, etc.

5.3. PREPARAÇÃO DE VÍRUS DE ARN DE CADEIA NEGATIVA QUIMÉRICO

De modo a preparar vírus quimérico, podem utilizar-se RNP reconstituídos contendo ARN de RSV ou ARN que codifica para proteínas heterólogas para transfectar células que estão também infectadas com um vírus de RSV "parental". Alternativamente, as preparações de RNP reconstituído podem ser misturadas com os RNP do vírus parental de tipo selvagem e utilizadas directamente para transfecção. Após transfecção, os novos vírus podem ser isolados e os seus genomas identificados através de análise de hibridação. Em abordagens adicionais aqui descritas para a produção de vírus infeccioso quimérico, podem replicar-se rRNP em sistemas de células hospedeiras que expressam as proteínas de polimerase virais de RSV ou influenza (por exemplo, em sistemas de expressão vírus/célula hospedeira; linhas celulares transformadas concebidas racionalmente para expressar as proteínas de polimerase, etc.), de modo a salvar o vírus quimérico infeccioso; neste caso, não é necessária a utilização de vírus auxiliadores dado que esta função é proporcionada pelas proteínas de polimerase virais expressas. Numa abordagem especialmente desejável, células infectadas com rRNP concebidos racionalmente para todos os oito segmentos de vírus influenza podem resultar na produção de vírus quimérico infeccioso que contém o genótipo pretendido; eliminando assim a necessidade de um sistema de selecção.

Teoricamente, pode substituir-se qualquer um dos genes de RSV ou parte de qualquer um dos genes de RSV, com a sequência heteróloga. Contudo, uma parte necessária desta equação é a capacidade de propagar o vírus deficiente (deficiente porque há um produto génico viral normal que falta ou foi alterado). Existem várias abordagens possíveis para evitar este problema.

Uma terceira abordagem para propagação do vírus recombinante pode envolver co-cultura com vírus do tipo selvagem. Tal poderia ser efectuado simplesmente tomando vírus recombinante e co-infectando células com esse e outro vírus de tipo selvagem (de preferência uma estirpe de vacina). O vírus de tipo selvagem deveria complementar o produto génico viral deficiente e permitir crescimento tanto de vírus de tipo selvagem como de vírus recombinante. Tal seria uma situação análoga à propagação de partículas de vírus influenza com interferência deficiente (Nayak et al., 1983, em: "Genetics of Influenza Viruses", P. Palese e D.W. Kingsbury, ed., Springer-Verlag, Viena, p. 255-279). No caso de vírus com interferência deficiente, as condições podem ser modificadas de modo a que a maioria dos vírus propagados seja a partícula deficiente em vez do vírus de tipo selvagem. Assim, esta abordagem pode ser útil para gerar soluções-mãe de vírus recombinante com título elevado. Contudo, estas soluções-mãe conteriam necessariamente algum vírus de tipo selvagem.

Alternativamente, podem replicar-se RNP sintéticos em células co-infectadas com vírus recombinante que expressa proteínas da polimerase de vírus RS. De facto, este método pode ser utilizado para salvar vírus infeccioso recombinante de acordo com o invento. Com este propósito, podem expressar-se as proteínas da polimerase do vírus RSV em qualquer sistema de expressão vector/célula hospedeira, incluindo entre outros, vectores de expressão virais (por exemplo, de vírus *vaccinia*, de adenovírus, de baculovírus, etc.) ou linhas celulares que expressam as proteínas de polimerase (por exemplo, consultar Krystal et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2709-2713).

5.4. GERAÇÃO DE VÍRUS QUIMÉRICOS COM UM FENÓTIPO ATENUADO POR DELEÇÃO DE M2-2

Os métodos do presente invento podem ser utilizados para introduzir mutações ou sequências heterólogas para gerar vírus atenuados quiméricos que encontram muitas aplicações, incluindo análise da biologia molecular, patogénese e propriedades de crescimento e infecção de RSV. De acordo com

o presente invento, podem introduzir-se sequências G e F heterólogas por exemplo nas sequências de codificação da proteína F ou G ou nas sequências de codificação NS1, NS2, M1ORF1, M2ORF2, N, P ou L. De acordo com o presente invento, o gene M2-2 é eliminado para gerar um fenótipo atenuado.

De acordo com o presente invento, um RSV atenuado apresenta um grau de virulência substancialmente menor comparativamente com o vírus de tipo selvagem, incluindo uma taxa de crescimento mais lenta, de modo que os sintomas de infecção viral não ocorrem num indivíduo imunizado.

5.5. FORMULAÇÕES DE VACINAS UTILIZANDO OS VÍRUS QUIMÉRICOS

Numa concretização preferida, o presente invento refere-se a vacinas RSV bivalentes que conferem protecção contra RSV-A e RSV-B. Para formular tal vacina, utiliza-se um vírus RS quimérico que expressa os polipéptidos antigénicos de ambos os subtipos RSV-A e RSV-B.

Pode formular-se quer uma vacina viral recombinante viva quer uma vacina viral recombinante inactiva. Pode preferir-se uma vacina viva porque a multiplicação no hospedeiro leva a um estímulo prolongado do mesmo tipo e grandeza ao que ocorre em infecções naturais e consequentemente confere imunidade substancial e persistente. A produção de tais formulações de vacinas de vírus recombinante vivo pode ser obtida utilizando métodos convencionais envolvendo propagação do vírus em cultura celular ou no alantóide de embrião de pintainho seguido por purificação.

Neste contexto, a utilização de RSV (vectores) concebidos por engenharia genética com objectivos de vacina pode requerer a presença de características de atenuação nestas estirpes. Os actuais candidatos para vacina de vírus influenza viva para utilização em humanos são adaptados ao frio, sensíveis à temperatura ou passados de modo a apresentarem vários (seis) genes derivados de vírus de influenza aviária o que resulta em atenuação. A introdução de mutações apropriadas (por exemplo, deleções) nos moldes utilizados para transfecção pode proporcionar ao novo vírus características de atenuação. Por exemplo, podem efectuar-se

mutações sem sentido específicas que estão associadas a sensibilidade à temperatura ou adaptação ao frio em mutantes de deleção. Estas mutações devem ser mais estáveis do que as mutações pontuais associadas com mutantes de frio ou sensíveis à temperatura e as frequências de reversão devem ser extremamente baixas.

Alternativamente, podem construir-se vírus quiméricos com características "suicidas". Tais vírus seriam submetidos apenas a um ou a poucos ciclos de replicação no hospedeiro. Quando utilizado como uma vacina, o vírus recombinante seria submetido apenas a um ciclo de replicação e induziria um nível suficiente de resposta imunitária mas nem iria mais longe no hospedeiro humano, nem causaria doença. Os vírus recombinantes isentos de um ou mais dos genes essenciais do vírus RS não seriam capazes de sofrer ciclos de replicação sucessivos. Tais vírus deficientes podem ser produzidos por co-transfecção de RNP reconstituídos isentos de um ou mais genes específicos em linhas celulares que expressam permanentemente este(s) gene(s). Vírus isentos de um ou mais genes essenciais serão replicados nestas linhas celulares mas quando administrados ao hospedeiro humano não serão capazes de completar um ciclo de replicação. Tais preparações podem transcrever e traduzir - neste ciclo abortivo - um número suficiente de genes para induzir uma resposta imunitária. Alternativamente, poderiam administrar-se quantidades maiores das estirpes de modo a que estas preparações sirvam como vacinas virais inactivadas (mortas). Para vacinas inactivadas, prefere-se que os produtos génicos heterólogo sejam expressos como uma componente viral de modo a que o produto génico esteja associado com o virião. A vantagem de tais preparações é que contêm proteínas nativas e não sofrem inactivação por tratamento com formalina ou outros agentes utilizados no fabrico das vacinas virais mortas.

Noutra concretização deste aspecto do invento, podem preparar-se formulações de vacinas inactivadas utilizando técnicas convencionais para "matar" o vírus quimérico. As vacinas inactivadas estão "mortas" no sentido que a sua infecciosidade foi destruída. Idealmente, a infecciosidade do vírus é destruída sem afectar a sua imunogenicidade. De forma a preparar vacinas inactivadas, o vírus quimérico pode ser

cultivado em cultura de células ou no alantóide de embrião de pintainho, purificado por ultracentrifugação por zonas, inactivado por formaldeído ou β-propiolactona e recolhido em conjunto. A vacina resultante é habitualmente inoculada por via intramuscular.

Os vírus inactivados podem ser formulados com um adjuvante adequado de modo a aumentar a resposta imunológica. Tais adjuvantes podem incluir, entre outros, géis minerais, por exemplo, hidróxido de alumínio; substâncias tensioactivas tais como lisolecitina, polióis Pluronics, polianiões; péptidos; emulsões de óleo; e adjuvantes humanos potencialmente úteis tais como BCG e *Corynebacterium parvum*.

Podem utilizar-se muitos métodos para introduzir as formulações de vacinas descritas atrás, incluindo entre outras as vias oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea e intranasal. Pode ser preferível introduzir a formulação de vacina viral quimérica através da via de infecção natural do patogénio para o qual se concebeu a vacina. Quando se utiliza uma preparação de vacina de vírus quimérico vivo, pode ser preferível introduzir a formulação através da via natural de infecção para o vírus influenza. A capacidade dos vírus RSV e influenza para induzir uma resposta imunitária celular e de excreção vigorosa pode ser utilizada vantajosamente. Por exemplo, a infecção do tracto respiratório por vírus RSV ou influenza quimérico pode induzir uma resposta imunitária de excreção vigorosa, por exemplo no sistema urogenital, com protecção concomitante contra um agente causador de doença específico.

As seguintes secções descrevem como exemplo e sem qualquer intuito de limitação, a manipulação dos genomas virais de cadeia negativa de ARN utilizando RSV como um exemplo para demonstrar a aplicabilidade dos métodos do presente invento para gerar vírus quiméricos com objectivos de expressão de genes heterólogos, geração de partículas virais infecciosas e partículas virais atenuadas com objectivos de vacinação.

6. SALVAMENTO DE VÍRUS SINCICIAIS RESPIRATÓRIOS (RSV) INFECCIOSOS UTILIZANDO ARN DERIVADO DE ADN RECOMBINANTES ESPECÍFICOS

Este exemplo descreve um processo para o salvamento de vírus sincicial respiratório (RSV) infeccioso, derivado de ADNc recombinantes que codificam o genoma de ARN completo de RSV para RSV estáveis e infecciosos, tal como referido na secção 5 atrás. Este processo pode ser utilizado na produção de vírus RSV quiméricos que podem expressar genes G e F heterólogos. Outro exemplo para obter a produção de RSV quimérico envolve a modificação de genes RSV nativos existentes tal é como adicionalmente descrito. Assim, este exemplo também descreve a utilidade deste processo na atenuação directa da patogenicidade RSV, resultando na produção de uma vacina com propriedades biológicas especificamente atribuídas e definidas para utilização em humanos.

A primeira etapa do processo de salvamento envolvendo o genoma de ARN de RSV completo requer síntese de uma cópia completa do genoma de 15 quilobases (Kb) de RSV estirpe A2. Tal é obtido pelo *splicing* conjunto de ADNc em cadeia dupla subgenómicos (utilizando procedimentos padrão para manipulação genética) com uma gama de tamanhos de 1 kb-3,5 kb para formar ADNc genómico completo. A determinação da sequência de nucleótidos do ADNc genómico permite identificação de erros introduzidos durante o processo de montagem; os erros podem ser corrigidos por mutagénese dirigida ou por substituição da região de erro com uma parte de ADN em cadeia dupla sintetizada quimicamente. Após montagem, posiciona-se o ADNc genómico adjacente a um promotor de transcrição (por exemplo, o promotor de T7) numa extremidade e uma sequência de ADN que permite terminação de transcrição na outra extremidade, por exemplo, uma endonuclease ou uma ribozima específicas para permitir síntese de uma cópia de ARN de sentido positivo ou negativo do genoma viral completo *in vitro* ou em células em cultura. As sequências de comando ou de final podem conter sequências adicionais tal como pretendido, tal como ribozima flanqueadora e terminadores de transcrição de T7 em tandem. A ribozima pode ser uma ribozima de vírus delta de hepatite ou

uma ribozima de cabeça de martelo e funciona para proporcionar uma extremidade 3' exacta isenta de nucleótidos não virais.

De acordo com este aspecto do invento, podem efectuar-se mutações, substituições ou deleções à sequência genómica RSV nativa que resulta num aumento da actividade de promotor de RSV. Os requerentes demonstraram que mesmo um aumento de actividade do promotor RSV aumenta grandemente a eficácia de salvamento de RSV, permitindo o salvamento de partículas de RSV infecciosas de um ADNc de RSV completo apresentando a mutação. Nomeadamente, uma mutação pontual na posição 4 do genoma (C para G) resulta num aumento de várias vezes da actividade de promotor e no salvamento de partículas virais infecciosas de um clone de ADNc de RSV completo apresentando a mutação.

O processo de salvamento utiliza a interacção do genoma de ARN de RSV estirpe A2 completo, que é transcrito a partir do ADNc construído com proteínas de vírus de RSV subgrupo B auxiliadoras dentro das células em cultura. Tal pode conseguir-se de vários modos. Por exemplo, pode transcrever-se *in vitro* e transfectar-se ARN genómico de vírus completo de RSV estirpe A2 para células infectadas com RSV estirpe B9320 tal como para células 293 utilizando protocolos de transfecção padrão. Além disso, ARN genómico de RSV estirpe A2 transcrito *in vitro* pode ser transfectado para uma linha celular que expressa as proteínas essenciais de RSV estirpe A2 (na ausência de vírus auxiliador) de genes virais integrados de modo estável.

Alternativamente, ARN genómico viral transcrito *in vitro* (RSV estirpe A2) pode também ser transfectado para células infectadas com um vírus heterólogo (por exemplo, nomeadamente vírus *vaccinia*) que expressa as proteínas auxiliadoras essenciais de RSV estirpe A2, especificamente as proteínas N, P, L e/ou M2-ORF1. Além disso, o ARN genómico transcrito *in vitro* pode ser transfectado para células infectadas com um vírus heterólogo, por exemplo vírus *vaccinia*, que expressa a polimerase de T7 e que permite expressão de proteínas auxiliadoras a partir dos ADN de plasmídeo transfectado contendo os genes auxiliadores N, P e L.

Em alternativa à transfecção de ARN genómico transcrito *in vitro*, pode transfectar-se ADN plasmídico contendo uma construção de ADNc de RSV completa para células infectadas com um vírus heterólogo, por exemplo vírus *vaccinia* que expressa as proteínas de RSV estirpe A2 auxiliadoras essenciais e polimerase de T7, permitindo assim transcrição do ARN genómico de RSV completo do ADN plasmídico contendo a construção de ADNc de RSV. O vírus *vaccinia* não necessita contudo de fornecer as próprias proteínas auxiliadoras mas apenas a polimerase de T7; podem então expressar-se proteínas auxiliadoras a partir de plasmídeos transfectados contendo os genes N, P, e L de RSV apropriadamente posicionados adjacentes aos seus próprios promotores de T7.

Quando o vírus em replicação proporciona a função auxiliadora durante as experiências de salvamento, utiliza-se a estirpe B9320 de RSV, permitindo diferenciação de salvamento de descendência dirigida contra RSV B9320. RSV estirpe A2 salva é identificada positivamente pela presença de sequências "marcadoras" de nucleótido específicas inseridas na cópia de ADNc do genoma RSV antes do salvamento.

O estabelecimento de um sistema de salvamento para RSV estirpe A2 nativo, ou seja, "de tipo selvagem" permite que sejam introduzidas modificações na cópia de ADNc do genoma RSV para construir RSV quimérico contendo sequências heterólogas de algum modo relativamente às de RSV nativo, de modo a que o vírus salvo resultante possa ser atenuado em termos de patogenicidade para proporcionar uma vacina humana eficaz e segura tal como discutido na secção 5.4 atrás.

Além da(s) alteração/ões (incluindo alteração resultante de translocação) do material genético RSV para proporcionar sequência heteróloga, este processo permite a inserção de genes "heterólogos" (ou seja, genes que não são nativos de RSV) ou suas componentes genéticas apresentando função biológica ou antigenicidade de modo a permitir expressão desses elementos genéticos; deste modo o RSV quimérico modificado pode actuar como um sistema de expressão para outras proteínas heterólogas ou elementos genéticos, tais como ribozimas, ARN anti-sentido, oligorribonucleótidos

específicos com potencial profilático ou terapêutico ou outras proteínas virais com objectivos de vacina.

6.1. SALVAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE COMANDO E DE FINAL DE RSV ESTIRPE A2 UTILIZANDO RSV ESTIRPE B9320 COMO VÍRUS AUXILIADOR

6.1.1. VÍRUS E CÉLULAS

Apesar de se ter utilizado RSV estirpe A2 neste exemplo, trata-se apenas de um exemplo. Encontra abrangida pela perícia na arte a utilização de outras estirpes de RSV subgrupo A de acordo com os ensinamentos deste exemplo. Encontram-se abrangidos pelo invento métodos que utilizam essas outras estirpes.

Cultivaram-se RSV estirpe A2 e RSV estirpe B9320 em células Hep-2 e células Vero respectivamente e utilizaram-se células 293 como hospedeiras durante experiências de transfecção/salvamento. Todas as três linhas celulares foram obtidas de ATCC (Rockville, Maryland).

6.1.2. CONSTRUÇÃO E ANÁLISE FUNCIONAL DE PLASMÍDEOS REPÓRTER

Construiu-se o plasmídeo pRSVA2CAT (figura 1) tal como descrito adiante.

Os ADNc das componentes de comando de 44 nucleótidos e de final de 155 nucleótidos de RSV estirpe A2 (consultar Mink et al., Virology 185: 615-624 (1991); Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 9663-9667 (1991)), a componente de final incluindo também a sequência consensual de promotor da polimerase de bacteriófago T7, foram montadas separadamente por hibridação controlada de oligonucleótidos com complementaridade de sobreposição parcial (consultar a figura 1). Os oligonucleótidos utilizados na hibridação foram sintetizados num sintetizador de ADN Applied Biosystems (Foster City, California). Os oligonucleótidos individuais e as suas posições relativas nas sequências de comando e de final são indicados na figura 1. Os oligonucleótidos utilizados para construção do comando foram:

1. 5'CGA CGC ATA TTA CGC GAA AAA ATG CGT ACA ACA AAC TTG CAT AAA C

2. 5'CAA AAA AAT GGG GCA AAT AAG AAT TTG ATA AGT ACC ACT TAA ATT TAA CT

3. 5'CTA GAG TTA AAT TTA AGT GGT ACT

4. 5'TAT CAA ATT CTT ATT TGC CCC ATT TTT TTG GTT TAT GCA AGT TTG TTG TA

5. 5'CGC ATT TTT TCG CGT AAT ATG CGT CGG TAC

Os oligonucleótidos utilizados para construção dos finais foram:

1. 5'GTA TTC AAT TAT ACT TAT TAA AAA TTA AAA ATC ATA TAA TTT TTT AAA TA

2. 5'ACT TTT ACT GAA CTA ATC CTA AAG TTA TCA TTT TAA TCT TGG AGG AAT AA

3. 5'ATT TAA ACC CTA ATC TAA TTG GTT TAT ATG TGT ATT AAC TAA ATT ACG AG

4. 5'ATA TTA GTT TTT GAC ACT TTT TTT CTC GTT ATA GTG AGT CGT ATT A

5. 5'AGC TTA ATA CGA CTC ACT ATA ACG A

6. 5'GAA AAA AAG TGT CAA AAA CTA ATA TCT CGT AAT TTA GTT AAT ACA CAT AT

7. 5'AAA CCA ATT AGA TTA GGG TTT AAA TTT ATT CCT CCA AGA TTA AAA TGA TA

8. 5'ACT TTA GGA TTA GTT CAC TAA AAG TTA TTT AAA AAA TTA TAT GAT TTT TA

9. 5'ATT TTT AAT AAC TAT AAT TGA ATA CTG CA

Ligaram-se então os ADNc completos de comando e de final, aos locais XbaI e PstI do gene repórter cloranfenicol-

acetiltransferase (CAT), respectivamente, para formar uma construção de ADNc linear de 1 kb RSV/CAT. Esta construção de ADNc foi então ligada aos locais KpnI e HindII de pUC 19. A integridade da construção pRSVA2CAT final foi verificada por análise de gel dos tamanhos dos produtos de digestão XbaI/PstI e KpnI/HindII. Ligaram-se então os ADNc de comando e de final completos ao gene da proteína fluorescente verde (GFP) utilizando locais de enzima de restrição adequados para formar uma construção de ADNc linear. O RSV-GFP-CAT resultante é uma construção bicistrónica repórter que expressa tanto CAT como GFP.

A transcrição *in vitro* de pRSVA2CAT linearizado com HgaI com polimerase de bacteriófago T7 foi efectuada de acordo com o protocolo do fornecedor de T7 (Promega Corporation, Madison, Wisconsin). Infectaram-se células 293 confluentes em placas de seis poços (~$1x10^6$ células por poço) com RSV estirpe B9320 a 1 unidade formadora de placas (p.f.u.) por célula e 1 hora depois transfectaram-se 5-10 µg do ARN transcrito *in vitro* a partir da construção pRSVA2CAT. O procedimento de transfecção seguiu o procedimento de transfecção de Collins et al., Virology 195: 252-256 (1993) e utilizou Transect/ACT™ e reagentes Opti-MEM de acordo com as especificação do fabricante (Gibco-BRL, Bethesda, Maryland). Às 24 horas após infecção ensaiaram-se as células 293 para actividade CAT utilizando um protocolo padrão ("Current Protocols in Molecular Biology", vol. 1, capítulo 9.6.2; Gorman, et al., 1982) Mol. Cell Biol. 2: 1044-1051). A detecção de níveis elevados de actividade CAT indicou que ARN em sentido negativo transcrito *in vitro* contendo as regiões "de comando" e de "de final" do genoma RSV estirpe A2 e o gene CAT podem ser encapsulados, replicados e expressos utilizando proteínas fornecidas por RSV estirpe B9320 (consultar figura 2). O nível de actividade CAT observado nestas experiências foi pelo menos tão elevado como o observado em experiências de salvamento semelhantes em que se utilizou RSV estirpe A2 homóloga como vírus auxiliador. A capacidade de um RSV estirpe B9320 de subgrupo B antigenicamente distinto suportar a encapsulação, replicação e transcrição de um ARN de RSV estirpe A2 de subgrupo A ainda não foi, tanto quanto sabemos, formalmente relatada até hoje.

6.2. CONSTRUÇÃO DE UM ADNc REPRESENTANDO O GENOMA COMPLETO DE RSV

Para obter um molde para síntese de ADNc purificou-se ARN genómico de RSV incluindo 15 222 nucleótidos a partir de células Hep-2 infectadas de acordo com o método descrito por Ward et al., J. Gen. Virol. 64: 167-1876 (1983). Baseado nas sequências de nucleótidos de RSV publicadas, sintetizaram-se oligonucleótidos utilizando um sintetizador de ADN da Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, California) para actuar como iniciadores para síntese de ADNc de primeira e segunda cadeia a partir de um molde de ARN genómico. As sequências de nucleótidos e as posições relativas dos iniciadores de ADNc e os locais-chave de endonuclease no interior do genoma RSV são indicados na figura 3. A produção de ADNc a partir de ARN genómico viral foi efectuada de acordo com o protocolo de transcrição inversa/reacção de polimerização em cadeia (RT/PCR) de Perkin Elmer Corporation, Norwalk, Connecticut (consultar igualmente Wang et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 9717-9721); purificaram-se os ADNc amplificados por electroeluição da banda de ADN apropriada dos géis de agarose. Ligou-se directamente o ADN purificado para o vector de plasmídeo pCRII (Invitrogen Corp. San Diego) e transformou-se quer para células "One Shot" de *E. coli* (Invitrogen) quer para células "SURE" de *E. coli* (Stratagene, San Diego). Os ADNc resultantes, clonados e específicos de vírus, foram montados por técnicas de clonagem padrão (Sambrook et al., "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor laboratory Press (Cold Spring Harbor, New York, 1989) para produzir um ADNc que abrange o genoma de RSV completo. Sequenciou-se o ADNc genómico completo e substituíram-se as sequências incorrectas por mutagénese dirigida ou ADN sintetizado quimicamente. Introduziram-se substituições de nucleótidos nas bases 7291 e 7294 (sendo a base número 1 no início da extremidade 3' do ARN genómico) no gene "F", para produzir um novo local de endonuclease StuI e nas posições 7423, 7424 e 7425 (também no gene F) para produzir um novo local PmeI. Estas alterações foram concebidas para actuar como marcadores definitivos para eventos de salvamento. A polimerase de bacteriófago T7 e o local de endonuclease HgaI foram colocados em extremidades opostas do ADNc do genoma viral de modo a poderem

sintetizar-se *in vitro* os genomas virais de ARN em sentido quer negativo quer positivo. Os ADNc que representam as sequências de promotor de polimerase de T7 e a sequência de reconhecimento para HgaI foram sintetizadas num sintetizador de ADN Applied Biosystems e foram ligadas independentemente às extremidades do ADNc de genoma viral ou foram adicionadas como uma parte integral dos iniciadores de PCR durante a amplificação da porção terminal do ADNc genómico, onde apropriado; este último procedimento foi utilizado na ausência de locais de endonuclease adequados perto dos terminais de ADNc genómico evitando ligação directa de ADNc sintetizado quimicamente de promotor de T7/local HgaI ao ADNc genómico. Esta construção completa (ADNc genómico e sequência flanqueadora de reconhecimento promotor de T7/HgaI) foi então clonada nos locais KpnI/NotI do fagemídeo Bluescript II SK (Stratagene, San Diego) do qual se tinha removido o promotor de T7 endógeno por mutagénese dirigida. O ARN transcrito desta construção genómica completa pode ser salvo utilizando vírus auxiliador RSV subgrupo B para proporcionar RSV infeccioso de acordo com o exemplo 6.1. Este sistema de salvamento básico para o ARN genómico completo nativo de RSV estirpe A2, ou seja, de tipo selvagem, pode ser utilizado para introduzir várias modificações na cópia de ADNc do genoma resultando na introdução de sequências heterólogas no genoma. Tais alterações podem ser concebidas para reduzir a patogenicidade viral sem restringir a replicação do vírus até um ponto em que o salvamento se torna impossível ou no qual a expressão génica viral é insuficiente para estimular imunidade adequada.

Utilizaram-se os seguintes oligonucleótidos para construir a sequência ribozima/terminador de T7:

5'GGT*GGCCGGCATGGTCCCAGC

3'CCA CCGGCCGTACCAGGGTCG

CTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACA

GAGCGACCGCGGCCGACCCGTGTG

TTCCGAGGGGACCGTCCCCTCGGT

AAGGCTCCCCTGGCAGGGGAGCCA

AATGGCGAATGGGACGTCGACAGC

TTACCGCTTACCCTGCAGCTGTCG

TAACAAAGCCCGAAGGAAGCT

ATTGTTTCGGGCTTCCTTCGA

GAGTTGCTGCTGCCACCGTTG

CTCAACGACGACGGAGGCAAC

AGCAATAACTAGATAACCTTGGG

TCGTTATTGATCTATTGGAACCC

CCTCTAAACGGGTCTTGAGGGTCT

GGAGATTTGCCCAGAACTCCCAGA

TTTTGCTGAAAGGAGGAACTA

AAAACGACTTTCCTCCTTGAT

TATGCGGCCGCGTCGACGGTA

ATACGCCGGCGEAGCTGCCAT

CCGGGCCCGCCTTCGAAG3'

GGCCCGGGCGGAAGCTTC5'

Gerou-se um clone de ADNc contendo o genoma completo de RSV, um promotor de T7, uma ribozima de vírus de hepatite delta e um terminador de T7. Esta construção pode ser utilizada para gerar ARN antigenómico ou RSV *in vivo* na presença de polimerase de T7. A análise de sequência indicou que o plasmídeo continha poucas mutações no genoma RSV.

6.2.1. MODIFICAÇÕES DO GENOMA RSV

Por exemplo, poderiam inserir-se os genes F e G de RSV de subgrupo B humano num genoma que pertencia a RSV estirpe A (em vez dos genes F e G de RSV estirpe A ou adicionalmente a estes).

Estas modificações incluem adicionalmente deleções do quadro de leitura aberto M2-2.

6.3. SALVAMENTO DE UM ADNc QUE REPRESENTA O GENOMA COMPLETO DE RSV

6.3.1. CONSTRUÇÃO E ANÁLISE FUNCIONAL DE PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO

Os genes N, P e L de RSV codificam a polimerase viral de RSV. A função dos genes M de RSV é desconhecida. A capacidade dos plasmídeos de expressão N, P, M e L de RSV desempenharem a função de proteínas de RSV estirpe A2 auxiliadora foi avaliada tal como descrito adiante. Clonaram-se os genes N, P, L e M2-1 de RSV no vector PCITE 2a(+) modificado (Novagen, Madison, Wisconsin) sob o controlo do promotor de T7 e flanqueado por um terminador de T7 na sua extremidade 3'. Modificou-se PCITE-2a(+) por inserção de uma sequência de terminador de T7 de PCITE-3a(+) nos locais AlwnI e BglII de pCITE-2a(+). A funcionalidade dos plasmídeos de expressão N, P, e L foi determinada pela sua capacidade de replicar o pRSVA2CAT transfectado. A uma confluência de aproximadamente 80%, infectaram-se células Hep-2 em placas de seis poços com MVA a uma moi de 5. 1 hora depois, transfectaram-se as células infectadas com $pRSVA_2CAT$ (0,5 mg) e com plasmídeos que codificam os genes N (0,4 mg), P (0,4 mg) e L (0,2 mg) utilizando lipofecTACE (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland). A transfecção decorreu durante 5 horas ou durante a noite e seguidamente substituiu-se o meio de transfecção com MEM fresco contendo FBS (soro fetal bovino) a 2%. Dois dias após a infecção, lisaram-se as células e analisaram-se os lisados relativamente a actividade CAT utilizando o kit CAT ELISA de Boehringer Mannheim. Detectou-se actividade CAT nas células que tinham sido transfectadas com os plasmídeos N, P, e L conjuntamente com $pRSVA_2CAT$. Contudo, não se detectou qualquer actividade CAT quando qualquer um dos plasmídeos de expressão foi omitido. Além disso, a co-transfecção de RSV-GFP-CAT com os plasmídeos de expressão N, P, e L resultou na expressão de ambas as proteínas GFP e CAT. As razões dos diferentes plasmídeos de expressão e moi do vírus *vaccinia* recombinantes foram optimizadas no sistema de expressão de gene repórter.

6.3.2. RECUPERAÇÃO DE RSV INFECCIOSO A PARTIR DE ADNc DE RSV COMPLETO

Infectaram-se células Hep-2 com MVA (vírus *vaccinia* recombinante que expressa polimerase de T7) a uma moi de um. Cinquenta minutos depois adicionou-se às células mistura de transfecção. A mistura de transfecção consistiu de 2 µg de vector de expressão N, 2 µg de vector de expressão P, 1 µg de vector de expressão L, 1,25 µg de vector de expressão M2/ORF1, 2 µg de clone de genoma de RSV com promotor aumentado, 50 µl de LipofecTACE (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland) e 1 ml de OPTI-MEM. Decorrido um dia substituiu-se a mistura de transfecção com MEM contendo FCS a 2%. Incubaram-se as células a 37°C durante 2 dias. Recolheu-se o sobrenadante de transfecção e utilizou-se para infectar células Hep-2 frescas na presença de arac (fármaco contra vírus *vaccinia*) a 40 µg/ml. Incubaram-se as células Hep2 infectadas durante 7 dias. Após recolha do sobrenadante P1, utilizaram-se as células para imunocoloração utilizando anticorpos dirigidos contra proteína F de RSV estirpe A2. Identificaram-se seis locais corados positivamente com fusão célula-célula visível (típico para infecção por RSV). Extraiu-se o ARN do sobrenadante P1 e utilizou-se como molde para análise de RT-PCR. Geraram-se produtos de PCR correspondentes às regiões F e M2. Ambos os produtos continham os marcadores introduzidos. No controlo, os produtos de PCR derivados de vírus RSV natural estavam isentos dos marcadores.

Criou-se uma mutação pontual na posição 4 da sequência de comando do clone de genoma de RSV (resíduo C para G) e designou-se este clone de genoma como pRSVC4GLwt. Tinha-se demonstrado que, num contexto de gene repórter, este clone aumentava várias vezes a actividade de promotor comparativamente com o tipo selvagem. Após introdução desta mutação no genoma completo, o vírus infeccioso foi salvo do clone de ADNc. O vírus RSV recombinante salvo formou placas mais pequenas do que o vírus RSV de tipo selvagem (figura 8).

Este sistema permite salvar o RSV mutado. Assim, pode ser uma excelente ferramenta para conceber racionalmente vacinas atenuadas vivas contra RSV e para utilizar vector e vírus RSV

para obter expressão génica heteróloga. Pode ser possível expressar proteína G de RSV tipo B num ambiente de tipo A, de modo que a vacina é capaz de proteger de infecção por RSV tanto de tipo A como de tipo B. Pode também ser possível obter atenuação e mutações sensíveis à temperatura no genoma RSV por alteração da ordem génica ou por mutagénese dirigida da proteína L.

6.4. UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA DIFERENCIAR ENTRE VÍRUS SALVOS E VÍRUS AUXILIADORES

De modo a neutralizar o vírus auxiliador RSV estirpe B9320 e facilitar identificação de RSV estirpe A2 salvo, produziram-se anticorpos monoclonais contra RSV estirpe B9320 do seguinte modo.

Infectaram-se seis ratinhos fêmea BALB/c por via intranasal (i.n.) com 10^5 unidades formadoras de placas (p.f.u.) de RSV B9320, seguido 5 semanas mais tarde por inoculação intraperitoneal (i.p.) de 10^6-10^7 pfu de RSV B9320 numa mistura contendo adjuvante completo de Freund a 50%. Duas semanas após inoculação i.p., ensaiou-se uma amostra de sangue de cada ratinho para a presença anticorpo específico de RSV utilizando um ensaio de neutralização padrão (Beeler e Coelingh, J. Virol. 63: 2941-2950 (1988)). Os ratinhos que produziram o nível mais elevado de anticorpo neutralizante foram adicionalmente reforçados com 10^6 p.f.u. de RSV estirpe B9320 em solução salina tamponada de fosfato (PBS) injectada por via intravenosa na base da cauda. Três dias depois sacrificaram-se os ratinhos e recolheram-se os seus baços como uma fonte de células B produtoras de anticorpos monoclonais. Removeram-se cuidadosamente esplenócitos (incluindo células B) do baço do ratinho através de incisões efectuadas na cápsula do baço em 5 ml de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DME). Deixaram-se sedimentar agregados de células e as células em suspensão remanescentes foram recolhidas separadamente por centrifugação a 2000 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente. Estes sedimentos celulares foram ressuspensos em 15 ml de NH_4Cl 0,83 (p/v) e deixou-se repousar durante 5 minutos para lisar os eritrócitos. Recolheram-se então os esplenócitos por centrifugação como anteriormente através de uma almofada de

10 ml de soro fetal de vitelo. Enxaguaram-se então os esplenócitos com DME, tornaram-se a sedimentar e finalmente ressuspenderam-se em 20 ml de DME fresco. Estes esplenócitos foram então misturados com células Sp2/0 (uma linha celular de mieloma de ratinho utilizada como parceira de fusão para a imortalização de esplenócitos) numa razão de 10:1 de células de baço:células Sp2/0. Obtiveram-se células Sp2/0 de ATCC e mantiveram-se em DME suplementado com soro fetal bovino a 10%. Centrifugou-se então a mistura celular durante 8 minutos a 2000 x g à temperatura ambiente. Ressuspendeu-se o sedimento celular em 1 ml de polietilenoglicol a 50% com 1000 de peso molecular (PEG 1000), seguido da adição de volumes iguais de DME a intervalos de 1 minuto até se obter um volume final de 25 ml. Sedimentaram-se então as células fundidas como antes efectuado e ressuspenderam-se a 3,5 x 10^6 células de baço ml^{-1} em meio de crescimento (meio condicionado a 50% de células SP2/0, meio HA a 50% contendo 100 ml de RPMI, 25 ml de F.C.S., 100 µgml de gentamicina, 4 ml de 50X meio de hipoxantina, timidina, aminopterina (HAT) fornecido como uma mistura de preparado de Sigma Chem. Co., St. Louis, Missouri). Distribuiu-se a suspensão celular ao longo de placas de poços (200 µl $poço^{-1}$) e incubou-se a 37°C, humidade 95 e CO_2 a 5%. Subcultivaram-se então colónias de células de hibridoma (esplenócitos e células Sp2/0 fundidos) em placas de 24 poços e cresceu-se até próximo da confluência; o meio de crescimento sobrenadante foi então amostrado para a presença de anticorpos monoclonais neutralizantes de RSV estirpe B9320 utilizando um ensaio de neutralização padrão (Beeler e Coelingh, J. Virol. 63: 2941-50 (1988)). Ressupenderam-se células de hibridoma de poços com actividade neutralizante em meio de cultura e diluíram-se para uma densidade celular de 0,5 células por 100 µl e plaqueou-se em placas de 96 poços, 200 µl por poço. Este procedimento assegurou a produção de monoclones (ou seja, linhas celulares de hibridoma derivadas de uma única célula) que foram então tornadas a ensaiar para a produção de anticorpos monoclonais neutralizantes. As linhas celulares de hibridoma que produziram anticorpos monoclonais capazes de neutralizar RSV estirpe B9320 mas não RSV estirpe A2 foram subsequentemente infectadas para ratinhos, i.p. (10^6 células por ratinho). Duas semanas após a injecção i.p. retirou-se fluido de ascites de ratinho contendo anticorpos monoclonais

neutralizantes para RSV estirpe B9320 com uma agulha de calibre 19 e armazenou-se a -20°C.

Utilizaram-se estes anticorpos monoclonais para neutralizar o vírus auxiliador RSV estirpe B9320 após salvamento de RSV estirpe A2 tal como descrito na secção 9.1. Tal foi efectuado por diluição de anticorpos monoclonais neutralizantes 1 para 50 com ágar-ágar a 0,4% (p/v) derretido em meio mínimo essencial de Eagle (EMEM) contendo F.C.S. a 1%. Esta mistura foi então adicionada a monocamadas de células Hep-2 que tinham sido infectadas com a descendência de experiências de salvamento a uma m.o.i. de 0,1-0,01 p.f.u. por célula. Os anticorpos monoclonais na sobrecamada de ágar-ágar inibiram o crescimento de RSV estirpe B9320, mas permitiram a crescimento de RSV estirpe A2, resultando na formação de placas pela estirpe A2. Recolheram-se estas placas utilizando uma pipeta de Pasteur para remover um disco de ágar-ágar sobre a placa e as células infectadas do interior da placa; ressuspendeu-se as células e o disco de ágar-ágar em 2 ml de EMEM, FCS a 1% e o vírus foi plaqueado novamente na presença de anticorpo monoclonal numa monocamada fresca de células Hep-2 para purificar adicionalmente de vírus auxiliador. O vírus plaqueado duas vezes foi então utilizado para infectar células Hep-2 em placas de vinte e quatro poços e a sua descendência foi utilizada para infectar placas de seis poços a uma m.o.i. de 0,1 p.f.u. por célula. Finalmente, utilizou-se o ARN celular infectado total de um poço das placas de seis poços numa reacção de RT/PCR utilizando uma primeira e segunda cadeias iniciadoras de cada um dos lados das “sequências marcadoras” (introduzidas no genoma de RSV estirpe A2 para actuarem como um meio de reconhecimento de eventos de salvamento) tal como descrito na secção 6.2 atrás. O ADN produzido na reacção de RT/PCR foi subsequentemente digerido com StuI e PmeI para identificar positivamente as “sequências marcadoras” introduzidas no ADNc de RSV estirpe A2 e assim estabelecer a validade do processo de salvamento.

8. EXEMPLO: EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS G E F DE RSV SUBGRUPO B POR RSV ESTIRPE A2

Conduziram-se as seguintes experiências para gerar um RSV quimérico que expressa os polipéptidos antigénicos de mais que uma estirpe de RSV. Dois subgrupos antigénicos principais (A e B) de vírus sincicial respiratório (RSV) causam doenças humanas. As glicoproteínas F e G são os dois principais determinantes antigénicos de RSV. Estima-se que as glicoproteínas F de vírus de subgrupo A e B estão relacionadas em 50%, enquanto que as glicoproteínas G estão consideravelmente menos relacionadas, cerca de 1-5%. A infecção de RSV subgrupo A induz uma resistência parcial ou não induz qualquer resistência à replicação de uma estirpe de subgrupo B e vice-versa. Ambas as vacinas de vírus RSV do subgrupo A e do subgrupo B são necessárias para proteger de infecção por RSV.

A primeira abordagem aqui descrita é fazer um clone de ADNc de RSV quimérico infeccioso que expressa antigénios do subgrupo B por substituição da região G e F do clone de ADNc de RSV A2 infeccioso em causa por genes G e F de subgrupo B. O RSV quimérico seria específico antigénico de subgrupo B. A segunda abordagem aqui descrita é inserir o gene G de subgrupo B no clone de ADNc de A2 em causa de modo a que um vírus expressaria tanto antigénios específicos de subgrupo A como de subgrupo B.

8.1. SUBSTITUIÇÃO DE G E F DE A2 PELOS GENES G E F DE B9320

Amplificaram-se os genes G e F de RSV de subgrupo B estirpe B9320 a partir de ARNv de B9320 por RT/PCR e clonou-se no vector pCRII para determinação de sequência. Criou-se o local BamHI nos oligonucleótido iniciadores utilizados para RT/PCR de modo a clonar os genes G e F de estirpe B9320 num ADNc antigenómico A2 (figura 4A). Primeiramente o fragmento de ADNc que continha os genes G e F desde nt 4326 até nt 9387 da estirpe A2 foi subclonado em pUC 19 (pUCR/H). Criaram-se locais BglII nas posições de 4630 (junção intergénica SH/G) e 7554 (junção intergénica F/M2), respectivamente pelo kit de mutagénese dirigida Quickchange (Stratagene, La Jolla, California). Digeriu-se o ADNc de G e

F de B9320 inserido no vector pCR.II com enzima de restrição BamHI e seguidamente subclonou-se em pUCR/H digerido com BglII do qual se tinham removido os genes G e F de A2. Utilizou-se o clone de ADNc com os genes G e F de A2 substituídos por G e F de B9320 para substituir a região de XhoI a MscI do ADNc antigenómico de A2 completo. O clone de ADNc antigenómico resultante foi denominado pRSVB-GF e foi utilizado para transfectar células Hep-2 para gerar vírus infeccioso RSVB-GF.

A geração de vírus RSVB-GF quimérico foi como se segue, transfectou-se pRSVB-GF conjuntamente com plasmídeos que codificam proteínas N, P, e L para células Hep-2 que tinham sido infectadas com MVA, um vírus *vaccinia* recombinante que expressa a ARN-polimerase de T7. Distribuíram-se as células Hep-2 um dia antes da transfecção em placas de seis poços. Infectaram-se monocamadas de células Hep-2 a uma confluência de 60%-70% com MVA a uma moi de 5 e incubaram-se a 35°C durante 60 min. Lavaram-se então as células uma vez com OPTI-MEM (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland). Substituiu-se cada placa com 1 ml de OPTI-MEM e adicionou-se 0,2 ml de meio de transfecção. Preparou-se o meio de transfecção por mistura de cinco plasmídeos num volume final de 0,1 ml de meio OPTI-MEM, nomeadamente 0,6 µg de pRSVB-GF antigenoma de RSV, 0,4 µg de plasmídeo N, 0,4 µg de plasmídeo P e 0,2 µg de plasmídeo L. Tal foi combinado com 0,1 ml de OPTI-MEM contendo 10 µl de lipofecTACE (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, E.U.A.). Após uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se ADN/lipofecTACE às células e substituiu-se o meio um dia depois com MEM contendo FBS a 2%. Incubaram-se adicionalmente as culturas a 35°C durante 3 dias e recolheram-se os sobrenadantes. Utilizaram-se então alíquotas dos sobrenadantes de cultura para infectar células Hep-2 frescas. Após incubação durante 6 dias a 35°C, recolheu-se o sobrenadante e fixaram-se as células e coraram-se por um método indirecto de peroxidase de rábano utilizando anticorpo anti-RSV de cabra (Biogenesis, Sandown, New Hampshire) seguido de um anticorpo anti-cabra de coelho ligado a peroxidase de rábano. As células infectadas com vírus foram então detectadas por adição de substrato cromogénico (DAKO, Carpinteria, California, E.U.A.) de acordo com as instruções

do fabricante. Detectaram-se placas do tipo RSV nas células que foram infectadas com os sobrenadantes de células transfectadas com pRSVB-GF. O vírus foi adicionalmente purificado por placas duas vezes e amplificado em células Hep-2.

Caracterizou-se vírus RSVB-GF recombinante por RT/PCR utilizando iniciadores específicos de RSV subgrupo B. Extraíram-se dois isolados de vírus RSVB-GF recombinante purificados independentemente com um kit de extracção de ARN (Tel-Test, Friendswood, Texas) e precipitou-se ARN com isopropanol. Os ARN de virião foram hibridados com um iniciador abrangendo a região de RSV desde 4468 nt até 4492 nt e incubaram-se durante 1 hora sob condições RT padrão (reacções de 10 µl) utilizando transcriptase inversa Superscript (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland). Submeteram-se alíquotas de cada reacção a PCR (30 ciclos a 94°C durante 30 s, 55°C durante 30 s e 72°C durante 2 min) utilizando iniciadores específicos de subgrupo B na região G (CACCACCTACCTTACTCAAGT e TTTGTTTGTGGGTTTGATGGTTGG). Analisaram-se os produtos de PCR por electroforese em gel de agarose a 1% e visualizaram-se por coloração com brometo de etídio. Tal como apresentado na figura 5, não se produziu qualquer produto de ADN em reacções de RT/PCR utilizando RSV estirpe A2 como molde. Contudo, detectou-se um produto previsto de 254 pb em reacções de RT/PCR utilizando ARN de RSVB-GF ou o plasmídeo de controlo de PCR, ADN de pRSVB-GF, como molde, indicando que o vírus salvo continha os genes G e F genes derivados do vírus B9320.

8.2. EXPRESSÃO DE B9320G POR VÍRUS RSV A2

Amplificou-se gene G de RSV estirpe B9320 de subgrupo B a partir de ARNv de B9320 por RT/PCR e clonou-se para vector pCRII para determinação de sequência. Incorporaram-se dois locais BglII nos iniciadores de PCR que também continham sinais de início de gene e de final de gene (GATATCAAGATCTACAATAACATTGGGGCAAATGC e GCTAAGAGATCTTTTTGAATAA CTAAGCATG). Digeriu-se a inserção de ADNc de B9320G com BglII e clonou-se para a junção intergénica SH/G (4630 nt) ou F/M2 (7552 nt) de um subclone de ADNc A2 (figura 4B e figura 4C). O fragmento XhoI até MscI contendo a inserção B9320G na

região intergénica SH/G ou F/M2 foi utilizado para substituir a região de XhoI a MscI correspondente do ADNc antigenómico A2. O clone de ADNc antigenómico de RSV resultante foi denominado pRSVB9320G-SH/G ou pRSVB9320G-F/M2.

A geração de vírus RSV A2 apresentando o gene G de B9320 inserido na região intergénica F/M2 foi efectuada de modo semelhante ao que foi descrito para geração de vírus RSVB-GF. Sucintamente, transfectaram-se pRSVB9320G-F/M2 conjuntamente com plasmídeos que codificam as proteínas N, P e L para células Hep-2 infectaram-se com um vírus *vaccinia* recombinante MVA que expressa a ARN-polimerase de T7 (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland). Substituiu-se o meio celular transfectado com MEM contendo soro fetal bovino (FBS) a 2% um dia após transfecção e incubou-se adicionalmente durante 3 dias a 35°C. Utilizaram-se então alíquotas de sobrenadantes de cultura (PO) para infectar células Hep-2 frescas. Após incubação durante 6 dias a 35°C, recolheu-se o sobrenadante e fixaram-se as células e coraram-se com um método de peroxidase de rábano indirecto utilizando anticorpo anti-RSV de cabra (Biogenesis) seguido de um anticorpo anti-cabra de coelho ligado a peroxidase de rábano. Detectaram-se então as células infectadas por vírus por adição de substrato cromogénico (Dako). Detectaram-se placas do tipo RSV nas células que foram infectadas com os sobrenadantes de células transfectadas com pRSVB9320G/F/M2.

A caracterização de vírus pRSVB9320G-F/M2 foi efectuada por RT/PCR utilizando iniciadores específicos de B9320G. Observou-se um produto de PCR previsto de 410 pb na amostra de RT/PCR utilizando ARN de pRSVB9320G-F/M2 como molde, indicando que o vírus salvo contém o gene G derivado de B9320 (figura 6).

A expressão do gene G inserido em RSV B9320 foi analisada por hibridação de *Northern* utilizando um oligonucleótido marcado com ^{32}P específico para ARNm de A2-G ou B-G. Extraiu-se ARN celular total de células Hep-2 infectadas com RSVB 9320 de tipo selvagem, rRSVA2 ou rRSVB9320G-F/M2 48 horas após infecção utilizando um kit de extracção de ARN (ARN stat-60, Tel-Test). O ARN foi submetido a electroforese num gel de agarose a 1,2% contendo formaldeído e

transferiu-se para uma membrana de *nylon* (Amersham). Marcaram-se um oligonucleótido específico para o gene G da estirpe A2 (5'-TCTTGACTGTTGTGGATTGCAGGGTTGACTTGACTCCGATCGATCC-3') e um oligonucleótido específico para o gene G de B9320 (5'-CTTGTGTTGTTGTTGTATGGTGTGTTTCTGATTTTGTATTGATCGATCC-3') com ^{32}P-ATP através de uma reacção de quinase conhecida dos peritos na arte. A hibridação da membrana com um dos oligonucleótidos específicos de gene G marcados com ^{32}P foi efectuada a 65°C e lavada de acordo com procedimentos padrão. Detectaram-se ARN específicos de A2-G e de B9320-G nas células Hep-2 infectadas com rRSVB9320G-F/M2 (figura 6B). Estes resultados demonstram expressão de ARN específica do subtipo.

Comparou-se a expressão de proteína de rRSVA2 (B-G) quimérico com a de RSV B9320 e rRSV por imunoprecipitação de lisados celulares de Hep-2 infectados marcados com ^{35}S. Sucintamente, marcaram-se as células infectadas com vírus com ^{35}S-promix (^{35}S-Cys e ^{35}S-Met a 100 µCi/ml, Amersham, Arlington Heights, Illinois) entre as 14 e as 18 horas após infecção de acordo com um protocolo conhecido dos peritos na arte. Lisaram-se as monocamadas celulares com tampão RIPA e imunoprecipitaram-se os polipéptidos com anti-soro policlonal desenvolvido em cabra contra vírus RSV A2 destruído com detergente (figura 7, pistas 1-4) ou anti-soro desenvolvido em ratinho contra viriões B9320 não destruídos (figura 7, pistas 5-8). Submeteram-se os polipéptidos imunoprecipitados marcados radioactivamente a electroforese em géis de poliacrilamida a 10% contendo SDS a 0,1% e detectou-se por autorradiografia. O soro anti-RSV A2 imunoprecipitou os polipéptidos principais da estirpe A2 de RSV, enquanto que o soro anti-B9320 reagiu principalmente com proteína G de RSV B9320 e a proteína F conservada de ambos os subgrupos A e B. Tal como apresentado na figura 7, imunoprecipitou-se uma proteína que é idêntica à proteína A2-G (pista 3), a partir de células infectadas com rRSVA2 (B-G) (pista 4) utilizando um anti-soro contra RSV A2. A proteína G da estirpe B9320 de RSV não foi reconhecida pelo anti-soro anti-A2. Imunoprecipitou-se uma espécie de proteína, menor que a proteína A2-G, a partir de células infectadas com B9320 (pista 6) e com rRSVA2 (B-G) (pista 9) utilizando o anti-soro desenvolvido em ratinho contra viriões B9320. Este

polipéptido não estava presente nas células não infectadas e infectadas com RSV A2 e provavelmente representa a proteína G específica para RSV B estirpe 9320. A comparação da sequência de aminoácidos das proteínas G de RSV A2 e de RSV B9320 indicou que se encontram presentes dois locais de glicosilação N adicionais potenciais (N-X-S/t) na proteína G de RSV A2, que podem contribuir para abrandar a migração da proteína G de A2 nas condições utilizadas. A proteína F de RSV B9320 também migrou ligeiramente mais depressa do que a proteína F de RSV A2. As proteínas P e M também apresentaram diferenças de mobilidade entre os dois subtipos de vírus. Desconhece-se a identidade do polipéptido perto do topo do gel de proteína presente em células infectadas FSV B9320 e rRSVA2 (B-G). Os anti-soros desenvolvidos em ratinhos contra os viriões RSV B9320 reconheceram fracamente as proteínas N, P e M e são comparados com o anti-soro de cabra desenvolvido contra RSV estirpe A2. Os dados descritos atrás indicam claramente que rRSV A2 (B-G) quimérico expressa ambas as proteínas G específicas de RSV A2 e de B9320.

8.2.1 REPLICAÇÃO DE RSV RECOMBINANTE EM CULTURA DE TECIDOS

Purificaram-se com placas vírus RS recombinantes três vezes e amplificaram-se em células Hep-2. Os ensaios de placa foram efectuados em células Hep-2 em placas de 12 poços utilizando uma sobrecamada de metilcelulose a 1% e 1 x meio L15 contendo soro fetal bovino a 2% (FBS). Após incubação a 35°C durante 6 dias, fixaram-se as monocamadas com metanol e identificaram-se placas por imunocoloração. O tamanho e morfologia das placas de rRSV foi muito semelhante ao de RSV A2 de tipo selvagem (figura 8). Contudo, as placas formadas por rRSVC4G foram menores que rRSV e vírus A2 de tipo selvagem. A única diferença genética entre rRSV e rRSVC4 foi a substituição de um único nucleótido na região de comando de RSV. Consequentemente, o menor tamanho de placas de rRSV A2 (B-G) não foi distinguível de rRSVC4G.

As curvas de crescimento de rRSV, rRSVC4G e rRSV A2 (B-G) foram comparadas com as de vírus A2 de tipo selvagem derivado biologicamente. Cresceram-se células Hep-2 em frascos de cultura T25 e infectaram-se com rRSV, rRSVC4G, rRSVA2 (B-G), ou RSV estirpe A2 de tipo selvagem a uma moi de 0,5. Após

1 hora de adsorção a 37°C, lavaram-se as células três vezes com MEM contendo FBS a 2% e incubaram-se a 37°C em CO_2 a 5%. A intervalos de 4 horas após infecção, recolheram-se 250 µl do sobrenadante de cultura e armazenou-se a -70°C até titulação do vírus. Cada alíquota retirada foi substituída com uma quantidade igual de meio fresco. Determinou-se o título de cada vírus por ensaio de placa em células Hep-2 e visualizou-se por imunocoloração (consultar atrás). Tal como apresentado na figura 9, a cinética de crescimento de rRSV é muito semelhante à de vírus de A2 de tipo selvagem. Atingiu-se título de vírus máximo para todos os vírus entre 48 h e 72 h. O título de vírus de rRSVC4G foi cerca de 2,4 vezes (às 48 h) e 6,6 vezes (às 72 h) menor que rRSV e A2 de RSV de tipo selvagem. O baixo crescimento de rRSVC4G pode também ficar a dever-se à substituição de um único nucleótido na região de comando. O rRSV A2 (B-G) quimérico apresentou uma cinética mais lenta e um máximo de título mais baixo (figura 9).

10. GERAÇÃO DE CANDIDATO A VACINA DE VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (RSV) HUMANO POR DELEÇÃO DOS GENES VIRAIS SH E M2ORF2

10.1. MUTANTE DE DELEÇÃO M2-2

Para eliminar os genes M2-2 introduziram-se dois locais de enzima de restrição HindIII nos nucleótidos de RSV 8196 e 8430, respectivamente, num subclone de ADNc pET (S/B) que continha um fragmento de restrição RSV de 4478 a 8505. O fragmento de restrição RSV tinha sido preparado previamente por mutagénese dirigida Quikchange (Strategene, La Jolla, California). A digestão de pET (S/B) com a enzima de restrição HindIII removeu uma sequência de 234 nucleótidos que continha a maioria do quadro de leitura aberto de M2-2. Os nucleótidos que codificam os primeiros 13 aminoácidos no terminal N do produto génico de M2-2 não foram removidos porque esta sequência sobrepõe-se a M2-1. O fragmento de ADNc que continha a deleção do gene M2-2 foi digerido com SacI e BamHI e clonado novamente no clone de ADNc de RSV completo, denominado pRSVΔM2-2

Gerou-se RSV infeccioso com esta deleção M2-2 por transfecção do plasmídeo pRSVΔM2-2 para células Hep-2 infectadas com MVA que expressam os genes N, P e L. Sucintamente, transfectou-se pRSVΔM2-2, conjuntamente com plasmídeos que codificam as proteínas N, P e L, para células Hep-2 que tinham sido infectadas com um vírus *vaccinia* (MVA) recombinante que expressa ARN-polimerase de T7.

A transfecção e recuperação de RSV recombinante foi efectuada da seguinte forma. Separaram-se células Hep-2 cinco horas ou um dia antes da transfecção em placas de seis poços. Infectaram-se monocamadas de células Hep-2 a 70%-80% de confluência com MVA a uma multiplicidade de infecção (moi) de 5 e incubaram-se a 35°C durante 60 min. As células foram então lavadas uma vez com OPTI-MEM (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland). Substituiu-se cada placa com 1 ml de OPTI-MEM e adicionou-se 0,2 ml de meio de transfecção. O meio de transfecção foi preparado por mistura de 0,5-0,6 µg de antigenoma RSV, 0,4 µg de plasmídeo N, 0,4 µg de plasmídeo P e 0,2 µg de plasmídeo L num volume final de 0,1 ml de meio OPTI-MEM. Tal foi combinado com 0,1 ml de OPTI-MEM contendo 10 µl de lipofecTACE (Life Technologies). Após uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se a mistura ADN/lipofecTACE às células. Substituiu-se o meio um dia mais tarde com MEM contendo FBS a 2%. As culturas foram incubadas adicionalmente a 35°C durante 3 dias e recolheram-se os sobrenadantes. Três dias após transfecção, passou-se 0,3-0,4 ml de sobrenadantes de cultura para células Hep-2 frescas e incubaram-se com MEM contendo FBS a 2%. Após incubação durante seis dias, recolheu-se o sobrenadante e fixaram-se as células e coraram-se através do método indirecto com peroxidase de rábano, utilizando anticorpo de cabra anti-RSV (Biogenesis) seguido por anticorpo de coelho anti-cabra ligado a peroxidase de rábano. Detectaram-se então as células infectadas com vírus por adição de substrato cromogénico (DAKO) de acordo com as instruções do fabricante. Recuperou-se RSV recombinante que continha a deleção do gene M2-2 das células transfectadas. A identificação de rRSVΔM2-2 foi efectuada por RT/PCR utilizando iniciadores que flanqueiam a região eliminada. Tal como apresentado na figura 12A, detectou-se um fragmento de ADNc 234 nucleótidos mais curto do que RSV de tipo selvagem em células infectadas rRSVΔM2-2.

Não se detectou qualquer ADNc na reacção de RT/PCR que não continha transcriptase inversa na reacção de RT. Tal indicou que o produto de ADN foi derivado de ARN viral e não de contaminação. As propriedades da deleção de M2-2 de RSV estão actualmente a ser avaliadas.

10.3 GERAÇÃO DE AMBOS OS MUTANTES DE DELEÇÃO SH E M2-2

Eliminaram-se ambos os genes SH e M2-2 da construção de ADNc de RSV completo por subclonagem de ADNc. Clonou-se um fragmento de SacI a BamHI contendo a deleção M2-2 removida do subclone de ADNc pET (S/B) AM2-2RSV para o clone de ADNc pRSVΔSH. O plasmídeo de deleção de gene duplo pRSVΔSHΔM2-2 foi confirmado por mapeamento com enzima de restrição. Tal como apresentado na figura 12B, o mutante de dupla deleção SH/M2-2 é mais curto do que o ADNc de pRSV de tipo selvagem.

A recuperação de RSV infeccioso contento tanto a deleção SH, como M2-2 foi efectuada como descrito anteriormente. O vírus infeccioso com SH e M2-2 eliminados foi obtido de células Hep-2 transfectadas.

11. EXEMPLO: GERAÇÃO DE UM CANDIDATO DE VACINA DE VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (RSV) HUMANO POR DELEÇÃO DE GENE(S) VIRAL(S) ACESSÓRIO(S) QUER DE MODO SIMPLES, QUER EM COMBINAÇÃO

Fundamentos:

O vírus sincicial respiratório humano é a principal via de pneumonia e bronquiolite em crianças com menos de um ano de idade. RSV é responsável por mais do que uma em cinco hospitalizações pediátricas devidas a doença do tracto respiratório e causa 4 500 mortes anuais apenas nos EUA. Apesar de décadas de investigação para desenvolver uma vacina eficaz contra RSV, não se conseguiu uma vacina segura e eficaz para prevenir a morbilidade grave e mortalidade significativa associada a infecção por RSV. Foram utilizadas várias abordagens para desenvolver candidatos a vacina RSV: vírus inactivado com formalina, vacina de subunidades recombinantes de glicoproteínas de RSV expressas e vírus vivo atenuado. Recentemente, a geração de mutantes de RSV vivos

atenuados tem sido o foco para o desenvolvimento de vacina RSV. No passado, a geração de mutantes RSV vivos atenuados só pôde ser conseguida por passagem *in vitro* e/ou mutagénese química. O vírus foi sub-atenuado ou sobre-atenuado e não era estável geneticamente. A presente investigação proporciona uma abordagem imediata para gerar vacinas RSV atenuadas vivas geneticamente estáveis por deleção de gene(s) acessório(s) individualmente ou em combinação. As deleções de gene são consideradas uma estratégia muito potente para atenuar RSV dado que tais deleções não reverterão e espera-se assim que os mutantes de deleção de RSV recombinantes sejam muito estáveis geneticamente.

O RSV é único entre os paramixovírus na sua organização génica. Além dos genes N, P, L, M, G e F que são comuns a todos os paramixovírus, RSV contém quatro genes adicionais que codificam cinco proteínas: NS1, NS2, SH, M2-1 e M2-2. M2-1 e M2-2 são traduzidos de dois quadros de leitura abertos que se sobrepõe no meio do ARNm de M2. M2-1 melhora a capacidade de processamento de transcrição de ARNm e também funciona como uma factor anti-terminação por aumento da transcrição para além do sinal de terminação nas junções intergénicas (Collins, P. L. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 81-85 (1996); Hardy, R. W. *et al. J Virol.* 72,520-526 (1998)). Contudo, verificou-se que a proteína M2-2 inibe a transcrição e replicação de ARN de RSV *in vitro* (Collins, P. L. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 81-85 (1996)). Relatou-se que a proteína acessória NS 1 é um inibidor de transcrição potente (Atreya, P. L. *et al., J Virol.* 72, 1452-1461 (1998)). Demonstrou-se que o gene SH é dispensável por crescimento de RSV em cultura de tecidos num vírus de ocorrência natural e num RSV recombinante contendo uma deleção SH concebida racionalmente (Bukreyev, A. *et al., J Virol* 71 (12), 8973-82 (1997); Karron, R. A. *et al. J Infect. Dis.* 176, 1428-1436 (1997)). RSV isento de SH replica tão bem como RSV de tipo selvagem *in vitro*. Recentemente, relatou-se que o gene NS2 também pode ser eliminado (Teng, M. N., *et al J Virol* 73 (1), 466-73 (1999); Buchholz, U. J. *et al. J Virol* 73 (1), 251-9 (1999)). A deleção M2-1, M2-2 e NS 1 não foi relatada, nem foi relatada a deleção de mais do que dois genes não essenciais. Tradicionalmente, os vírus atenuados vivos mutantes foram gerados por passagem de RSV a baixa

temperatura muitas vezes e/ou sujeitos a mutagénese com reagentes químicos. As mutações são introduzidas aleatoriamente e o fenótipo do vírus é difícil de manter porque se podem desenvolver revertentes. A capacidade de produzir vírus a partir de um ADNc infeccioso possibilita a deleção de gene ou genes que estão associados com a patogénese do vírus. A deleção génica sozinha ou em combinação com mutações em outros genes virais (G, F, M, N, P e L) pode originar uma vacina RSV atenuada estável para proteger eficazmente contra infecção por RSV.

11.1 GERAÇÃO DE UM CANDIDATO A VACINA DE VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (RSV) HUMANO POR DELEÇÃO DO GENE M2-2 VIRAL

Este exemplo descreve a produção de um RSV recombinante no qual a expressão do gene M2-2 foi abolida por remoção de uma sequência de polinucleótido que codifica o gene M2-2 e a sua proteína codificada. O gene M2-2 de RSV é codificado pelo gene M2-2 e o seu quadro de leitura aberto encontra-se parcialmente sobreposto com o quadro de leitura aberto de M2-1 5'-proximal em 12 aminoácidos (Collins, P. L. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 81-85 (1996)). O polipéptido M2-2 previsto contém 90 aminoácidos, mas a proteína M2-2 não foi ainda identificada intracelularmente. A proteína M2-2 regula negativamente a transcrição e replicação de ARN de RSV num sistema modelo de minigenoma (Collins, P. L. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11563-11567 (1995)). O significado deste efeito negativo na transcrição e replicação de ARN de RSV no ciclo de replicação viral não é conhecido.

11.1.1 RECUPERAÇÃO DE RSV RECOMBINANTE ISENTO DO GENE M2-2

Para produzir um RSV recombinante que já não expressa a proteína M2-2, eliminou-se o gene M2-2 de um clone de ADNc de RSV parental (Jin, H. *et al. Virology* 251, 206-214 (1998)). O clone de ADNc antigenómico codifica um ARN antigenómico completo de estirpe A2 de RSV, que foi utilizado com sucesso para recuperar RSV recombinante. Este ADNc antigenómico contém uma única alteração de nucleótido na região de comando na posição 4 de C para G no seu sentido antigenómico. A construção de plasmídeo pA2ΔM2-2 envolveu um procedimento de clonagem em duas etapas. Introduziram-se dois locais de

enzima de restrição *HindIII* na sequência de RSV de 8196 nt a 8430 nt respectivamente num subclone de ADNc (pET-S/B) que continha o fragmento de ADNc de RSV *Sac I* (4477 nt) a *BamHI* (8504 nt) utilizando o kit de mutagénese Quickchange (Strategene). A digestão deste clone de ADNc com a enzima de restrição *HindIII* removeu o fragmento de ADNc de 234 nt *HindIII* que continha o gene M2-2. O restante fragmento *SacI* a *BamHI* que não continha o gene M2-2 foi então clonado para um ADNc antigenómico de RSV pRSVC4G. O plasmídeo resultante foi denominado pA2ΔM2-2.

Para recuperar RSV recombinante com o quadro de leitura aberto de M2-2 eliminado, transfectou-se pA2ΔM2-2, conjuntamente com plasmídeos codificando as proteínas N, P e L de RSV sob o controlo do promotor de T7, para células Hep-2 que tinham sido infectadas com um vírus *vaccinia* modificado que codifica a ARN-polimerase de T7 (MVA-T7). Após 5 horas de incubação das células Hep-2 transfectadas a 35°C, substituiu-se o meio com MEM contendo FBS a 2% e as células foram incubadas adicionalmente a 35°C durante 3 dias. Os sobrenadantes de cultura das células Hep-2 transfectadas foram utilizados para infectar as células Hep-2 ou Vero frescas para amplificar o vírus salvo. A recuperação de rA2ΔM2-2 foi indicada pela formação sincicial e confirmada por coloração positiva das células infectadas utilizando soro policlonal anti-A2 de RSV. O rA2ΔM2-2 recuperado foi purificado por placas três vezes e amplificado em células Vero. Para confirmar que rA2ΔM2-2 continha a deleção de gene M2-2, extraiu-se ARN viral de vírus e sujeitou-se a RT/PCR utilizando um par de iniciadores abrangendo o gene M2-2. Extraiu-se ARN viral de sobrenadantes de cultura de células infectadas com rA2ΔM2-2 e rA2 com um *kit* de extracção de ARN (ARN STAT-50, Tel-Test, Friendswood, Texas). O ARN viral foi sujeito a transcrição inversa com transcriptase inversa utilizando um iniciador complementar ao genoma viral de 7430 nt a 7449 nt. O fragmento de ADNc que abrange o gene M2-2 foi amplificado por PCR com iniciador V1948 (7486 nt a 7515 nt no sentido positivo) e iniciador V1581 (8544 nt a 8525 nt no sentido negativo). O produto de PCR foi analisado num gel de agarose a 1,2% e visualizado por coloração com EtBr. Tal como apresentado na figura 13B, com rA2 de tipo

selvagem obteve-se um produto de ADN de PCR correspondente ao fragmento de 1029 nt previsto, enquanto que com rA2ΔM2-2 se obteve um produto de PCR de 795 nt, 234 nt mais curto. A geração do produto de RT/PCR foi dependente da etapa de RT, indicando que foi derivado de ARN e não de contaminação de ADN.

11.1.2 SÍNTESE DE ARN DE rA2ΔM2-2

A expressão de ARN das células infectadas com rA2ΔM2-2 ou rA2 foi analisada por análises de hibridação de transferência de *Northern*. Extraiu-se ARN celular total de células infectadas com rA2ΔM2-2 ou rA2 com um kit de extracção de ARN (ARN STAT-60, Tel-Test, Friendswood, Texas). Sujeitou-se o ARN a electroforese num gel de agarose a 1,2% contendo formaldeído e transferiu-se para uma membrana de *nylon* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey). A membrana foi hibridada com uma ribossonda específica de gene de RSV marcada com digoxigenina (Dig). As bandas de ARN hibridado foram visualizadas com um kit de detecção luminescente de Dig para ácidos nucleicos (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana). A hibridação das membranas com as ribossondas foi efectuada a 65°C, a lavagem da membrana e a detecção de sinal foram efectuadas de acordo com os procedimentos padrão. Para examinar a síntese de ARNm de rA2ΔM2-2 e rA2, analisou-se a acumulação do ARNm de M2 e dos outros produtos de ARNm viral em células Vero infectadas por hibridação de transferência de *Northern*. A hibridação da transferência com uma sonda específica para o quadro de leitura aberto de M2-2 não detectou qualquer sinal em células infectadas com rA2ΔM2-2. Por sua vez, detectou-se um ARNm de M2 mais curto em células infectadas com rA2ΔM2-2 utilizando uma ribossonda específica para o gene M2-1 (figura 14A). Estas observações confirmaram que o gene M2-2 foi eliminado de rA2ΔM2-2. A acumulação dos outros nove produtos de transcrição de ARNm de RSV foi também examinada e verificou-se que as quantidades de cada ARNm eram comparáveis entre células infectadas com rA2ΔM2-2 e rA2. Apresentam-se também na figura 14A exemplos de transferências de *Northern* sondadas com N, SH, G e F. Foi também discernível uma

migração ligeiramente mais rápida de ARNm bicistrónico de F-M2 devido à deleção da região M2-2.

Foi previamente relatado que a proteína M2-2 é um regulador negativo de transcrição potente num ensaio de replicação de minigenoma. No entanto, a deleção do gene M2-2 do vírus não pareceu afectar a produção de ARNm viral em células infectadas. Para determinar se os níveis de antigenoma viral e de ARN genómico de rA2ΔM2-2 foram também semelhantes a rA2, examinou-se a quantidade de ARN genómico e antigenómico viral produzido em células Vero e Hep-2 infectadas por hibridação de *Northern*. A hibridação do ARN celular total infectado com uma ribossonda de gene F marcada com ^{32}P específica para o ARN sentido genómico negativo indicou que foi produzido muito menos ARN genómico em células infectadas com rA2ΔM2-2 comparativamente a rA2 (figura 14B). Hibridou-se uma membrana duplicada com a ribossonda específica de gene F marcada com ^{32}P com ARN sentido positivo. Detectou-se muito pouco ARN antigenómico em células infectadas com rA2ΔM2-2, embora a quantidade de ARNm de F em células infectadas com rA2ΔM2-2 fosse comparável a rA2. Assim, parece que a síntese do genoma e antigenoma de RSV foi regulada negativamente devido a deleção do gene M2-2. Esta regulação negativa foi verificada em células Vero e Hep-2 e assim não é dependente do tipo de célula.

11.1.3 SÍNTESE DE PROTEÍNA DE rA2ΔM2-2

Dado que a suposta proteína M2-2 não foi identificada previamente em células infectadas por RSV, foi necessário demonstrar que a proteína M2-2 é de facto codificada por RSV e produzida em células infectadas. Produziu-se um anti-soro policlonal contra a proteína de fusão M2-2 que foi expressa num sistema de expressão bacteriano. Para produzir anti-soro contra a proteína M2-2 de RSV, amplificou-se por PCR um fragmento de ADNc que codifica o quadro de leitura aberto de M2-2 de 8155 nt a 8430 nt e clonou-se para o vector pRSETA (Invitrogen, Carlsbad, California). Transformou-se pRSETA/M2-2 em células BL21-Gold (DE3) plysS (Strategene, La Jolla, California) e induziu-se a expressão da proteína M2-2 com cauda de His com IPTG. A proteína de fusão M2-2 foi

purificada através de colunas de afinidade HiTrap (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey) e foi utilizada para imunizar coelhos. Duas semanas após uma imunização de reforço, sangraram-se os coelhos e recolheu-se o soro.

As proteínas virais específicas produzidas por células infectadas foram analisadas por imunoprecipitação dos extractos de células infectadas ou por hibridação de *Western*. Para análise por imunoprecipitação, marcaram-se as células Vero infectadas com ^{35}S-promix (^{35}S-Cys e ^{35}S-Met a 100 µCi/ml, Amersham, Arlington Heights, Illinois) às 14 h a 18 h após infecção. Lisaram-se as monocamadas celulares marcadas com tampão RIPA e imunoprecipitaram-se os polipéptidos com soro policlonal anti-A2 de RSV (Biogenesis, Sandown, New Hampshire) ou soro anti-M2-2. A imunoprecipitação de lisados de células Vero infectadas por rA2 com anticorpo anti-M2-2 produziu uma banda de proteína de aproximadamente 10 kDa, que é o tamanho previsto para o polipéptido M2-2.

Este polipéptido não foi detectado em células infectadas por rA2ΔM2-2 (figura 15A), confirmando que M2-2 é um produto de proteína produzido por RSV e a sua expressão foi abolida de rA2ΔM2-2. O padrão de polipéptidos global de rA2ΔM2-2 foi indistinguível do de rA2. Contudo, verificou-se por imunoprecipitação que se produziram ligeiramente mais proteínas P e SH em células Vero infectadas por rA2ΔM2-2. No entanto, por análise por hibridação de *Western*, foi produzida uma quantidade comparável de SH em células infectadas com rA2ΔM2-2 ou rA2 (figura 15B).

Sujeitaram-se os polipéptidos imunoprecipitados a electroforese em géis de poliacrilamida a 17,5% contendo SDS a 0,1% e ureia 4 M e detectaram-se por autorradiografia. Para análise por hibridação de *Western*, infectaram-se células Hep-2 e Vero com rA2ΔM2-2 ou rA2. A vários tempos após infecção, lisaram-se as células infectadas por vírus em tampão de lise de proteína e sujeitaram-se os lisados celulares a electroforese em géis de poliacrilamida a 17,5% contendo SDS a 0,1% e ureia 4 M. As proteínas foram transferidas para uma membrana de *nylon*. A imunotransferência foi efectuada tal como descrito em Jin *et al.* (Jin, H. *et al.*

Embo J 16 (6), 1236-47 (1997)), utilizando anti-soro policlonal contra M2-1, NS1 ou SH.

Utilizou-se hibridação de *Western* para determinar a cinética de síntese de proteína de rA2ΔM2-2 em linhas celulares Vero e Hep-2. Infectaram-se células Hep-2 ou Vero com rA2ΔM2-2 ou rA2 a moi de 0,5 e, em vários intervalos após infecção, recolheram-se as células infectadas e separaram-se os polipéptidos num gel de poliacrilamida a 17,5% contendo ureia 4 M. Transferiram-se as proteínas para uma membrana de *nylon* e sondaram-se com anti-soros policlonais contra as três proteínas acessórias: M2-1, NS1 e SH. A cinética de expressão de proteínas para todas as três proteínas virais foi muito semelhante para rA2ΔM2-2 e rA2 em células Hep-2 e Vero (figura 15B). A síntese de proteína NS 1 foi detectada 10 h após infecção, que foi ligeiramente mais cedo do que M2-1 e SH porque a proteína NS1 é o primeiro gene traduzido e é um produto proteico muito abundante em células infectadas. Foi também verificada uma cinética de síntese de proteínas semelhante quando a membrana foi sondada com um anti-soro policlonal contra RSV (dados não apresentados). Foi detectada M2-1 comparável em células infectadas em rA2ΔM2-2, indicando que a deleção do quadro de leitura aberto de M2-2 não afectou o nível de proteína M2-1 que é traduzida pelo mesmo ARNm de M2.

11.1.4 ANÁLISE DE CRESCIMENTO DE RSV RECOMBINANTE EM CULTURA DE TECIDOS

Para comparar a morfologia de placas de rA2ΔM2-2 com rA2, infectaram-se células Hep-2 ou Vero com cada vírus e sobrepuseram-se em meio semi-sólido composto de metilcelulose a 1% e meio 1 X L15 com FBS a 2%. Cinco dias após a infecção, imunocoraram-se as células infectadas com anti-soros contra a estirpe A2 de RSV. Determinou-se o tamanho de placas por medição das placas em imagem microscópicas fotografadas. A formação de placas de rA2ΔM2-2 em células Hep-2 e Vero foi comparada com rA2. Tal como apresentado na figura 16, rA2ΔM2-2 formou placas com tamanho pontual em células Hep-2, com uma redução de cerca de 5 vezes no tamanho da placa de vírus verificada para rA2ΔM2-2 comparativamente a rA2. No

entanto, verificou-se apenas uma ligeira redução no tamanho da placa (30%) em células Vero infectadas com rA2ΔM2-2.

Efectuou-se um estudo da cinética de crescimento de rA2ΔM2-2 em comparação com rA2 em células Hep-2 e Vero. As células cultivadas em placas de 6 cm foram infectadas com rA2 ou rA2ΔM2-2 a uma moi de 0,5. Após 1 h de adsorção à temperatura ambiente, lavaram-se as células infectadas três vezes com PBS, substituiu-se com 4 ml de OPTI-MEM e incubou-se a 35°C num incubador contendo CO_2 a 5%. A vários intervalos de tempo após infecção, recolheu-se 200 µl de sobrenadante de cultura e armazenou-se a -70°C até titulação de vírus. Cada alíquota retirada foi substituída com uma quantidade igual de meio fresco. Determinou-se o título de vírus por ensaio de placas em células Vero em placas de 12 poços utilizando uma sobrecamada de metilcelulose a 1% e meio 1 X L15 contendo FBS a 2%. Tal como se pode verificar na figura 17, rA2ΔM2-2 apresentou uma cinética de crescimento muito lenta e o título máximo de rA2ΔM2-2 foi cerca de 2,5-3 unidades logarítmicas inferior ao de rA2 em células Hep-2. Em células Vero, rA2ΔM2-2 atingiu um título máximo semelhante a rA2. Para analisar a replicação de vírus em diferentes células hospedeiras, cada linha celular cultivada em placas de 6 poços foi infectada com rA2ΔM2-2 ou rA2 a moi de 0,2. Três dias após infecção, recolheram-se os sobrenadantes de cultura e quantificou-se o vírus por ensaio de placas. rA2ΔM2-2 foi examinado relativamente às suas propriedades de crescimento em várias linhas celulares derivadas de diferentes hospedeiros com diferentes tecidos de origem (Tabela 3). Verificou-se replicação significativamente reduzida de rA2ΔM2-2, duas ordens de grandeza inferior a rA2, em células Hep-2, MRC-5 e Hela infectadas, todas de origem humana. No entanto, a replicação de rA2ΔM2-2 foi somente ligeiramente reduzida em células MDBK e LLC-MK2 que são derivadas de células de rim bovino e de macaco *Rhesus*, respectivamente.

Tabela 3. Níveis de replicação de rA2 M2-2 e rA2 em várias linhas celulares

Linhas celulares	Hospedeiro	Tecido de origem	Título de vírus [log_{10} (pfu/ml)]	
			rA2	rA2ΔM2-2
Vero	Macaco	Rim	6,1	6,1
Hep-2	Humana	Laringe	6,2	4,3
MDBK	Bovina	Rim	6,1	5,5
MRC-5	Humana	Pulmão	5,5	3,0
Hela	Humana	Cérvix	6,6	4,5
LLC-MK2	Macaco	Rim	6,7	6,1

11.1.5 REPLICAÇÃO DE rA2ΔM2-2 EM RATINHOS E RATOS DO ALGODÃO

Determinou-se a replicação do vírus *in vivo* em ratinhos Balb/c (Simonsen Lab., Gilroy, California) de 12 semanas de idade e ratos do algodão *S. hispidus* (Virion Systems, Rockville, Maryland) isentos de patogénios respiratórios. Inocularam-se intranasalmente ratinhos ou ratos do algodão em grupos de 6 sob anestesia leve com metoxiflurano com 10^6 pfu por animal num inóculo de 0,1 ml de rA2 ou rA2ΔM2-2. No dia 4 após inoculação, sacrificaram-se os animais por asfixia com CO_2 e recolheram-se separadamente as suas conchas nasais e pulmões. Homogeneizaram-se os tecidos e determinaram-se títulos de vírus por ensaio de placas em células Vero. Para avaliar a imunogenicidade e eficácia protectora, inocularam-se intranasalmente três grupos de ratinhos com rA2, rA2ΔM2-2 ou meio apenas no dia 0. Três semanas mais tarde, anestesiaram-se os ratinhos, recolheram-se amostras de soro e administrou-se intranasalmente uma inoculação de provocação de 10^6 pfu de RSV estirpe A2 de tipo selvagem derivado biologicamente. Quatro dias após provocação, sacrificaram-se os animais e recolheram-se as conchas nasais e pulmões e determinou-se o título de vírus por ensaio de placas. Determinaram-se os anticorpos de soro contra RSV estirpe A2 por ensaio de redução de placas de 60% (Coates, H.V. *et al., AM J Epid.* 83: 299-313 (1965)) e por imunocoloração de células infectadas por RSV.

Tabela 4. Replicação de rA2ΔM2-2 e rA2 em ratos do algodão

Vírus	Título de vírus (média de log_{10} pfu/g tecido_EP)[a]	
	Conchas nasais	Pulmão
rA2	4,0_0,33	5,5_0,12
rA2ΔM2-2	<1,4	<1,4

[a] Imunizaram-se intranasalmente grupos de seis ratos do algodão com 10^6 pfu do vírus indicado no dia 0. Determinou-se o nível de replicação do vírus infectado no dia 4 por ensaio de placas nos espécimes indicados e determinou-se a média de log_{10} do título_erro padrão (EP) por grama de tecido.

Para avaliar os níveis de atenuação e imunogenicidade de rA2ΔM2-2, examinou-se a replicação de rA2ΔM2-2 no tracto respiratório superior e inferior de ratinhos e ratos do algodão. Inocularam-se ratos do algodão em grupos de 6 com 10^6 pfu de rA2ΔM2-2 ou rA2 intranasalmente. Sacrificaram-se os animais aos 4 dias após inoculação, recolheram-se as suas conchas nasais e tecidos de pulmão, homogeneizaram-se e determinaram-se os níveis de replicação de vírus nestes tecidos por ensaio de placas. rA2ΔM2-2 apresentou pelo menos uma redução de 2 unidades logarítmicas tanto nas conchas nasais como nos pulmões de ratos do algodão infectados (Tabela 4). Não se detectou qualquer replicação de vírus em ratos do algodão infectados com rA2ΔM2-2, enquanto se detectou um elevado nível de replicação de vírus rA2 de tipo selvagem tanto no tracto respiratório superior como inferior de ratos do algodão. Verificou-se também atenuação de rA2ΔM2-2 em ratinhos. Apresenta-se na tabela 5 a média geométrica do título de replicação de vírus e erro padrão obtido de duas experiências. A replicação de rA2ΔM2-2 só foi detectada em um ou dois dos 12 ratinhos infectados. A replicação foi limitada, verificaram-se apenas algumas placas a uma diluição de 10^{-1} dos homogeneizados de tecidos. Apesar da sua replicação limitada em ratinhos, rA2ΔM2-2 induziu resistência significativa a provocação com A2 de RSV de tipo selvagem (Tabela 5). Quando os ratinhos previamente inoculados com rA2ΔM2-2 ou rA2 foram inoculados intranasalmente com uma dose de 10^6 pfu de estirpe A2 de tipo selvagem, não se detectou qualquer replicação de vírus A2 de tipo selvagem no tracto respiratório superior e inferior de

ratinhos. Assim, rA2ΔM2-2 foi completamente protector contra provocação por vírus A2 de tipo selvagem.

A imunogenicidade de rA2ΔM2-2 foi também examinada. Infectaram-se dois grupos de ratinhos com rA2ΔM2-2 ou rA2 e, três semanas mais tarde, recolheram-se amostras de soro. O título de neutralização de soro foi determinado por título de redução de placas de 50%. O título de neutralização de ratinhos infectados com rA2ΔM2-2 foi comparável ao de rA2, ambos apresentaram um título de redução de placas de 60% a uma diluição de 1:16. O soro obtido de ratinhos infectados com rA2ΔM2-2 foi também capaz de imunocorar placas de RSV, confirmando que foram produzidos anticorpos específicos para RSV em ratinhos infectados por rA2ΔM2-2.

Tabela 5. Replicação de rA2ΔM2-2 e rA2 em ratinhos e protecção contra provocação por A2 de RSV de tipo selvagem

Vírus de imunização	Replicação de vírus[a] (média de log_{10} pfu/g de tecido_EP)		Replicação de RSV A2 após provocação[b] (média de log_{10} pfu/g de tecido_EP)	
	Conchas nasais	Pulmão	Conchas nasais	Pulmão
rA2	3,72_0,33	4,0_0,13	<1,4	<1,4
rA2ΔM2-2	<1,4	<1,4	<1,4	<1,4
Controlo	<1,4	<1,4	3,53_0,17	4,10_0,13

[a] Imunizaram-se intranasalmente grupos de 12 ratinhos Balb/c com 10^6 pfu do vírus indicado no dia 0. O nível de vírus infectado nos tecidos indicados foi determinado por ensaio de placas no dia 4 e determinou-se a média de log_{10} do título_erro padrão (EP) por grama de tecido.

[b] Administrou-se intranasalmente a grupos de 6 ratinhos Balb/c 10^6 pfu de RSV A2 no dia 21 e sacrificaram-se 4 dias mais tarde. A replicação de RSV A2 do tipo selvagem em tecidos tal como indicado foi determinada por ensaio de placas e determinou-se a média de log_{10} do título_erro padrão (EP) por grama de tecido.

Os dois subgrupos antigénicos de RSV, A e B, apresentam um grau de conservação relativamente elevado em proteínas M2-2, o que sugere a importância funcional da proteína M2-2. A análise de transcrição para rA2 e rA2ΔM2-2 proporcionou revelações importantes no presente exemplo. Embora os níveis de transcrição de ARNm globais tenham sido substancialmente iguais para ambos os vírus, a análise de hibridação de *Northern* revelou uma redução drástica do ARN de genoma e

antigenoma de vírus para rA2ΔM2-2 comparativamente a rA2 de tipo selvagem. Esta revelação é contraditória com o relatado para a regulação de transcrição negativa da proteína M2-2 num sistema de minigenoma. Assim, parece que o papel funcional de M2-2 no ciclo de vida do vírus é mais complicado do que se pensava anteriormente. No entanto, a redução do nível de genoma e antigenoma de rA2ΔM2-2 não pareceu afectar os rendimentos de vírus em células Vero infectadas.

A revelação que rA2ΔM2-2 apresenta uma replicação restrita na gama de hospedeiros em diferentes linhas celulares proporcionou uma boa indicação que a deleção de um gene não essencial é um bom meio de criar um mutante de gama de hospedeiros, que pode ser uma característica muito importante para estirpes de vacinas. rA2ΔM2-2 não replicou bem em várias linhas celulares derivadas de origem humana, com um rendimento de vírus inferior obtido para estas linhas celulares. No entanto, os níveis de síntese de proteína em células Hep-2 foram muito semelhantes aos de células Vero que produziram níveis elevados de rA2ΔM2-2. Tal indicou que o defeito na libertação de vírus foi provavelmente devido a um defeito num estágio posterior, provavelmente durante o processo de montagem do vírus.

A revelação que o vírus isento de M2-2 cresce bem em células Vero e apresenta atenuação nos tractos respiratórios superior e inferior de ratinhos e ratos do algodão apresenta novas vantagens para desenvolvimento de vacina. A replicação reduzida nos tractos respiratórios de roedores não afectou a imunogenicidade e protecção contra provocação com replicação de vírus de tipo selvagem, indicando que o vírus isento de M2-2 pode servir como um boa vacina para utilização humana. A natureza da mutação de deleção M2-2, envolvendo uma deleção 234 nt, representa um tipo de mutação que será altamente refractária a reversão.

11.5 GERAÇÃO DE UM CANDIDATO A VACINA DE VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (RSV) HUMANO POR DELEÇÃO DOS GENES M2-2 E SH VIRAIS

Este exemplo descreve a produção de um RSV recombinante no qual se aboliu a expressão de dois genes de RSV, M2-2 e

SH, por remoção das sequências de polinucleótido que codificam os genes M2-2 e SH e as suas proteínas codificadas. Tal como previamente descrito, o gene M2-2 ou SH é dispensável para replicação de RSV *in vitro*. É possível que a deleção de dois genes acessórios produza um RSV recombinante com um fenótipo de atenuação diferente. O grau de atenuação da deleção dos dois genes pode aumentar ou diminuir.

Os genes SH e M2-2 foram eliminados da construção de ADNc de RSV completa através de clonagem de ADNc. Removeu-se um fragmento *Sac I* a *BamHI*, que continha a deleção M2-2 no subclone pET (S/B) tal como descrito anteriormente, por digestão com enzimas de restrição *SacI* e *BamHI* e clonou-se para o clone de ADNc antigenómico de RSV completo que continha a deleção do gene SH (pA2ΔSH). O plasmídeo resultante que continha a deleção de SH e M2-2 foi denominado pA2ΔSHΔM2-2. A deleção de SH e M2-2 no plasmídeo pA2ΔSHΔM2-2 foi confirmada por mapeamento de enzimas de restrição.

A geração do mutante rA2ΔSHΔM2-2 foi efectuada tal como descrito atrás (consultar Secção 7). Recuperou-se RSV recombinante que continha uma deleção dos genes SH e M2-2 (rA2ΔSHΔM2-2) de células infectadas por MVA que tinham sido co-transfectadas com pA2ΔSHΔM2-2 conjuntamente com três plasmídeos que expressam as proteínas N, P e L, respectivamente. A recuperação do mutante de deleção de RSV infeccioso foi indicada por formação sincicial e confirmada por imunocoloração com um anticorpo contra RSV.

A deleção dos genes SH e M2-2 em rA2ΔSHΔM2-2 foi confirmada por RT/PCR utilizando dois conjuntos de iniciadores que flanqueiam o gene SH e o gene M2-2, respectivamente. A expressão de ARNm de células infectadas com rA2ΔSHΔM2-2 ou rA2 foi analisada por análises de hibridação de transferência de *Northern* tal como descrito previamente. Ambos os ARNm de SH e M2-2 não foram detectados em células infectadas com rA2ΔSHΔM2-2 utilizando uma sonda específica para o gene SH ou o gene M2-2. O facto dos dois genes de RSV (SH e M2-2) poderem ser eliminados de RSV indica que as proteínas SH e M2-2 são dispensáveis para replicação de RSV. Contrariamente a rA2ΔM2-2 que formou placas muito

pequenas em células Hep-2, rA2ΔSHΔM2-2 apresentava um tamanho de placa maior do que rA2ΔM2-2 (figura 19).

Efectuou-se um estudo de cinética de crescimento de rA2ΔSHΔM2-2 em comparação com rA2 em células Vero. Infectaram-se células cultivadas em placas de 6 cm com rA2 ou rA2ΔSHΔM2-2 a uma moi de 0,2. Tal como verificado na figura 22, rA2ΔSHΔM2-2 apresentou uma cinética de crescimento mais lenta e o seu máximo de título foi cerca de 1,5 unidades logarítmicas inferior ao de rA2. Tal indicou que rA2ΔSHΔM2-2 é atenuado em cultura de tecidos.

Para avaliar o nível de atenuação de rA2ΔSHΔM2-2, examinou-se a replicação de rA2ΔSHΔM2-2 nos tractos respiratórios inferiores de ratinhos. Inocularam-se grupos de 6 ratinhos com 10^6 pfu de rA2ΔSHΔM2-2 ou rA2 intranasalmente. Sacrificaram-se os animais 4 dias após inoculação, recolheram-se as suas conchas nasais e tecidos de pulmão, homogeneizaram-se e determinaram-se os níveis de replicação de vírus nesses tecidos por ensaio de placas. rA2ΔSHΔM2-2 apresentou uma redução de cerca de 2 unidades logarítmicas de replicação em pulmões dos ratinhos infectados (Tabela 11). Estes dados indicam que rA2ΔSHΔM2-2 é atenuado em ratinhos, embora o grau de atenuação não seja tão significativo como com rA2ΔM2-2.

Tabela 11. Replicação de rA2ΔSHΔM2-2 e rA2 em ratinhos

Vírus	Título de vírus no pulmão (média de $\log_{10}$ pfu/g de tecido_EP)[a]
rA2	4,2_0,08
rA2ΔSHΔM2-2	2,4_1,2

[a] Imunizaram-se intranasalmente grupos de seis ratinhos com 10^6 pfu do vírus indicado no dia 0. Determinou-se o nível de replicação de vírus no dia 4 por ensaio de placas nos espécimes indicados e determinaram-se a média de $\log_{10}$ do título_erro padrão (EP) por grama de tecido.

11.6 GERAÇÃO DE UM CANDIDATO A VACINA DE VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (RSV) HUMANO POR DELEÇÃO DOS GENES M2-2 E NS1 VIRAIS

Este exemplo descreve a produção de um RSV recombinante no qual se aboliu a expressão de dois genes de RSV diferentes, NS 1 e M2-2, por remoção das sequências de polinucleótido que codificam os genes NS 1 e M2-2 e as suas proteínas codificadas. Tal como descrito anteriormente, os genes NS 1 e M2-2 sozinhos são dispensáveis para replicação de RSV *in vitro*. Este exemplo proporciona um método de atenuação diferente por deleção de dois genes acessórios de RSV.

Eliminaram-se os genes NS 1 e M2-2 da construção de ADNc de RSV completa através de clonagem de ADNc. Removeu-se um fragmento *XmaI* a *AvrII* que continha a deleção NS1 no subclone pET (X/A) por digestão com enzimas de restrição *XmaI* e *AvrII* e clonou-se para o clone de ADNc antigenómico de RSV completo que continha a deleção do gene M2-2 (pA2ΔM2-2). O plasmídeo resultante que continha a deleção de ambos NS1 e M2-2 foi denominado pA2ΔNS1ΔM2-2. A deleção de NS1 e M2-2 no plasmídeo pA2ΔNS1ΔM2-2 foi confirmada por mapeamento com enzimas de restrição.

A geração do mutante rA2ΔNS1ΔM2-2 foi efectuada tal como descrito atrás (consultar secção 11.2). Recuperou-se RSV recombinante que continha a deleção dos genes NS 1 e M2-2 a partir de células infectadas com MVA que tinham sido co-transfectadas com pA2ΔNS1ΔM2-2 conjuntamente com três plasmídeos que expressam as proteínas N, P e L, respectivamente. A recuperação de RSV infeccioso foi indicada por formação sincicial e confirmada por imunocoloração com um anticorpo contra RSV. A identificação de rA2ΔNS1ΔM2-2 foi confirmada por RT/PCR utilizando um par de iniciadores que flanqueiam o gene NS 1 e o gene M2-2.

A replicação de rA2ΔNS1ΔM2-2 em linhas celulares em cultura de tecidos e em modelos de animais pequenos encontra-se em estudo. Dados preliminares *in vitro* indicam que rA2ΔNS1ΔM2-2 é muito atenuado em células de cultura de

tecidos e RSV recombinante contendo a deleção dos genes NS 1 e M2-2 é mais atenuado do que rA2ΔSHΔM2-2.

11.7 GERAÇÃO DE UM CANDIDATO A VACINA DE VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (RSV) HUMANO POR DELEÇÃO DOS GENES NS2 E M2-2 VIRAIS

Este exemplo descreve a produção de um RSV recombinante no qual se aboliu a expressão de dois genes de RSV diferentes, NS2 e M2-2, por remoção das sequências de polinucleótido que codificam os genes NS2 e M2-2 e as suas proteínas codificadas. Tal como descrito anteriormente, os genes NS2 ou M2-2 são dispensáveis para replicação de RSV *in vitro*. É possível que a deleção de dois genes acessórios de RSV produza um RSV recombinante com um fenótipo de atenuação diferente.

Eliminaram-se os genes NS2 e M2-2 da construção de ADNc de RSV completa através de clonagem de ADNc. Removeu-se um fragmento *XmaI* a *AvrII* que continha a deleção NS2 no subclone pET (X/A) por digestão com enzimas de restrição *XmaI* e *AvrII* e clonou-se para o clone de ADNc antigenómico de RSV completo que continha a deleção do gene M2-2 (pA2ΔM2-2). O plasmídeo resultante que continha a deleção de ambos NS2 e M2-2 foi denominado pA2ΔNS2ΔM2-2. A deleção de NS2 e M2-2 no plasmídeo pA2ΔNS2ΔM2-2 foi confirmada por mapeamento com enzimas de restrição.

A geração do mutante rA2ΔNS2ΔM2-2 foi efectuada tal como descrito atrás (consultar secção 7). Recuperou-se RSV recombinante que continha a deleção dos genes NS 1 e M2-2 (rA2ΔNS2ΔM2-2) a partir de células infectadas com MVA que tinham sido co-transfectadas com pA2ΔNS2ΔM2-2 conjuntamente com três plasmídeos que expressam as proteínas N, P e L, respectivamente. A recuperação de RSV infeccioso foi indicada por formação sincicial e confirmada por imunocoloração com um anticorpo contra RSV. A identificação de rA2ΔNS2ΔM2-2 recuperado foi confirmada por RT/PCR utilizando dois pares de iniciadores que flanqueiam o gene NS2 ou M2-2, respectivamente. A expressão de ARNm em células infectadas com rA2ΔNS2ΔM2-2 ou rA2 foi analisada por análises de

hibridação de transferências de *Northern*. Tal como apresentado na figura 23, não se detectou ARNm quer de NS2, quer de M2-2 em células infectadas com rA2ΔNS2ΔM2-2 utilizando uma sonda específica para o gene NS2 ou para o gene M2-2.

Verificaram-se níveis comparáveis de expressão de ARNm de NS 1 e SH em células infectadas com rA2ΔNS2ΔM2-2. Os dados de transferência de *Northern* confirmaram que a expressão de ambos NS2 e M2-2 foi abolida em rA2ΔNS2ΔM2-2.

Efectuou-se um estudo de cinética de crescimento de rA2ΔNS2ΔM2-2 em comparação com rA2 em células Vero. Infectaram-se células cultivadas em placas de 6 cm com rA2 ou rA2ΔNS2ΔM2-2 a uma moi de 0,2. Tal como apresentado na figura 24, rA2ΔNS2ΔM2-2 apresentou uma cinética de crescimento muito lenta e o seu título máximo foi cerca de 10 vezes menor do que o de rA2. Para analisar a replicação de vírus em células hospedeiras diferentes, cada linha celular cultivada em placas de 6 poços foi infectada com rA2ΔNS2ΔM2-2 ou rA2 a moi de 0,2. Três dias após infecção, recolheram-se os sobrenadantes de cultura e quantificou-se o vírus por ensaio de placas. rA2ΔNS2ΔM2-2 apresentou uma redução de cerca de algumas vezes no título de vírus comparativamente a rA2 em células Vero. No entanto, verificou-se uma redução de 2-3 unidades logarítmicas no título de vírus em células Hep-2, MDBK, Hela, MRC5 e LLC-MK2 (Tabela 12). Assim, a replicação de rA2ΔNS2ΔM2-2 apresenta um efeito de gama de hospedeiro substancial, que é uma indicação de atenuação.

Tabela 12. Comparação de crescimento de rA2ΔNS2/M2-2 e rA2 em diferentes linhas celulares

	Título de vírus [log_{10}(pfu/ml)	
Linhas celulares	rA2	rA2ΔNS2/M2-2
Vero	6,4	5,7
Hep-2	6,7	3,5
MDBK	6,7	3,7
MRC-5	5,9	2,0
Hela	6,5	2,9
LLC-MK2	6,7	4,8

Determinou-se a replicação de rA2ΔNS2/M2-2 *in vivo* em ratos do algodão de 4 semanas de idade isentos de patogénios respiratórios. Inocularam-se intranasalmente grupos de 5 ratos do algodão sob anestesia suave com metoxiflurano com 10^5 pfu por animal num inóculo de 0,1 ml de rA2 ou rA2ΔNS2ΔM2-2. No dia 4 após inoculação, sacrificaram-se os animais por asfixia com CO_2 e recolheram-se separadamente as suas conchas nasais e pulmões. Homogeneizaram-se os tecidos e determinaram-se títulos de vírus por ensaio de placas em células Vero. Tal como apresentado na Tabela 13, não se detectou qualquer replicação de vírus nos tractos respiratórios superiores e inferiores de ratos do algodão que foram infectados com rA2 ΔNS2ΔM2-2. Tal é indicativo que a deleção dos genes NS2 e M2-2 atenua fortemente RSV. Assim, este RSV recombinante com uma deleção NS2 e M2-2 pode servir como um bom candidato de vacina para utilização humana.

Tabela 13. Replicação de rA2ΔNS2/M2-2 e rA2 em ratos do algodão

Vírus	Título de vírus (média de log10 pfu/g de tecido_EP)	
	Conchas nasais	Pulmão
rA2	2,30_0,26	4,23_0,10
rA2ΔNS2/M2-2	<1,4	<1,4

[a] Imunizaram-se intranasalmente grupos de cinco ratos do algodão com 10^5 pfu do vírus indicado no dia 0. O nível de replicação de vírus infectado no dia 4 foi determinado por ensaio de placas nos espécimes indicados e determinaram-se a média do log_{10} de título_erro padrão (EP) por grama de tecido.

Em resumo, obtiveram-se 11 diferentes mutantes de deleção de gene (nem todos de acordo com o invento) tal como resumido na tabela 17. Eliminaram-se quatro genes acessórios de RSV quer individualmente, quer em combinação. Estes diferentes mutantes de deleção apresentaram diferentes propriedades de formação de placas e de crescimento. Foi demonstrada uma boa correlação entre tamanho de placa *in vitro* e atenuação *in vivo*. Estes diferentes mutantes de deleção de RSV proporcionam várias escolhas para utilização como candidatos de vacina RSV potenciais.

Tabela 17. Resumo dos mutantes de deleção de gene de RSV

Vírus	Recuperado
ΔM2-2	Sim
ΔSH	Sim
ΔNS1	Sim
ΔNS2	Sim
ΔM2-2ΔSH	Sim
ΔM2-2ΔNS1	ND[a]
ΔM2-2ΔNS2	Sim
ΔNS1ΔNS2	Sim
ΔSHΔNS1	Sim
ΔSHΔNS2	Sim
ΔSHΔNS1ΔNS2	Sim

[a] ND Não determinado. A replicação de rA2ΔM2-2ΔNS1 não foi detectada em cultura de tecidos.

13. EXEMPLO: VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (RSV) DO SUBGRUPO A QUIMÉRICO COM AS GLICOPROTEÍNAS DE SUBGRUPO B E RSV SEM O GENE M2-2 SÃO ATENUADOS EM MACACOS VERDES AFRICANOS

13.1 INTRODUÇÃO

Neste estudo avaliou-se rA2ΔM2-2 relativamente à sua atenuação, imunogenicidade e eficácia protectora contra provocação subsequente com RSV de tipo selvagem em macacos verdes africanos. A replicação de rA2ΔM2-2 foi mais de 1000 vezes restrita nos tractos respiratórios superior e inferior dos macacos infectados e induziu títulos de anticorpo neutralizante anti-RSV de soro que foram ligeiramente inferiores aos induzidos por rA2 de tipo selvagem. Quando se provocaram macacos infectados com rA2ΔM2-2- com vírus A2 de tipo selvagem, a replicação do vírus de provocação foi diminuída aproximadamente 100 vezes no tracto respiratório superior e 45 000 vezes no tracto respiratório inferior. Para atenuar adicionalmente rA-G_BF_B, removeu-se o quadro de leitura aberto de M2-2 de rA-G_BF_B. Tal como descrito para rA2ΔM2-2, rA-G_BF_BΔM2-2 apresentou crescimento restrito em

células Hep-2 e foi atenuado em ratos do algodão. rA2 e rA-G_BF_B contendo uma deleção do gene M2-2 podem representar uma composição de vacina de RSV bivalente para protecção contra estirpes múltiplas dos dois subgrupos de RSV.

Avaliaram-se macacos verdes africanos (AGM) como modelo primata não humano para avaliar a atenuação, imunogenicidade e eficácia protectora de candidatos de vacina RSV. Demonstramos que rA2 replicou em títulos elevados nos tractos respiratórios superiores e inferiores de AGM, enquanto que rA2ΔM2-2 e rA-G_BF_B replicaram fracamente nos tractos respiratórios de macacos. Tanto rA2ΔM2-2, como rA-G_BF_B induziram anticorpos neutralizantes que protegeram os animais de provocação experimental.

13.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Células e vírus

Mantiveram-se culturas em monocamadas de células HEp-2 e Vero (obtidas de American Type Culture Collections, ATCC) em meio mínimo essencial (MEM) contendo soro fetal bovino (FBS) a 5%. Obtiveram-se estirpes de RSV de tipo selvagem, A2 e B9320, de ATCC e cresceram-se em células Vero. Cresceram-se vírus *vaccinia* Ankara modificados (MVA-T7) que expressam ARN-polimerase de bacteriófago T7 em células CEK.

Construção de clone de ADNc quimérico

Cultivou-se RSV B9320 de tipo selvagem em células Vero e extraiu-se o ARN viral do sobrenadante de cultura de células infectadas. Obteve-se um fragmento de ADNc contendo os genes G e F de RSV B9320 por RT/PCR utilizando os seguintes iniciadores: ATCA*GGATCC*ACAATAACATTGGGGCAAATGCAACC e CTGGCATTC*GGATCC*GTTTTATGTAACTATGAGTTG (os locais BamHI concebidos para clonagem estão em itálico e as sequências específicas B9320 estão sublinhadas). Introduziram-se locais de enzima de restrição BamHI a montante da sequência de iniciação do gene de G e a jusante da sequência de terminação do gene de F. O produto de PCR foi primeiramente introduzido num vector de clonagem T/A (Invitrogen) e as sequências foram confirmadas por sequenciação de ADN. O fragmento de restrição

BamHI contendo a cassete de gene G e F de B9320 foi então transferido para o subclone de ADNc de RSV pRSV (R/H) que continha sequências de RSV desde nt 4326 a nt 9721 através dos locais BglII introduzidos em nt 4655 (a montante do sinal de início de gene de G) e em nt 7552 (a jusante do sinal de terminação do gene de F). A introdução destes dois locais BglII foi efectuada por mutagénese de PCR utilizando o kit de mutagénese QuickChange (Strategene, La Jolla, California). Os locais de enzimas de restrição BamHI e BglII têm extremidades compatíveis mas a ligação oblitera ambos os locais de restrição. O fragmento de restrição XhoI (nt 4477) a BamHI (nt 8498) contendo os genes G e F de B9320 foi então permutado para o clone de ADNc antigenómico de RSV infeccioso pRSVC4G (Jin et al., 1998). O ADNc antigenómico quimérico foi denominado pRSV-G_BF_B. Para eliminar o gene M2-2 de pRSV-G_BF_B, o fragmento MscI (nt 7692) a BamHI (nt 8498) de rA2ΔM2-2 que continha a deleção M2-2 (Jin et al., 2000a) foi introduzido em pRSV-G_BF_B. O clone de ADNc quimérico isento do gene M2-2 foi denominado pRSV-G_BF_BΔM2-2.

Recuperação de RSV recombinante

Descreve-se aqui a recuperação de RSV recombinante de ADNc. Sucintamente, infectaram células HEp-2 em placas de 6 poços a 80% de confluência com MVA a uma m.o.i. de 5 pfu/células durante 1 h e seguidamente transfectaram-se com plasmídeos antigenómicos completos (pRSV-G_BF_B ou pRSV-G_BF_BΔM2-2), conjuntamente com plasmídeos que expressam as proteínas de RSV N, P e L utilizando reagente LipofecTACE (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland). Após incubar as células transfectadas a 35°C durante três dias, passaram-se os sobrenadantes de cultura em células Vero durante seis dias para amplificar o vírus salvo. Os vírus recombinantes recuperados foram clonados biologicamente por três purificações de placa sucessivas e amplificados adicionalmente em células Vero. O vírus recuperado de células transfectadas com pRSV-G_BF_B foi denominado rA-G_BF_B e o de células transfectadas com pRSV-G_BF_BΔM2-2 foi denominado rA-G_BF_BΔM2-2. Determinou-se o título de vírus por ensaio de placas e visualizaram-se as placas por imunocoloração

utilizando soro policlonal anti-A2 de RSV (Biogenesis, Sandown, New Hampshire).

Caracterização de vírus

A expressão de ARN viral para cada RSV quimérico recuperado foi analisada por transferência de *Northern*. Extraiu-se o ARN celular total de células infectadas com vírus às 48 h após infecção. A transferência de ARN foi hibridada com uma sonda de oligonucleótido marcada com γ-^{32}P-ATP específica para o gene F de B9320 (GAGGTGAGGTACAATGCATTAATAGCAAGATGGAGGAAGA) ou uma sonda marcada com γ-^{32}P-ATP específica para o gene F de A2 (CAGAAGCAAAACAAAATGTGACTGCAGTGAGGATTGTGGT). Para detectar o ARNm de G dos vírus quiméricos, hibridaram-se transferências de ARN com uma ribossonda de 190 nt específica para o gene G de B9320 ou uma ribossonda de 130 nt específica para o gene G de A2. Ambas as ribossondas foram marcadas com α-^{32}P-CTP. A hibridação foi efectuada a 65°C em solução Express Hyb (Clontech, Palo Alto, California) durante a noite. Lavaram-se as membranas a 65°C em condições rigorosas e expuseram-se a película.

Analisaram-se proteínas específicas virais das células infectadas por imunoprecipitação dos extractos de células infectadas ou por transferência de *Western*. Para imunoprecipitar proteínas virais, infectaram-se células Vero com vírus a uma moi de 1,0 e marcaram-se com ^{35}S-promix (^{35}S-Cys e ^{35}S-Met a 100 µCi/ml, Amersham, Arlington Heights, Illinois) de 14 h a 18 h após infecção. Lisaram-se as monocamadas de células marcadas com tampão RIPA e imunoprecipitaram-se os polipéptidos com soro policlonal de cabra anti-A2 de RSV (Biogenesis, Sandown, New Hampshire) ou com um anticorpo policlonal contra a proteína M2-2.

Sujeitaram-se os polipéptidos imunoprecipitados a electroforese em SDS-PAGE e detectaram-se por autorradiografia. Para análise de transferência de *Western*, lisaram-se células Vero infectadas com vírus em tampão de lise de proteína e separaram-se as proteínas em SDS-PAGE a 12%. Transferiram-se as proteínas para uma membrana de *nylon* e efectuou-se imunotransferência tal como aqui descrito,

utilizando um anticorpo monoclonal contra a proteína G de B9320 ou um anticorpo monoclonal contra a proteína G de A2 (Storch e Park, 1987 J. Med. Virol. 22: 345-356).

Comparou-se o crescimento de RSV quimérico *in vitro* com o de A2 recombinante de tipo selvagem (rA2) e rA2ΔM2-2. Efectuou-se análise do ciclo de crescimento em células HEp-2 e Vero. Infectaram-se células cultivadas em placas de 6 cm com cada vírus a uma moi de 0,01 ou 0,1. Após 1 h de adsorção à temperatura ambiente, lavaram-se as monocamadas de células infectadas três vezes com PBS e incubaram-se a 35°C com 4 ml de Opti-MEM numa incubadora contendo CO_2 a 5%. A vários intervalos de tempo após infecção, recolheram-se 200 µl dos sobrenadantes de cultura e armazenaram-se a -70°C para titulação de vírus. Cada alíquota removida foi substituída com uma quantidade igual de meio fresco. O título de vírus foi determinado por ensaio de placas em células Vero em placas de 12 poços utilizando uma sobrecamada de metilcelulose a 1% e meio 1 X L15 contendo FBS a 2%.

Replicação de vírus em ratos do algodão

Determinou-se a replicação de vírus *in vivo* em ratos do algodão *S. hispidus* isentos de patogénios respiratórios. Inocularam-se intranasalmente grupos de 12 ratos do algodão sob anestesia ligeira com metoxiflurano com $10^{5,5}$ pfu de vírus por animal num inóculo de 0,1 ml. No dia 4 após inoculação, sacrificaram-se seis animais por asfixia com CO_2 e recolheram-se separadamente as suas conchas nasais e pulmões. Homogeneizaram-se os tecidos e determinaram-se títulos de vírus por ensaio de placas em células Vero. Três semanas mais tarde, anestesiaram-se os restantes 6 animais, recolheram-se as suas amostras de soro e administrou-se nasalmente um inóculo de provocação de 10^6 pfu de RSV de tipo selvagem derivado biologicamente de estirpe A2 ou B9320. Quatro dias após provocação, sacrificaram-se os animais e recolheram-se as conchas nasais e pulmões, homogeneizaram-se e determinou-se o título de vírus por ensaio de placas. Determinaram-se os anticorpos neutralizantes do soro contra RSV de estirpe A2 ou B9320 por ensaio de redução de placas de 50% (Coates et al., 1966, Am. J. Epidemiol. 83 (2): 299-313).

Replicação de vírus em AGM

Avaliou-se RSV recombinante relativamente à sua replicação, imunogenicidade e eficácia protectora em AGM (*Cercopithecus aethiops*). Utilizaram-se AGM, obtidos de St. Kitts com uma idade média de 4,2 anos e peso corporal na gama de 2,2 a 4,3 kg, no primeiro estudo (estudo A) para comparar a replicação de rA2 com A2 de tipo selvagem. O segundo estudo (estudo B) utilizou AGM com idades na gama de 5,3 a 8,4 anos e um peso corporal médio de 4,15 kg. Nenhum dos macacos apresentava anticorpos neutralizantes de soro detectáveis para RSV B9320 ou A2 (título < 1:10). Inocularam-se grupos de 4 macacos com A2 de tipo selvagem, rA2, rA2ΔM2-2, B9320 de tipo selvagem ou rA-G_BF_B tanto por via intranasal como intratraqueal com uma dose de $10^{5,5}$ pfu num inóculo de 1,0 ml em cada local. Após inoculação, recolheram-se diariamente amostras nasofaríngicas (NP) com cotonete para cada macaco durante 12 dias sob anestesia com Telazol e recolheu-se lavagem traqueal (BAL) nos dias 3, 5, 7 e 10 após infecção (Kakuk et al., 1993, J. Infect. Dis. 167 (3): 553-561). No dia 28 após infecção, recolheram-se amostras de soro de cada macaco infectado e provocaram-se os macacos com A2 ou B9320 de tipo selvagem tanto nos locais intranasal, como intratraqueal com uma dose de $10^{5,5}$ pfu num inóculo de 1,0 ml. A replicação do vírus de provocação nos tractos respiratórios superiores e inferiores de macacos foi examinada por quantificação de vírus libertado em espécimes de NP e de lavagens traqueais. Recolheram-se amostras de NP diariamente durante 10 dias e recolheram-se amostras BAL nos dias 3, 5, 7 e 10 após provocação. Catorze dias após provocação com vírus de tipo selvagem, recolheram-se amostras de soro para medição de anticorpo neutralizante de RSV por ensaio de redução de placas de 50% utilizando vírus A2 ou B9320 de tipo selvagem. O vírus libertado nas amostras de NP e BAL foi quantificado por ensaio de placas utilizando células Vero.

13.3 RESULTADOS

Construção de ADNc e recuperação de vírus RSV A/B quimérico

Previamente, construímos um ADNc antigenómico infeccioso que codifica RSV de estirpe A2 de tipo selvagem e seus

derivados contendo uma deleção do gene M2-2. Aqui, estes ADNc foram modificados por substituição dos genes G e F da estirpe A2 com os de B9320 para produzir vírus quiméricos que expressam antigénios de RSV de subgrupo B. As sequências de iniciação de gene e de terminação de gene são muito conservadas entre os dois subgrupos de RSV. Assim, os genes G e F completos de B9320 que incluem os seus próprios sinais de iniciação de gene e de terminação de gene foram transferidos para o esqueleto de ADNc de A2 (figura 26). O ADNc que codifica os genes G e F de B9320 foi obtido por RT/PCR e confirmado por análise de sequência. O ADNc quimérico construído foi denominado pRSVA-G_BF_B. Construiu-se pRSVA-G_BF_BΔ M2-2 por deleção do gene M2-2 de pRSVA-G_BF_B. O gene M2 contendo a deleção do quadro de leitura aberto de M2-2 de rA2Δ M2-2 foi introduzido em pRSVA-G_BF_B através de locais de enzimas de restrição únicos MscI e BamHI. Ambos os vírus quiméricos (rA-G_BF_B e rA-G_BF_BΔ M2-2) foram recuperados de ADNc utilizando o sistema de salvamento previamente descrito. Os vírus recombinantes recuperados foram purificados por placas e amplificados em células Vero.

Caracterização dos vírus recombinantes quiméricos *in vitro*

Analisou-se a expressão do subgrupo de proteínas específicas de subgrupo pelo vírus quimérico por hibridação de *Northern* e de *Western*. Utilizando sondas específicas de estirpe, detectaram-se ARNm de G e F específicos de B9320 em células infectadas com rA-G_BF_B e rA-G_BF_BΔ M2-2 (figura 27A). O gene M2-2 não foi detectado em células infectadas com rA-G_BF_BΔ M2-2, confirmando que o gene M2-2 foi eliminado deste vírus quimérico. A expressão de proteínas específicas da estirpe B9320 dos dois vírus quiméricos foi também comparada com a de rA2, rA2Δ M2-2 e B9320 de tipo selvagem (figura 27B). A proteína F1 de rA-G_BF_B e rA-G_BF_BΔ M2-2 apresentou a mesma taxa de mobilidade de migração que a de B9320, migrando ambas mais rapidamente do que a de A2. A análise de transferência de *Western* utilizando anticorpos monoclonais específicos de estirpe confirmou que a proteína G de subgrupo B foi expressa por rA-G_BF_B e rA-G_BF_BΔ M2-2 (figura 27B). A transferência de *Western* utilizando um anticorpo policlonal específico para a

proteína M2-2 confirmou adicionalmente a abolição do gene M2-2 em rA2ΔM2-2 e rA-G_BF_BΔM2-2.

Comparou-se a replicação dos vírus quiméricos, rA-G_BF_B e rA-G_BF_BΔM2-2, com rA2 e rA2ΔM2-2 em células HEp-2 e Vero (figura 28). Em células Vero, infectadas a uma moi de 0,1, tanto rA-G_BF_B como rA-G_BF_BΔM2-2 atingiram títulos máximos semelhantes aos verificados com rA2 de tipo selvagem e rA2ΔM2-2, respectivamente. A uma moi inferior de 0,01, o título máximo de rA-G_BF_B foi ligeiramente reduzido relativamente a rA2; o nível de replicação de rA-G_BF_BΔM2-2 foi diminuído cerca de 10 vezes comparativamente a rA-G_BF_B. Em células HEp-2, a uma moi de 0,1, rA-G_BF_B apresentou um título máximo ligeiramente inferior comparativamente a A2 de tipo selvagem, enquanto que a replicação de rA-G_BF_BΔM2-2 foi diminuída cerca de 100 vezes. A uma moi de 0,01, o título máximo de rA-G_BF_B foi diminuído cerca de 10 vezes comparativamente a rA2 e o título máximo de rA-G_BF_BΔM2-2 foi diminuído cerca de 100 vezes. Assim, tal como verificado para rA2ΔM2-2, rA-G_BF_BΔM2-2 também apresentou replicação restrita em células HEp-2, enquanto que a sua replicação em células Vero foi menos prejudicada.

Replicação de RSV quimérico em ratos do algodão

Os ratos do algodão são susceptíveis a infecção por RSV tanto de subgrupo A como B. Os níveis de replicação de rA-G_BF_B e rA-G_BF_BΔM2-2 nas conchas nasais e pulmões de ratos do algodão foram comparados com rA2, rA2ΔM2-2 e B9320 de tipo selvagem (Tabela 21). A replicação de rA-G_BF_B foi inferior ao limite de detecção por ensaio de placas nas conchas nasais, a sua replicação em tecido de pulmão foi reduzida em cerca de 3,6 $\log_{10}$ comparativamente a B9320 de tipo selvagem e cerca de 2,0 $\log_{10}$ relativamente a rA2. A replicação de rA2ΔM2-2 não foi detectada em conchas nasais e foi 1,6 log mais baixa do que no pulmão comparativamente a rA2. A remoção de M2-2 de rA-G_BF_B atenuou adicionalmente o vírus quimérico. Não se detectou qualquer replicação de vírus quer nas conchas nasais, quer nos pulmões de ratos do algodão infectados com rA-G_BF_BΔM2-2.

Embora rA-G_BF_B e rA-$G_BF_B\Delta$M2-2 sejam atenuados em ratos do algodão, ambos os vírus quiméricos induziram imunidade contra RSV suficiente para proteger os animais contra provocação (Tabela 21). O nível de anticorpo neutralizante anti-RSV de soro induzido por rA-G_BF_B foi 2,85 vezes menor.

O nível de replicação de rA-G_BF_B quimérico foi comparado com o de B9320 de tipo selvagem. Inocularam-se AGM seronegativos a RSV com 5,5 $\log_{10}$ pfu de rA-G_BF_B ou B9320 por instilação intranasal e intratraqueal. Recolheram-se amostras da garganta com cotonete e de lavagens traqueais ao longo de 12 dias para quantificação de vírus. B9320 replicou a um nível semelhante ao do vírus A2 de tipo selvagem (Tabela 22). O título máximo de rA-G_BF_B nos tractos respiratórios de macacos infectados foi cerca de 1000 vezes menor relativamente ao de B9320. Os animais infectados por rA-G_BF_B libertaram vírus durante um período de tempo menor do que os infectados por B9320. Apesar da sua replicação significativamente atenuada, rA-G_BF_B proporcionou protecção completa quando provocados com B9320 de tipo selvagem. Não se detectou qualquer vírus de provocação nos tractos respiratórios superiores e inferiores dos macacos previamente imunizados com rA-G_BF_B (Tabela 23). Consistentemente com o nível de protecção verificado em macacos imunizados com rA-G_BF_B, o nível de anticorpo neutralizante anti-RSV de soro destes macacos foi só ligeiramente reduzido (cerca de 2 vezes) comparativamente ao verificado para animais infectados por B9320 de tipo selvagem. O nível de anticorpo neutralizante anti-RSV de soro induzido por rA-G_BF_B foi aumentado por subsequentes infecções por RSV de tipo selvagem.

13.4 DISCUSSÃO

Para acelerar o desenvolvimento de vacina para RSV de subgrupo B, utilizou-se um vírus A2 recombinante como um vector para expressar antigénios de superfície de RSV de subgrupo B. O vírus quimérico deve desencadear uma resposta imunitária equilibrada e proporcionar protecção contra infecção por RSV de subgrupo B. Como uma abordagem para expressar antigénios de RSV de subgrupo B, construímos um

vírus quimérico diferente no qual os genes G e F da estirpe A2 foram completamente substituídos pelos genes G e F da estirpe B9320. O RSV quimérico foi então atenuado adicionalmente utilizando uma estratégia desenvolvida para atenuar o vírus A2.

O RSV quimérico (rA-G_BF_B) recuperado replicou eficazmente em células Vero, mas o seu crescimento em células HEp-2 foi diminuído 5 a 10 vezes relativamente a rA2. rA-G_BF_B foi atenuado nos tractos respiratórios superiores e inferiores de ratos do algodão. Para determinar se a atenuação de rA-G_BF_B foi específica de hospedeiro, avaliou-se adicionalmente este vírus quimérico em AGM que estão mais estreitamente relacionados geneticamente com humanos do que os roedores. A infecção por RSV em AGM está menos bem caracterizada e há uma elevada gama de títulos máximos relatados (Crowe et al., 1996, J. Infect. Dis. 173: 829-839); (Kakuk et al., 1993, J. Infect. Dis. 167: 553-561). Assim, a infecção por RSV foi primeiramente ensaiada em AGM utilizando vírus de tipo selvagem. Demonstrou-se que RSV de subgrupo A e subgrupo B replicam igualmente bem em AGM e os títulos de vírus recuperados dos tractos respiratórios superiores e inferiores de relativamente ao induzido por B9320 de tipo selvagem. O anticorpo neutralizante anti-RSV de soro induzido por rA-G_BF_BΔM2-2 foi aproximadamente 4 vezes inferior comparativamente ao induzido por B9320 e 1,5 vezes inferior ao de rA-G_BF_B. Comparativamente, o nível de anticorpo neutralizante anti-RSV de soro induzido por rA2ΔM2-2 foi igualmente reduzido aproximadamente 2 vezes comparativamente ao de rA2.

Replicação de RSV de tipo selvagem e de rA2ΔM2-2 em AGM

De modo a investigar a atenuação e imunogenicidade de RSV em primatas, a replicação de RSV recombinante foi estudada adicionalmente em AGM. O estudo A examinou a replicação de vírus A2 recombinante e A2 de tipo selvagem nos tractos respiratórios de AGM. Infectaram-se AGM seronegativos a RSV com 5,5 $\log_{10}$ pfu de rA2 ou A2 de tipo selvagem por via intranasal e intratraqueal e monitorou-se a libertação de vírus ao longo de um período de 12 dias nos tractos respiratórios superiores e inferiores. Tal como apresentado

na tabela 22, rA2 replicou bem em ambos os tractos respiratórios superior e inferior de AGM. rA2 atingiu um título máximo de 4,18 e 4,28 log_{10} pfu/ml em cada local respectivamente e libertou vírus ao longo do mesmo intervalo de tempo do que o vírus A2 de tipo selvagem (Tabela 22, estudo A), embora o título máximo de rA2 nos tractos respiratórios de AGM tenha sido ligeiramente inferior ao obtido para vírus A2 de tipo selvagem. Tendo confirmado o elevado nível de replicação de rA2 em AGM, avaliou-se rA2ΔM2-2 relativamente à sua atenuação, imunogenicidade e eficácia protectora em AGM. Num estudo separado (estudo B, tabela 22), rA2ΔM2-2 apresentou um nível de replicação altamente diminuído tanto na nasofaringe como na traqueia comparativamente a rA2. O seu título máximo na nasofaringe apresentava uma redução de 3,1 log_{10} enquanto que o título máximo na traqueia foi diminuído 3,25 log_{10}. Apesar do muito menor nível de replicação nos tractos respiratórios, rA2ΔM2-2 induziu um nível significativo de anticorpo neutralizante anti-RSV de soro. O título de anticorpo induzido por rA2ΔM2-2 foi cerca de 4 vezes inferior ao induzido por rA2, às três semanas após infecção (Tabela 23). Quando provocado com vírus A2 de tipo selvagem, rA2ΔM2-2 proporcionou protecção parcial contra replicação de RSV de tipo selvagem no tracto respiratório superior e protecção virtualmente completa de macacos imunizados. Os macacos inoculados com rA2 ficaram completamente protegidos nos tractos respiratórios superiores e inferiores (Tabela 23). Embora rA2ΔM2-2 não tenha proporcionado protecção completa nos tractos respiratórios de macacos imunizados, reduziu a libertação de vírus em 5 dias. Duas semanas após provocação, o nível de anticorpo neutralizante anti-RSV de soro de macacos infectados por rA2ΔM2-2 era semelhante ao induzido por rA2.

Replicação de rA-G_BF_B quimérico e B9320 de tipo selvagem em AGM

AGM foram comparáveis aos verificados em chimpanzés infectados (Crow et al., 1994, Vaccine 12:783-790). Quando se avaliou rA-G_BF_B em AGM, este apresentou uma redução de título máximo de 3,0 log_{10} no tracto respiratório superior e uma redução de 2,59 log_{10} no tracto respiratório inferior.

O nível de atenuação de rA-G_BF_B em AGM foi consistente com os níveis verificados em ratos do algodão. No entanto, este resultado foi algo diferente do relatado para um RSV quimérico recentemente descrito, no qual os genes G e F de A2 foram substituídos pelos de RSV de estirpe B1 (rAB1, Whitehead et al., 1999, J. Virol. 73: 9773-80). Embora rAB1 e rA-G_BF_B sejam atenuados de modo semelhante em ratos do algodão, rAB 1 não foi atenuado em chimpanzés. Contrariamente a rA-G_BF_B, rAB1 replicou melhor do que RSV B1 de tipo selvagem nos tractos respiratórios superior e inferior de chimpanzés (Whitehead et al., 1999, J. Virol. 73: 9773-80). Parte desta discrepância pode ser explicada pela semi-permissividade de chimpanzés a infecção por RSV de subtipo B de tipo selvagem. No entanto, existe a possibilidade de rA-G_BF_B ser mais atenuado do que rAB1 devido a diferenças nos antigénios de superfície da estirpe de subgrupo B ou a efeitos de constelação quando estes antigénios são introduzidos no antecedente de A2. Assim, parece que a quimerização de proteínas heterólogas diferentes estreitamente relacionadas pode resultar em diferentes fenótipos. Foi relatada a quimerização de antigénios de superfície resultando num vírus atenuado para vários paramixovírus. Um vírus de sarampo quimérico com as proteínas HN e F substituídas pela proteína G de VSV apresentou uma replicação *in vitro* altamente diminuída (Spielhofer et al., 1998, J. Virol. 72: 2150-2159). Um vírus da peste bovina quimérico no qual as proteínas F e H foram substituídas pelas proteínas de superfície heterólogas de um vírus da peste dos pequenos ruminantes altamente relacionado foi atenuado *in vitro*, tal como indicado por crescimento lento do vírus e baixo rendimento de vírus (Das et al., 2000, J. Virol. 74: 9039-9047). Mais recentemente, foi relatado que o vírus quimérico PIV3-PIV2, no qual os genes de F e HN de PIV3 foram substituídos pelos de PIV2 não foi atenuado *in vitro*, mas foi drasticamente atenuado em *hamsters*, AGM e chimpanzés (Tao et al., 2000, J. Virol 74: 6448-6458). Por outro lado, o PIV3-PIV1 quimérico não foi atenuado *in vivo* (Tao et al., 1998, J. Virol. 72: 2955-2961; Tao et al., 1999, Vaccine 17: 1100-1108). Embora atenuado em AGM, rA-G_BF_B induziu níveis significativos de anticorpo neutralizante

anti-RSV e proporcionou protecção completa contra provocação subsequente com RSV de subgrupo B de tipo selvagem.

Neste estudo, avaliou-se rA2ΔM2-2 relativamente à sua atenuação, imunogenicidade e protecção contra provocação por RSV de tipo selvagem em AGM. Demonstrou-se que rA2ΔM2-2 é atenuado nos tractos respiratórios de AGM e após provocação, verificou-se replicação muito reduzida de RSV de tipo selvagem em animais previamente infectados com rA2ΔM2-2. O nível de replicação e protecção verificado para rA2ΔM2-2 em AGM é muito semelhante ao relatado num estudo com chimpanzés para um RSV recombinante semelhante com a expressão da proteína M2-2 silenciada (Bermingham e Collins, 1999, pNAS USA 96: 11259-11264; Teng et al., 2000, J. Virol. 74: 9317-9321). rA2ΔM2-2 pode provar ser mais atenuado em humanos do que um candidato de vacina previamente ensaiado cpts248/404 (Teng et al., 2000, J. Virol. 74: 9317- 9321). cpts248/404 não foi suficientemente atenuado nem geneticamente estável em crianças *naive* (Crowe et al., 1994, Vaccine 12: 783-790; Wright et al., 2000, J. Infect. Dis. 182: 1331-1342). O título de anticorpo neutralizante anti-RSV de soro induzido por rA2ΔM2-2 foi ligeiramente inferior ao induzido por infecção com RSV de tipo selvagem. No entanto, o aumento do título de anticorpo neutralizante após provocação sugere que a imunogenicidade de rA2ΔM2-2 pode ser melhorada por administrações repetidas.

Dado que rA2ΔM2-2 apresenta muitas das características pretendidas numa vacina viva atenuada, a deleção do gene M2-2 foi considerada como um meio adequado para atenuar adicionalmente o rA-G_BF_B quimérico. O estudo *in vitro* indicou que rA-G_BF_BΔM2-2 apresenta um nível de atenuação semelhante a rA2ΔM2-2, apresentando formação sincicial aumentada, crescimento reduzido em células HEp-2 e desequilíbrio na transcrição para replicação de ARN. Dado que o vírus rA-G_BF_B quimérico já é atenuado em ratos do algodão e AGM, espera-se que rA-G_BF_BΔM2-2 seja mais atenuado do que rA2ΔM2-2. Contudo, estudos com ratos do algodão indicaram que rA-G_BF_BΔM2-2 ainda era capaz de induzir um nível de anticorpos neutralizantes de RSV de soro aproximando-se do induzido por rA-G_BF_B e

proporcionou protecção completa contra provocação experimental subsequente. Assim, rA-G_BF_BΔM2-2 pode representar um candidato de vacina adequado para protecção contra infecção por RSV de subgrupo B.

O presente invento não deve ser limitado no seu âmbito pelas concretizações específicas descritas, que pretendem constituir ilustrações únicas de aspectos individuais do invento, e quaisquer construções, vírus ou enzimas que são funcionalmente equivalentes encontram-se abrangidas pelo âmbito deste invento. De facto, serão evidentes para os peritos na arte várias modificações do invento além das aqui apresentadas e descritas a partir da descrição anterior e figuras que as acompanham. Pretende-se que tais modificações se encontrem no âmbito das reivindicações em anexo.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Aviron, Inc.

<120> “Sistemas de expressão de vírus RSV recombinante e vacinas”

<130> PC/P12940EP

<140> EP01986054
<141> 2001-11-28

<150> PCT/US01/44819
<151> 2001-11-28

<150> 09/724,416
<151> 2000-11-28

<160> 66

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
<211> 46
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 1
cgacgcatat tacgcgaaaa aatgcgtaca acaaacttgc ataaac 46

<210> 2
<211> 50
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 2
caaaaaaatg gggcaaataa gaatttgata agtaccactt aaatttaact 50

<210> 3
<211> 24
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 3
ctagagttaa atttaagtgg tact 24

<210> 4
<211> 50
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 4
tatcaaattc ttatttgccc catttttttg gtttatgcaa gtttgttgta 50

<210> 5
<211> 30
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 5
cgcatttttt cgcgtaatat gcgtcggtac 30

<210> 6
<211> 50
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 6
gtattcaatt atagttatta aaaattaaaa atcatataat tttttaaata 50

<210> 7
<211> 50
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 7
acttttagtg aactaatcct aaagttatca ttttaatctt ggaggaataa 50

<210> 8
<211> 50
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 8
atttaaaccc taatctaatt ggtttatatg tgtattaact aaattacgag 50

<210> 9
<211> 46
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 9
atattagttt ttgacacttt ttttctcgtt atagtgagtc gtatta **46**

<210> 10
<211> 25
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 10
agcttaatac gactcactat aacga **25**

<210> 11
<211> 50
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 11
gaaaaaaagt gtcaaaaact aatatctcgt aatttagtta atacacatat **50**

<210> 12
<211> 50
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 12
aaaccaatta gattagggtt taaatttatt cctccaagat taaaatgata **50**

<210> 13
<211> 50
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 13
actttaggat tagttcacta aaagttattt aaaaaattat atgattttta **50**

<210> 14
<211> 29
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 14
atttttaata actataattg aatactgca 29

<210> 15
<211> 40
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 15
ggtggccggc atggtcccag cgctggggac catgccggcc 40

<210> 16
<211> 48
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 16
ctcgctggcg ccggctgggc aacagtgtgc ccagccggcg ccagcgag 48

<210> 17
<211> 48
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 17
ttccgagggg accgtcccct cggtaccgag gggacggtcc cctcggaa 48

<210> 18
<211> 48
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 18
aatggcgaat gggacgtcga cagcgctgtc gacgtcccat tcgccatt 48

<210> 19
<211> 42
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 19
taacaaagcc cgaaggaagc tagcttcctt cgggctttgt ta 42

<210> 20
<211> 42
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 20
gagttgctgc tgccaccgtt gcaacggagg cagcagcaac tc 42

<210> 21
<211> 46
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 21
agcaataact agataacctt gggcccaagg ttatctagtt attgct 46

<210> 22
<211> 48
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 22
cctctaaacg ggtcttgagg gtctagaccc tcaagacccg tttagagg 48

<210> 23
<211> 42
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 23
ttttgctgaa aggaggaact atagttcctc ctttcagcaa aa 42

<210> 24
<211> 42
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 24
tatgcggccg cgtcgacggt ataccgtcga cgcggccgca ta 42

<210> 25
<211> 36
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: oligonucleótido

<400> 25
ccgggcccgc cttcgaagct tcgaaggcgg gcccgg 36

<210> 26
<211> 21
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 26
caccacctac cttactcaag t 21

<210> 27
<211> 24
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 27
tttgtttgtg ggtttgatgg ttgg 24

<210> 28
<211> 35
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 28
gatatcaaga tctacaataa cattggggca aatgc 35

<210> 29
<211> 31
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 29
gctaagagat ctttttgaat aactaagcat g 31

<210> 30
<211> 46
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 30
tcttgactgt tgtggattgc agggttgact tgactccgat cgatcc 46

<210> 31
<211> 49
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 31
cttgtgttgt tgttgtatgg tgtgtttctg attttgtatt gatcgatcc 49

<210> 32
<211> 33
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 32
tcacgaagga atcctggcaa atttgaaatt cga 33

<210> 33
<211> 33
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 33
gaaattcgag gtcatggttt aaatggtaag agg 33

<210> 34
<211> 36
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 34
tgcttaaatg gtaagagggg acattttagt cataat 36

<210> 35
<211> 33
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 35
actaaacaat cagcaggtgt tgccatgagc aaa 33

<210> 36
<211> 52
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 36
gagctaaatt cacccaagat aagcttgtaa taaactgtca tatcatatat tg 52

<210> 37
<211> 42
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 37
caaactatcc atctgtaata aagcttgcca gcagacgtat tg 42

<210> 38
<211> 50
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 38
ccatcaacaa cccaaaataa taaagcttta gtgatacaaa tgaccatgcc 50

<210> 39
<211> 36
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 39
atcaggatcc acaataacat tggggcaaat gcaacc 36

<210> 40
<211> 36
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 40
ctggcattcg gatccgtttt atgtaactat gagttg 36

<210> 41
<211> 40
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 41
gaggtgaggt acaatgcatt aatagcaaga tggaggaaga 40

<210> 42
<211> 40
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 42
cagaagcaaa acaaaatgtg actgcagtga ggattgtggt 40

<210> 43
<211> 17
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 43
gtttaacacg tggtgag 17

<210> 44
<211> 17
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 44
acatataggc atgcacc 17

<210> 45
<211> 17
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 45
gcaaaatgga tcccatt 17

<210> 46
<211> 18
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 46
tggttggtat accagtgt 18

<210> 47
<211> 18
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 47
taccaagagc tcgagtca 18

<210> 48
<211> 21
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 48
ggtggccggc atggtcccag c 21

<210> 49
<211> 20
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 49
tttaccatat gcgctaatgt 20

<210> 50
<211> 19
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 50
acgcgaaaaa atgcgtaca 19

<210> 51
<211> 18
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 51
acgagaaaaa agtggcaa 18

<210> 52
<211> 17
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 52
ctcaccacgt gttaaac 17

<210> 53
<211> 17
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 53
ggtgcatgcc tatatgt 17

<210> 54
<211> 19
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 54
aatgggatcc attttgtcc 19

<210> 55
<211> 19
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 55
aacactggta taccaacca 19

<210> 56
<211> 20
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 56
acattagcgc atatggtaaa 20

<210> 57
<211> 36
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 57
atcaggatcc acaataacat tggggcaaat gcaacc 36

<210> 58
<211> 36
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 58
caactcatag ttacataaaa cggatccgaa tgccat 36

<210> 59
<211> 2165
<212> PRT
<213> vírus

<400> 59

```
Met Asp Pro Ile Ile Asn Gly Asn Ser Ala Asn Val Tyr Leu Thr Asp
 1               5                  10                  15
Ser Tyr Leu Lys Gly Val Ile Ser Phe Ser Glu Cys Asn Ala Leu Gly
            20                  25                  30
Ser Tyr Ile Phe Asn Gly Pro Tyr Leu Lys Asn Asp Tyr Thr Asn Leu
        35                  40                  45
Ile Ser Arg Gln Asn Pro Leu Ile Glu His Met Asn Leu Lys Lys Leu
    50                  55                  60
Asn Ile Thr Gln Ser Leu Ile Ser Lys Tyr His Lys Gly Glu Ile Lys
65                  70                  75                  80
Leu Glu Glu Pro Thr Tyr Phe Gln Ser Leu Leu Met Thr Tyr Lys Ser
                85                  90                  95
Met Thr Ser Ser Glu Gln Ile Ala Thr Thr Asn Leu Leu Lys Lys Ile
            100                 105                 110
Ile Arg Arg Ala Ile Glu Ile Ser Asp Val Lys Val Tyr Ala Ile Leu
```

```
        115                 120                 125
Asn Lys Leu Gly Leu Lys Glu Lys Asp Lys Ile Lys Ser Asn Asn Gly
    130                 135                 140
Gln Asp Glu Asp Asn Ser Val Ile Thr Thr Ile Ile Lys Asp Asp Ile
145                 150                 155                 160
Leu Ser Ala Val Lys Asp Asn Gln Ser His Leu Lys Ala Asp Lys Asn
                165                 170                 175
His Ser Thr Lys Gln Lys Asp Thr Ile Lys Thr Thr Leu Leu Lys Lys
            180                 185                 190
Leu Met Cys Ser Met Gln His Pro Pro Ser Trp Leu Ile His Trp Phe
        195                 200                 205
Asn Leu Tyr Thr Lys Leu Asn Asn Ile Leu Thr Gln Tyr Arg Ser Asn
    210                 215                 220
Glu Val Lys Asn His Gly Phe Thr Leu Ile Asp Asn Gln Thr Leu Ser
225                 230                 235                 240
Gly Phe Gln Phe Ile Leu Asn Gln Tyr Gly Cys Ile Val Tyr His Lys
                245                 250                 255
Glu Leu Lys Arg Ile Thr Val Thr Thr Tyr Asn Gln Phe Leu Thr Trp
            260                 265                 270
Lys Asp Ile Ser Leu Ser Arg Leu Asn Val Cys Leu Ile Thr Trp Ile
        275                 280                 285
Ser Asn Cys Leu Asn Thr Leu Asn Lys Ser Leu Gly Leu Arg Cys Gly
    290                 295                 300
Phe Asn Asn Val Ile Leu Thr Gln Leu Phe Leu Tyr Gly Asp Cys Ile
305                 310                 315                 320
Leu Lys Leu Phe His Asn Glu Gly Phe Tyr Ile Ile Lys Glu Val Glu
                325                 330                 335
Gly Phe Ile Met Ser Leu Ile Leu Asn Ile Thr Glu Glu Asp Gln Phe
            340                 345                 350
Arg Lys Arg Phe Tyr Asn Ser Met Leu Asn Asn Ile Thr Asp Ala Ala
        355                 360                 365
Asn Lys Ala Gln Lys Asn Leu Leu Ser Arg Val Cys His Thr Leu Leu
    370                 375                 380
Asp Lys Thr Val Ser Asp Asn Ile Ile Asn Gly Arg Trp Ile Ile Leu
385                 390                 395                 400
Leu Ser Lys Phe Leu Lys Leu Ile Lys Leu Ala Gly Asp Asn Asn Leu
                405                 410                 415
Asn Asn Leu Ser Glu Leu Tyr Phe Leu Phe Arg Ile Phe Gly His Pro
            420                 425                 430
Met Val Asp Glu Arg Gln Ala Met Asp Ala Val Lys Ile Asn Cys Asn
        435                 440                 445
Glu Thr Lys Phe Tyr Leu Leu Ser Ser Leu Ser Met Leu Arg Gly Ala
    450                 455                 460
Phe Ile Tyr Arg Ile Ile Lys Gly Phe Val Asn Asn Tyr Asn Arg Trp
465                 470                 475                 480
Pro Thr Leu Arg Asn Ala Ile Val Leu Pro Leu Arg Trp Leu Thr Tyr
                485                 490                 495
Tyr Lys Leu Asn Thr Tyr Pro Ser Leu Leu Glu Leu Thr Glu Arg Asp
            500                 505                 510
Leu Ile Val Leu Ser Gly Leu Arg Phe Tyr Arg Glu Phe Arg Leu Pro
        515                 520                 525
Lys Lys Val Asp Leu Glu Met Ile Ile Asn Asp Lys Ala Ile Ser Pro
    530                 535                 540
Pro Lys Asn Leu Ile Trp Thr Ser Phe Pro Arg Asn Tyr Met Pro Ser
545                 550                 555                 560
His Ile Gln Asn Tyr Ile Glu His Glu Lys Leu Lys Phe Ser Glu Ser
                565                 570                 575
Asp Lys Ser Arg Arg Val Leu Glu Tyr Tyr Leu Arg Asp Asn Lys Phe
            580                 585                 590
Asn Glu Cys Asp Leu Tyr Asn Cys Val Val Asn Gln Ser Tyr Leu Asn
        595                 600                 605
Asn Pro Asn His Val Val Ser Leu Thr Gly Lys Glu Arg Glu Leu Ser
    610                 615                 620
Val Gly Arg Met Phe Ala Met Gln Pro Gly Met Phe Arg Gln Val Gln
625                 630                 635                 640
Ile Leu Ala Glu Lys Met Ile Ala Glu Asn Ile Leu Gln Phe Phe Pro
                645                 650                 655
Glu Ser Leu Thr Arg Tyr Gly Asp Leu Glu Leu Gln Lys Ile Leu Glu
```

```
            660                 665                 670
Leu Lys Ala Gly Ile Ser Asn Lys Ser Asn Arg Tyr Asn Asp Asn Tyr
        675                 680                 685
Asn Asn Tyr Ile Ser Lys Cys Ser Ile Ile Thr Asp Leu Ser Lys Phe
    690                 695                 700
Asn Gln Ala Phe Arg Tyr Glu Thr Ser Cys Ile Cys Ser Asp Val Leu
705                 710                 715                 720
Asp Glu Leu His Gly Val Gln Ser Leu Phe Ser Trp Leu His Leu Thr
                725                 730                 735
Ile Pro His Val Thr Ile Ile Cys Thr Tyr Arg His Ala Pro Pro Tyr
            740                 745                 750
Ile Gly Asp His Ile Val Asp Leu Asn Asn Val Asp Glu Gln Ser Gly
        755                 760                 765
Leu Tyr Arg Tyr His Met Gly Gly Ile Glu Gly Trp Cys Gln Lys Leu
    770                 775                 780
Trp Thr Ile Glu Ala Ile Ser Leu Leu Asp Leu Ile Ser Leu Lys Gly
785                 790                 795                 800
Lys Phe Ser Ile Thr Ala Leu Ile Asn Gly Asp Asn Gln Ser Ile Asp
                805                 810                 815
Ile Ser Lys Pro Ile Arg Leu Met Glu Gly Gln Thr His Ala Gln Ala
            820                 825                 830
Asp Tyr Leu Leu Ala Leu Asn Ser Leu Lys Leu Leu Tyr Lys Glu Tyr
        835                 840                 845
Ala Gly Ile Gly His Lys Leu Lys Gly Thr Glu Thr Tyr Ile Ser Arg
    850                 855                 860
Asp Met Gln Phe Met Ser Lys Thr Ile Gln His Asn Gly Val Tyr Tyr
865                 870                 875                 880
Pro Ala Ser Ile Lys Lys Val Leu Arg Val Gly Pro Trp Ile Asn Thr
                885                 890                 895
Ile Leu Asp Asp Phe Lys Val Ser Leu Glu Ser Ile Gly Ser Leu Thr
            900                 905                 910
Gln Glu Leu Glu Tyr Arg Gly Glu Ser Leu Leu Cys Ser Leu Ile Phe
        915                 920                 925
Arg Asn Val Trp Leu Tyr Asn Gln Ile Ala Leu Gln Leu Lys Asn His
    930                 935                 940
Ala Leu Cys Asn Asn Lys Leu Tyr Leu Asp Ile Leu Lys Val Leu Lys
945                 950                 955                 960
His Leu Lys Thr Phe Phe Asn Leu Asp Asn Ile Asp Thr Ala Leu Thr
                965                 970                 975
Leu Tyr Met Asn Leu Pro Met Leu Phe Gly Gly Gly Asp Pro Asn Leu
            980                 985                 990
Leu Tyr Arg Ser Phe Tyr Arg Arg Thr Pro Asp Phe Leu Thr Glu Ala
        995                 1000                1005
Ile Val His Ser Val Phe Ile Leu Ser Tyr Tyr Thr Asn His Asp Leu
    1010                1015                1020
Lys Asp Lys Leu Gln Asp Leu Ser Asp Asp Arg Leu Asn Lys Phe Leu
1025                1030                1035                1040
Thr Cys Ile Ile Thr Phe Asp Lys Asn Pro Asn Ala Glu Phe Val Thr
                1045                1050                1055
Leu Met Arg Asp Pro Gln Ala Leu Gly Ser Glu Arg Gln Ala Lys Ile
            1060                1065                1070
Thr Ser Glu Ile Asn Arg Leu Ala Val Thr Glu Val Leu Ser Thr Ala
        1075                1080                1085
Pro Asn Lys Ile Phe Ser Lys Ser Ala Gln His Tyr Thr Thr Thr Glu
    1090                1095                1100
Ile Asp Leu Asn Asp Ile Met Gln Asn Ile Glu Pro Thr Tyr Pro His
1105                1110                1115                1120
Gly Leu Arg Val Val Tyr Glu Ser Leu Pro Phe Tyr Lys Ala Glu Lys
                1125                1130                1135
Ile Val Asn Leu Ile Ser Gly Thr Lys Ser Ile Thr Asn Ile Leu Glu
            1140                1145                1150
Lys Thr Ser Ala Ile Asp Leu Thr Asp Ile Asp Arg Ala Thr Glu Met
        1155                1160                1165
Met Arg Lys Asn Ile Thr Leu Leu Ile Arg Ile Leu Pro Leu Asp Cys
    1170                1175                1180
Asn Arg Asp Lys Arg Glu Ile Leu Ser Met Glu Asn Leu Ser Ile Thr
1185                1190                1195                1200
Glu Leu Ser Lys Tyr Val Arg Glu Arg Ser Trp Ser Leu Ser Asn Ile
```

```
                1205                1210                1215
Val Gly Val Thr Ser Pro Ser Ile Met Tyr Thr Met Asp Ile Lys Tyr
            1220                1225                1230
Thr Thr Ser Thr Ile Ser Ser Gly Ile Ile Ile Glu Lys Tyr Asn Val
        1235                1240                1245
Asn Ser Leu Thr Arg Gly Glu Arg Gly Pro Thr Lys Pro Trp Val Gly
    1250                1255                1260
Ser Ser Thr Gln Glu Lys Lys Thr Met Pro Val Tyr Asn Arg Gln Val
1265                1270                1275                1280
Leu Thr Lys Lys Gln Arg Asp Gln Ile Asp Leu Leu Ala Lys Leu Asp
                1285                1290                1295
Trp Val Tyr Ala Ser Ile Asp Asn Lys Asp Glu Phe Met Glu Glu Leu
            1300                1305                1310
Ser Ile Gly Thr Leu Gly Leu Thr Tyr Glu Lys Ala Lys Lys Leu Phe
        1315                1320                1325
Pro Gln Tyr Leu Ser Val Asn Tyr Leu His Arg Leu Thr Val Ser Ser
    1330                1335                1340
Arg Pro Cys Glu Phe Pro Ala Ser Ile Pro Ala Tyr Arg Thr Thr Asn
1345                1350                1355                1360
Tyr His Phe Asp Thr Ser Pro Ile Asn Arg Ile Leu Thr Glu Lys Tyr
                1365                1370                1375
Gly Asp Glu Asp Ile Asp Ile Val Phe Gln Asn Cys Ile Ser Phe Gly
            1380                1385                1390
Leu Ser Leu Met Ser Val Val Glu Gln Phe Thr Asn Val Cys Pro Asn
        1395                1400                1405
Arg Ile Ile Leu Ile Pro Lys Leu Asn Glu Ile His Leu Met Lys Pro
    1410                1415                1420
Pro Ile Phe Thr Gly Asp Val Asp Ile His Lys Leu Lys Gln Val Ile
1425                1430                1435                1440
Gln Lys Gln His Met Phe Leu Pro Asp Lys Ile Ser Leu Thr Gln Tyr
                1445                1450                1455
Val Glu Leu Phe Leu Ser Asn Lys Thr Leu Lys Ser Gly Ser His Val
            1460                1465                1470
Asn Ser Asn Leu Ile Leu Ala His Lys Ile Ser Asp Tyr Phe His Asn
        1475                1480                1485
Thr Tyr Ile Leu Ser Thr Asn Leu Ala Gly His Trp Ile Leu Ile Ile
    1490                1495                1500
Gln Leu Met Lys Asp Ser Lys Gly Ile Phe Glu Lys Asp Trp Gly Glu
1505                1510                1515                1520
Gly Tyr Ile Thr Asp His Met Phe Ile Asn Leu Lys Val Phe Phe Asn
                1525                1530                1535
Ala Tyr Lys Thr Tyr Leu Leu Cys Phe His Lys Gly Tyr Gly Lys Ala
            1540                1545                1550
Lys Leu Glu Cys Asp Met Asn Thr Ser Asp Leu Leu Cys Val Leu Glu
        1555                1560                1565
Leu Ile Asp Ser Ser Tyr Trp Lys Ser Met Ser Lys Val Phe Leu Glu
    1570                1575                1580
Gln Lys Val Ile Lys Tyr Ile Leu Ser Gln Asp Ala Ser Leu His Arg
1585                1590                1595                1600
Val Lys Gly Cys His Ser Phe Lys Leu Trp Phe Leu Lys Arg Leu Asn
                1605                1610                1615
Val Ala Glu Phe Thr Val Cys Pro Trp Val Val Asn Ile Asp Tyr His
            1620                1625                1630
Pro Thr His Met Lys Ala Ile Leu Thr Tyr Ile Asp Leu Val Arg Met
        1635                1640                1645
Gly Leu Ile Asn Ile Asp Arg Ile His Ile Lys Asn Lys His Lys Phe
    1650                1655                1660
Asn Asp Glu Phe Tyr Thr Ser Asn Leu Phe Tyr Ile Asn Tyr Asn Phe
1665                1670                1675                1680
Ser Asp Asn Thr His Leu Leu Thr Lys His Ile Arg Ile Ala Asn Ser
                1685                1690                1695
Glu Leu Glu Asn Asn Tyr Asn Lys Leu Tyr His Pro Thr Pro Glu Thr
            1700                1705                1710
Leu Glu Asn Ile Leu Ala Asn Pro Ile Lys Ser Asn Asp Lys Lys Thr
        1715                1720                1725
Leu Asn Asp Tyr Cys Ile Gly Lys Asn Val Asp Ser Ile Met Leu Pro
    1730                1735                1740
Leu Leu Ser Asn Lys Lys Leu Ile Lys Ser Ser Ala Met Ile Arg Thr
```

```
1745                1750                1755                1760
Asn Tyr Ser Lys Gln Asp Leu Tyr Asn Leu Phe Pro Met Val Val Ile
                1765                1770                1775
Asp Arg Ile Ile Asp His Ser Gly Asn Thr Ala Lys Ser Asn Gln Leu
            1780                1785                1790
Tyr Thr Thr Thr Ser His Gln Ile Ser Leu Val His Asn Ser Thr Ser
        1795                1800                1805
Leu Tyr Cys Met Leu Pro Trp His His Ile Asn Arg Phe Asn Phe Val
    1810                1815                1820
Phe Ser Ser Thr Gly Cys Lys Ile Ser Ile Glu Tyr Ile Leu Lys Asp
1825                1830                1835                1840
Leu Lys Ile Lys Asp Pro Asn Cys Ile Ala Phe Ile Gly Glu Gly Ala
                1845                1850                1855
Gly Asn Leu Leu Leu Arg Thr Val Val Glu Leu His Pro Asp Ile Arg
            1860                1865                1870
Tyr Ile Tyr Arg Ser Leu Lys Asp Cys Asn Asp His Ser Leu Pro Ile
        1875                1880                1885
Glu Phe Leu Arg Leu Tyr Asn Gly His Ile Asn Ile Asp Tyr Gly Glu
    1890                1895                1900
Asn Leu Thr Ile Pro Ala Thr Asp Ala Thr Asn Asn Ile His Trp Ser
1905                1910                1915                1920
Tyr Leu His Ile Lys Phe Ala Glu Pro Ile Ser Leu Phe Val Cys Asp
                1925                1930                1935
Ala Glu Leu Ser Val Thr Val Asn Trp Ser Lys Ile Ile Ile Glu Trp
            1940                1945                1950
Ser Lys His Val Arg Lys Cys Lys Tyr Cys Ser Ser Val Asn Lys Cys
        1955                1960                1965
Met Leu Ile Val Lys Tyr His Ala Gln Asp Asp Ile Asp Phe Lys Leu
    1970                1975                1980
Asp Asn Ile Thr Ile Leu Lys Thr Tyr Val Cys Leu Gly Ser Lys Leu
1985                1990                1995                2000
Lys Gly Ser Glu Val Tyr Leu Val Leu Thr Ile Gly Pro Ala Asn Ile
                2005                2010                2015
Phe Pro Val Phe Asn Val Val Gln Asn Ala Lys Leu Ile Leu Ser Arg
            2020                2025                2030
Thr Lys Asn Phe Ile Met Pro Lys Lys Ala Asp Lys Glu Ser Ile Asp
        2035                2040                2045
Ala Asn Ile Lys Ser Leu Ile Pro Phe Leu Cys Tyr Pro Ile Thr Lys
    2050                2055                2060
Lys Gly Ile Asn Thr Ala Leu Ser Lys Leu Lys Ser Val Val Ser Gly
2065                2070                2075                2080
Asp Ile Leu Ser Tyr Ser Ile Ala Gly Arg Asn Glu Val Phe Ser Asn
                2085                2090                2095
Lys Leu Ile Asn His Lys His Met Asn Ile Leu Lys Trp Phe Asn His
            2100                2105                2110
Val Leu Asn Phe Arg Ser Thr Glu Leu Asn Tyr Asn His Leu Tyr Met
        2115                2120                2125
Val Glu Ser Thr Tyr Pro Tyr Leu Ser Glu Leu Leu Asn Ser Leu Thr
    2130                2135                2140
Thr Asn Glu Leu Lys Lys Leu Ile Lys Ile Thr Gly Ser Leu Leu Tyr
2145                2150                2155                2160
Asn Phe His Asn Glu
                2165
```

<210> 60

<211> 47

<212> ADN

<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>

<221> CDS

<222> (5)..(43)

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Produto de RT/PCR

<400> 60
acaa atg acc atg cca aaa ata atg ata cta cct gac aaa taa gctt 47

<210> 61
<211> 12
<212> PRT
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Produto de RT/PCR

<400> 61
Met Thr Met Pro Lys Ile Met Ile Leu Pro Asp Lys
1 5 10

<210> 62
<211> 11
<212> PRT
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Produto de RT/PCR

<400> 62
Thr Asn Asp His Ala Lys Asn Asn Asp Thr Thr
1 5 10

<210> 63
<211> 16
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Produto de RT/PCR

<400> 63
aagctttaag cttcaa 16

<210> 64
<211> 9
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Produto de RT/PCR

<400> 64
aagcttcaa 9

<210> 65
<211> 35
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 65
ggatccacaa taacattggg gcaaatgcaa ccatg 35

<210> 66
<211> 19
<212> ADN
<213> SEQUÊNCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador

<400> 66
agttacataa aacggatcc 19

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Partícula isolada de vírus sincicial respiratório infecciosa com um fenótipo atenuado incluindo uma antigenoma ou genoma de vírus sincicial respiratório, em que o referido genoma ou antigenoma contém: (a) uma sequência heteróloga que codifica uma proteína G e F de RSV estirpe B9320; e (b) uma deleção do quadro de leitura aberto de M2-2.

2. Partícula isolada de vírus sincicial respiratório infecciosa de acordo com a reivindicação 1, em que os genes G e F heterólogos substituem os genes G e F do genoma do vírus hospedeiro.

3. Partícula isolada de vírus sincicial respiratório infecciosa da reivindicação 1, em que a referida sequência heteróloga é derivada de uma estirpe diferente de vírus sincicial respiratório.

4. ADNc isolado que codifica uma partícula isolada de vírus sincicial respiratório infecciosa com um fenótipo atenuado incluindo um antigenoma ou genoma de vírus sincicial respiratório, em que o referido genoma ou antigenoma contém: a) uma sequência heteróloga que codifica uma proteína G e F de RSV estirpe B9320; e b) uma deleção do quadro de leitura aberto de M2-2.

5. ADNc isolado que codifica uma partícula de vírus sincicial respiratório infecciosa de acordo com a reivindicação 4, em que os genes G e F heterólogos substituem os genes G e F do genoma do vírus hospedeiro.

6. Vacina incluindo (a) o vírus sincicial respiratório infeccioso isolado de qualquer uma das reivindicações 1 a 3; e (b) um transportador farmaceuticamente aceitável.

7. Composição farmacêutica incluindo (a) o vírus sincicial respiratório infeccioso isolado de qualquer uma das reivindicações 1 a 3; e (b) um transportador farmaceuticamente aceitável.

Lisboa,

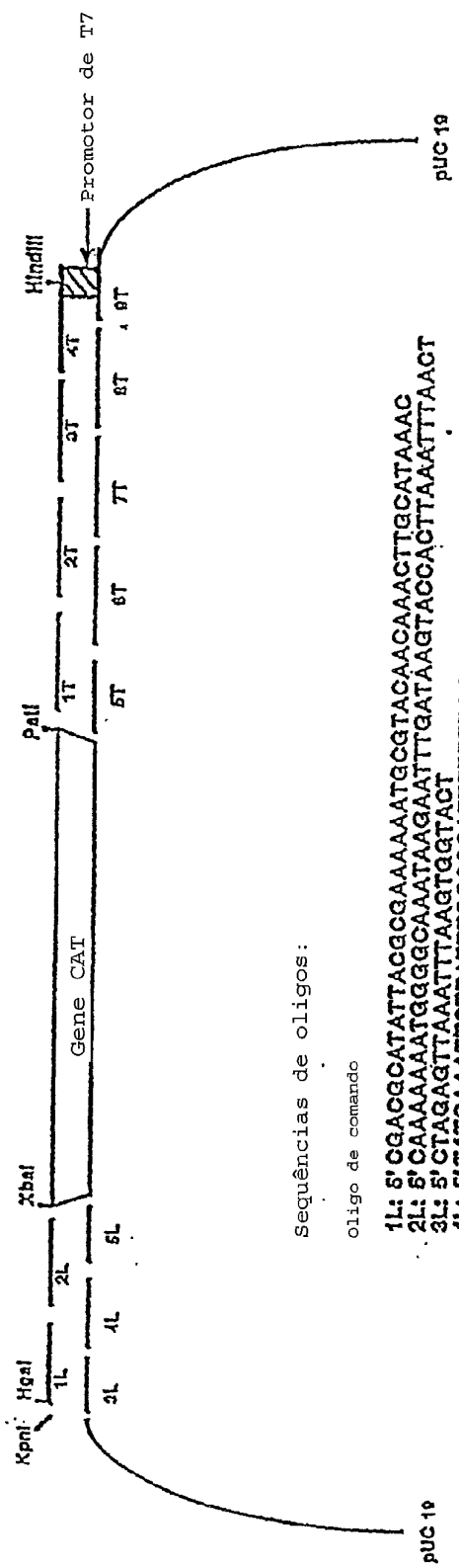

Promotor de T7
HindIII
PstI
XbaI
HgaI
KpnI
Gene CAT
pUC 19
pUC 19
1T
2T
3T
4T
5T
6T
7T
8T
9T
1L
2L
3L
4L
5L
6L
Sequências de oligos:
oligo de comando
1L: 5' CGACGCATATTACGCGAAAAATGCGTACAACAAACTTGCATAAAC
2L: 5' CAAAAAAATGGGGCAAATAAGAATTTGATAAGTACCACTTAAATTTAACT
3L: 5' CTAGAGTTAAATTTAAGTGGTACT
4L: 5' TATCAAATTCTTATTTGCCCCATTTTTTTTGGTTTATGCAAGTTTGTTGTA
5L: 5' CGCATTTTTTCGCGTAATATGCGTCGGTAC
oligo de final
1T: 5' GTATTCAATTATAGTTATTAAAAATTAAAAATCATATAATTTTTTAAATA
2T: 5' ACTTTAGTGAACTAATCCTAAAGTTATCAATGTTTAATCTTGGAGGAATAA
3T: 5' ATTTAAACCCTAATCTAATTGGTTTATATGTGTATTTAACTAAATTACGAG
4T: 5' ATATTAGTTTTTTGACACTTTTTTTTCTCGTTATAGTGAGTCGTATTA
5T: 5' AGCTTAATACGACTCACTATAACGA
6T: 5' GAAAAAAAGTGTCAAAAACTAATATCTCGTAATTTAGTTAATACACATAT
7T: 5' AAACCAATTAGATTAGGGTTTAAATTTATTCCTCCAAGATTAAAATGATA
8T: 5' ACTTTAGGATTAGTTCACTAAAAGTTATTTAAAAAATTATATGATTTTTA
9T: 5' AATTTTAATAACTATAATTGAATACTGCA

FIG. 1

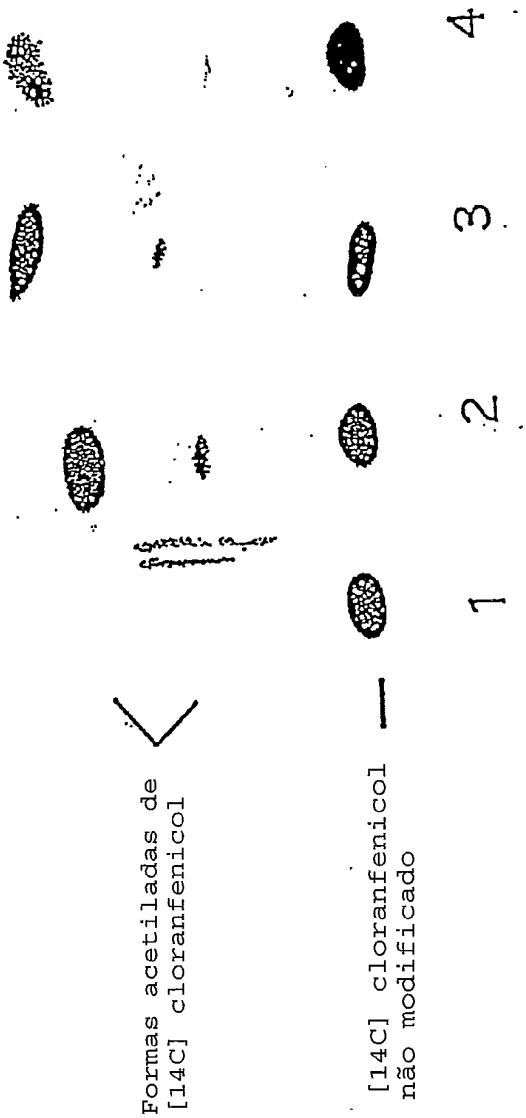
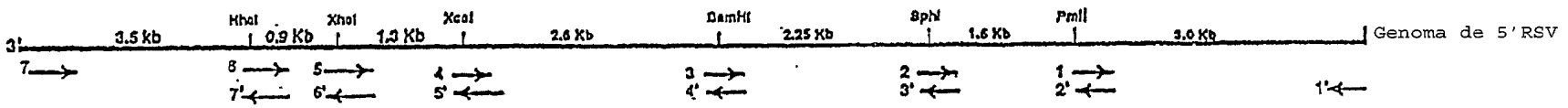

Formas acetiladas de [14C] cloranfenicol
[14C] cloranfenicol não modificado
1
2
3
4

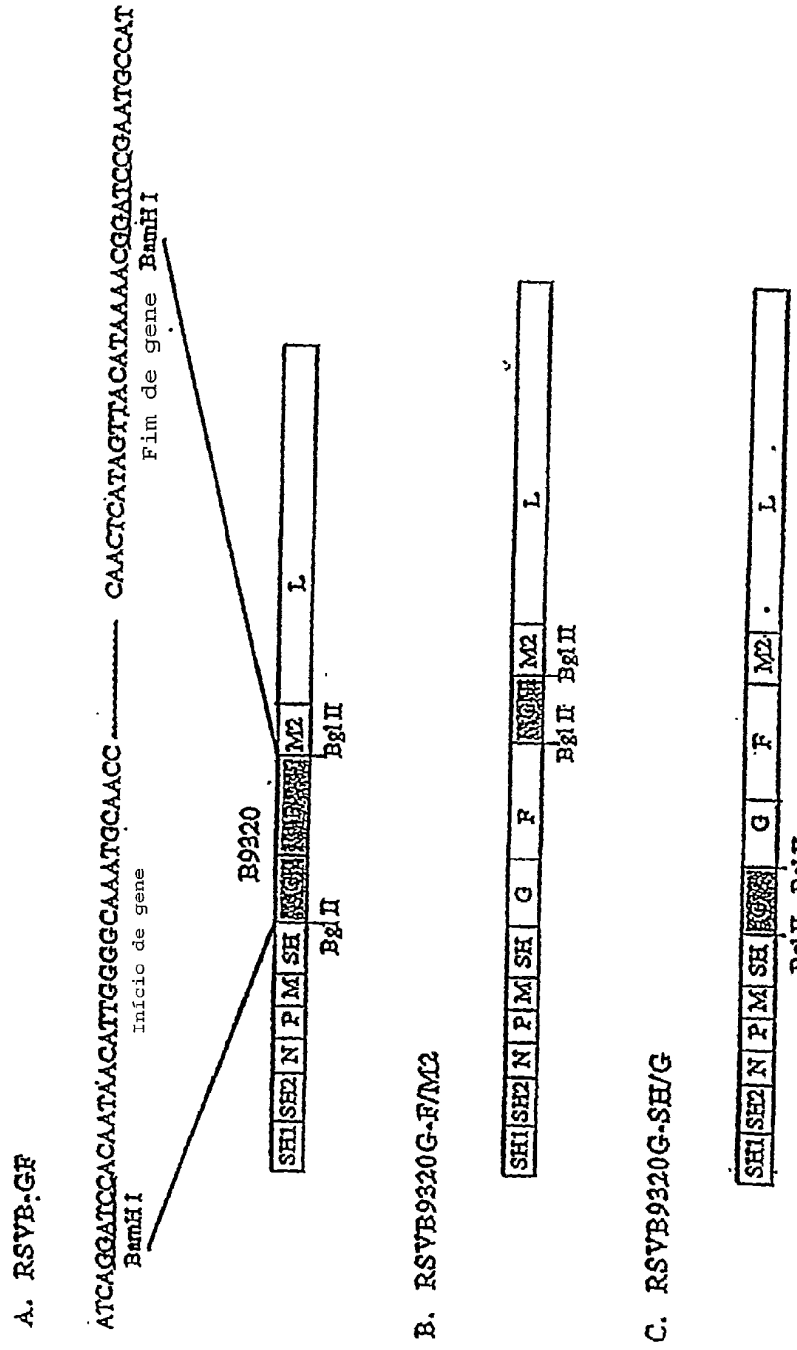
FIG. 2



Sequências de iniciadores:

1: 5' GTTTAACACGTGGTGAG
2: 5' ACATATAGGCATGCACC
3: 5' GACAAAATGGATCCCATT
4: 5' TGGTTGGTATACCAGTGT
5: 5' TACCAAGAGCTCGAGTCA
6: 5' TTTACCATATGCGCTAATGT
7: 5' ACGCGAAAAAATGCGTACA

1': 5' ACGAGAAAAAAAAGTGTCAA
2': 5' CTCACCACGTGTTAAAC
3': 5' GGTGCATGCCTATATGT
4': 5' AATGGGATCCATTTTGTCC
5': 5' AACACTGGTATACCAACCA
6': 5' TGACTCGAGCTCTTGGTA
7': 5' ACATTAGCGCATATGGTAAA


A. RSVB-GF
ATCAGGATCCACAATAACATTGGGGCAAATGCAACC
BamH I
Início de gene
CAACTCATAGTTACATAAAACGGATCCGAATGCCAT
Fim de gene BamH I
B9320
SH1 SH2 N P M SH M2 L
Bgl II
Bgl II
B. RSVB9320G-F/M2
SH1 SH2 N P M SH G F M2 L
Bgl II Bgl II
C. RSVB9320G-SH/G
SH1 SH2 N P M SH G F M2 L
Bgl II Bgl II

FIGS. 4A-C

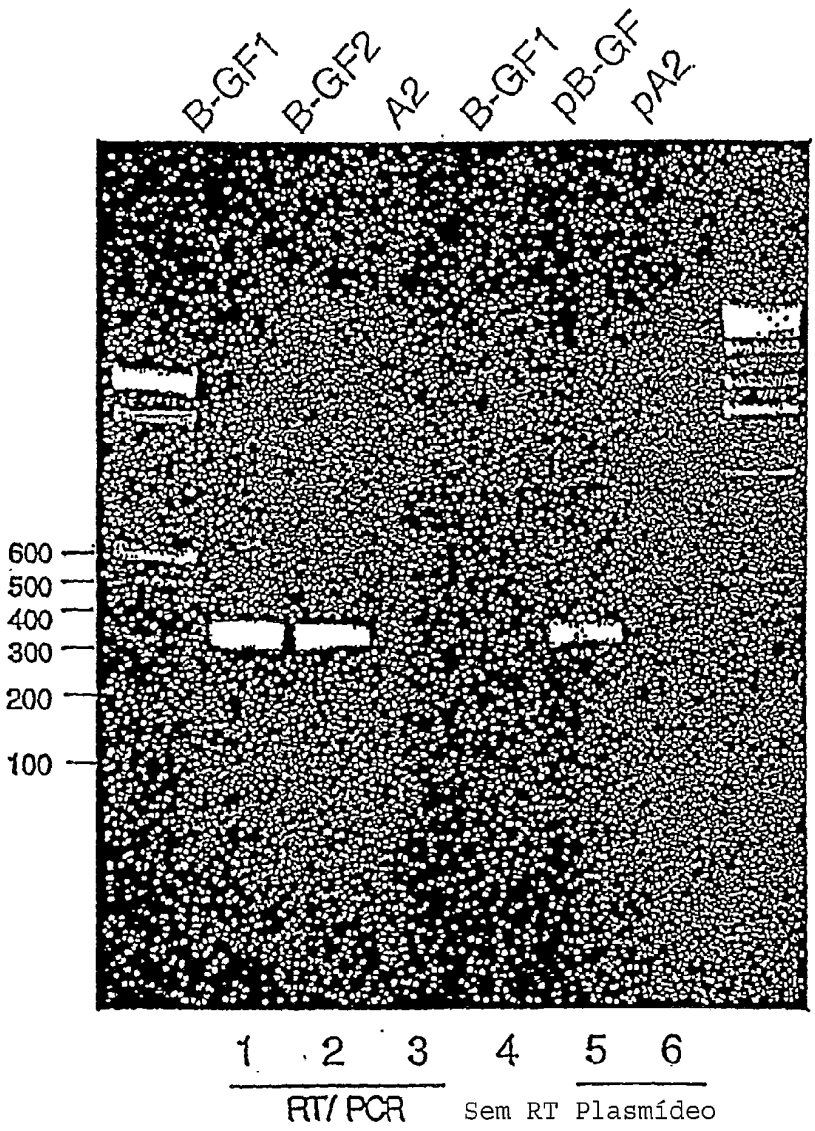
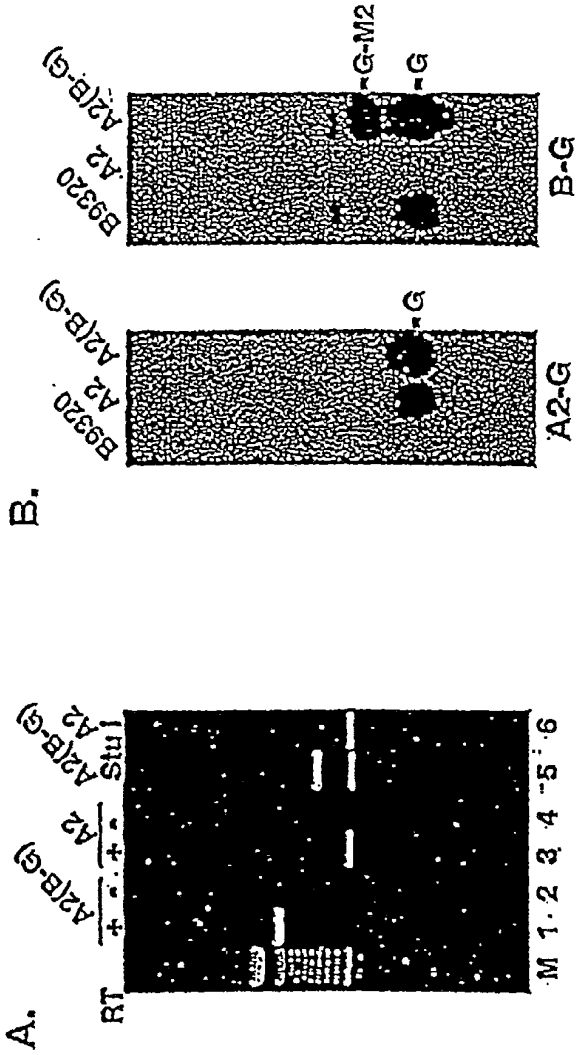

B-GF1
B-GF2
A2
B-GF1
pB-GF
pA2
600
500
400
300
200
100
1
2
3
4
5
6
RT/ PCR
Sem RT
Plasmídeo

FIG. 5


B.
A2(B-G)
A2
B3320
A2-G
A2(B-G)
A2
B3320
B-G
G
G-M2
A.
RT
A2(B-G)
A2
A2(B-G)
A2
Stu I
M 1 2 3 4 5 6

FIGS. 6A-B

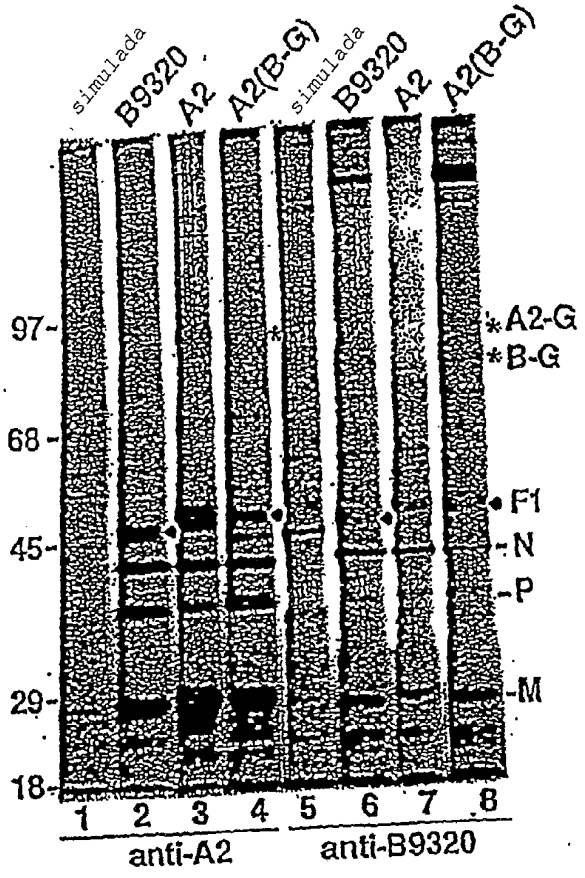

simulada
B9320
A2
A2(B-G)
simulada
B9320
A2
A2(B-G)
97-
68-
45-
29-
18-
*A2-G
*B-G
F1
N
P
M
1 2 3 4 5 6 7 8
anti-A2
anti-B9320

FIG. 7

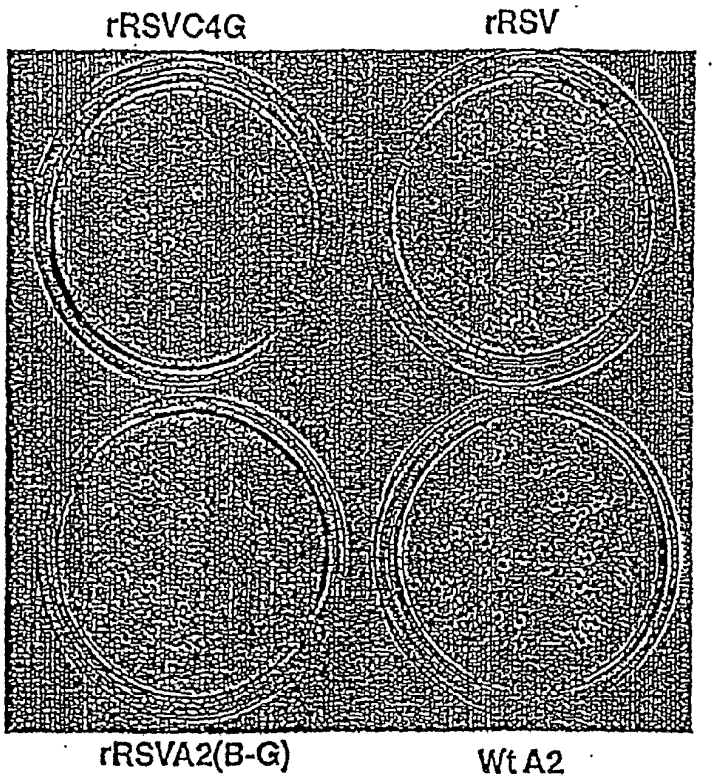


FIG. 8

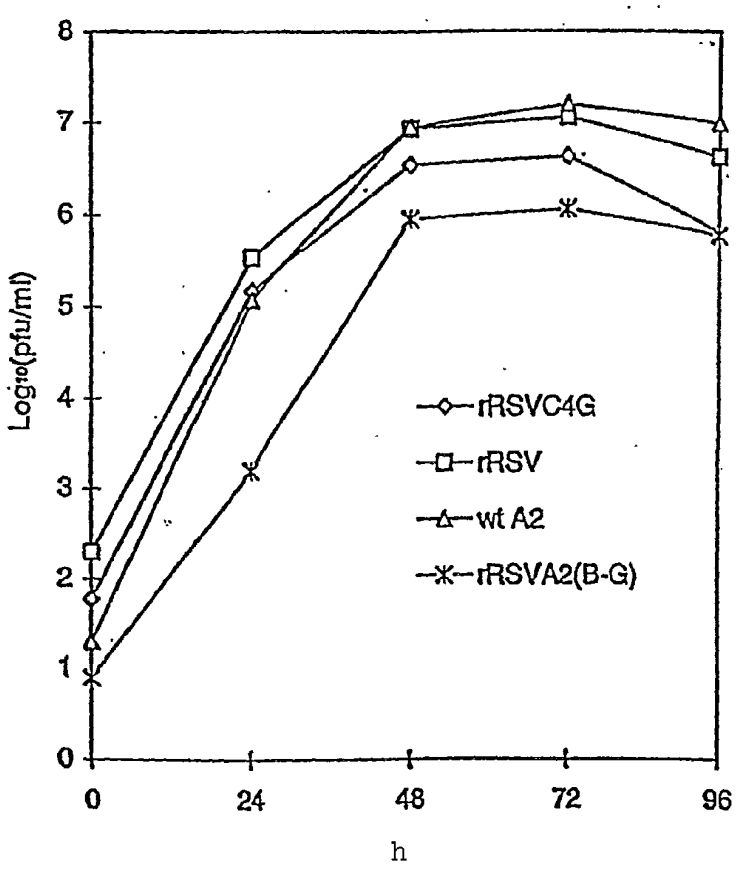

8
7
6
5
4
3
2
1
0
Log10(pfu/ml)
0
24
48
72
96
h
rRSVC4G
rRSV
wt A2
rRSVA2(B-G)

FIG. 9



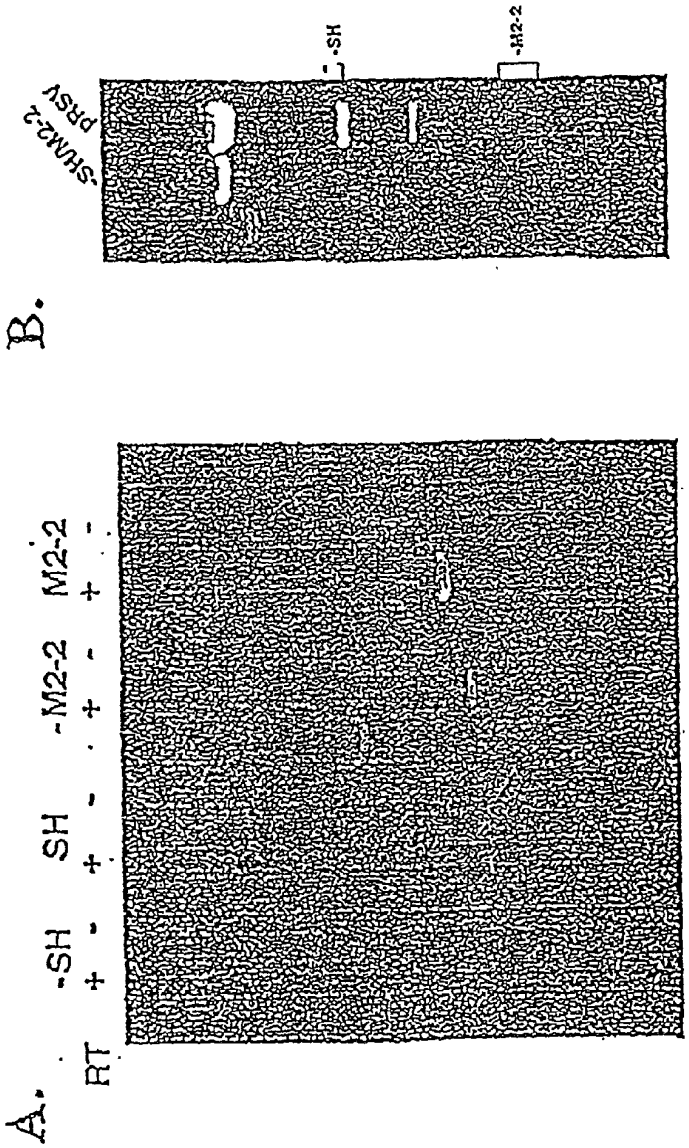
Agregados carregados (os aminoácidos sublinhados foram substituídos por alaninas)
Mutações em cpts-248/404
Mutação em cpts530

FIG. 10

```
MDPIINGNSANVYLT DSYLKGVISFSECNA LGSYIFNGPYLKNDY TNLISRQNPLIEHMN LKKLNITQSLISKYH  75
KGEIKLEEPTYFQSL LMTYKSMTSSEQIAT TNLLKKIIRRAIEIS DVKVYAILNKLGLKE KDKIKSNNGQDEDNS 150
VITTTIIKDDILSAVK DNQSHLKADKNHSTK QKDTIKTTLLKKLMC SMQHPPSWLIHWFNL YTKLNNILTQYRSNE 225
VKNHGFTLIDNQTLS GFQFILNQYGCIVYH KELKRITVTTYNQFL TWKDISLSRLNVCLI TWISNCLNTLNKSLG 300
LRCGFNNVILTQLFL YGDCILKLFHNEGFY IIKEVEGFIMSLILN ITEEDQFRKRFYNSM LNNITDAANKAQKNL 375
LSRVCHTLLDKTVSD NIINGRWIILLSKFL KLIKLAGDNNLNNLS ELYFLFRIFGHPMVD ERQAMDAVKINCNET 450
KFYLLSSLSMLRGAF IYRIIKGFVNNYNRW PTLRNAIVLPLRWLT YYKLNTYPSLLELTE RDLIVLSGLRFYREF 525
RLPKKVDLEMIINDK AISPPKNLIWTSFPR NYMPSHIQNYIEHEK LKFSESDKSRRVLEY YLRDNKFNECDLYNC 600
VVNQSYLNNPNHVVS LTGKERELSVGRMFA MQPGMFRQVQILAEK MIAENILQFFPESLT RYGDLELQKILELKA 675
GISNKSNRYNDNYNN YISKCSIITDLSKFN QAFRYETSCICSDVL DELHGVQSLFSWLHL TIPHVTIICTYRHAP 750
PYIGDHIVDLNNVDE QSGLYRYHMGGIEGW CQKLWTIEAISLLDL ISLKGKFSITALING DNQSIDISKPIRLME 825
GQTHAQADYLLALNS LKLLYKEYAGIGHKL KGTETYISRDMQFMS KTIQHNGVYYPASIK KVLRVGPWINTILDD 900
FKVSLESIGSLTQEL EYRGESLLCSLIFRN VWLYNQIALQLKNHA LCNNKLYLDILKVLK HLKTFFNLDNIDTAL 975
TLYMNLPMLFGGGDP NLLYRSFYRRTPDFL TEAIVHSVFILSYYT NHDLKDKLQDLSDDR LNKFLTCIITFDKNP 1050
NAEFVTLMRDPQALG SERQAKITSEINRLA VTEVLSTAPNKIFSK SAQHYTTTEIDLNDI MQNIEPTYPHGLRVV 1125
YESLPFYKAEKIVNL ISGTKSITNILEKTS AIDLTDIDRATEMMR KNITLLIRILPLDCN RDKREILSMENLSIT 1200
ELSKYVRERSWSLSN IVGVTSPSIMYTMDI KYTTSTISSGIIIEK YNVNSLTRGERGPTK PWVGSSTQEKKTMPV 1275
YNRQVLTKKQRDQID LLAKLDWVYASIDNK DEFMEELSIGTLGLT YEKAKKLFPQYLSVN YLHRLTVSSRPCEFP 1350
ASIPAYRTTNYHFDT SPINRILTEKYGDED IDIVFQNCISFGLSL MSVVEQFTNVCPNRI ILIPKLNEIHLMKPP 1425
IFTGDVDIHKLKQVI QKQHMFLPDKISLTQ YVELFLSNKTLKSGS HVNSNLILAHKISDY FHNTYILSTNLAGHW 1500
ILIIQLMKDSKGIFE KDWGEGYITDHMFIN LKVFFNAYKTYLLCF HKGYGKAKLECDMNT SDLLCVLELIDSSYW 1575
KSMSKVFLEQKVIKY ILSQDASLHRVKGCH SFKLWFLKRLNVAEF TVCPWVVNIDYHPTH MKAILTYIDLVRMGL 1650
INIDRIHIKNKHKFN DEFYTSNLFYINYNF SDNTHLLTKHIRIAN SELENNYNKLYHPTP ETLENILANPIKSND 1725
KKTLNDYCIGKNVDS IMLPLLSNKKLIKSS AMIRTNYSKQDLYNL FPMVVIDRIIDHSGN TAKSNQLYTTTSHQI 1800
SLVHNSTSLYCMLPW HHINREFNFVFSSTGC KISIEYILKDLKIKD PNCIAFIGEGAGNLL LRTVVELHPDIRYIY 1875
RSLKDCNDHSLPIEF LRLYNGHINIDYGEN LTIPATDATNNIHWS YLHIKFAEPISLFVC DAELSVTVNWSKIII 1950
EWSKHVRKCKYCSSV NKCMLIVKYHAQDDI DFKLDNITILKTYVC LGSKLKGSEVYLVLT IGPANIFPVFNVVQN 2025
AKLILSRTKNFIMPK KADKESIDANIKSLI PFLCYPITKKGINTA LSKLKSVVSGDILSY SIAGRNEVFSNKLIN 2100
HKHMNILKWFNHVLN FRSTELNYNHLYMVE STYPYLSELLNSLTT NELKKLIKITGSLLY NFHNE          2165
```

C Resíduos de cisteína
C Resíduos de cisteína que foram modificados para valina ou ácido aspártico
C Resíduo de cisteína eliminado

FIG. 11



FIGS. 12A-B

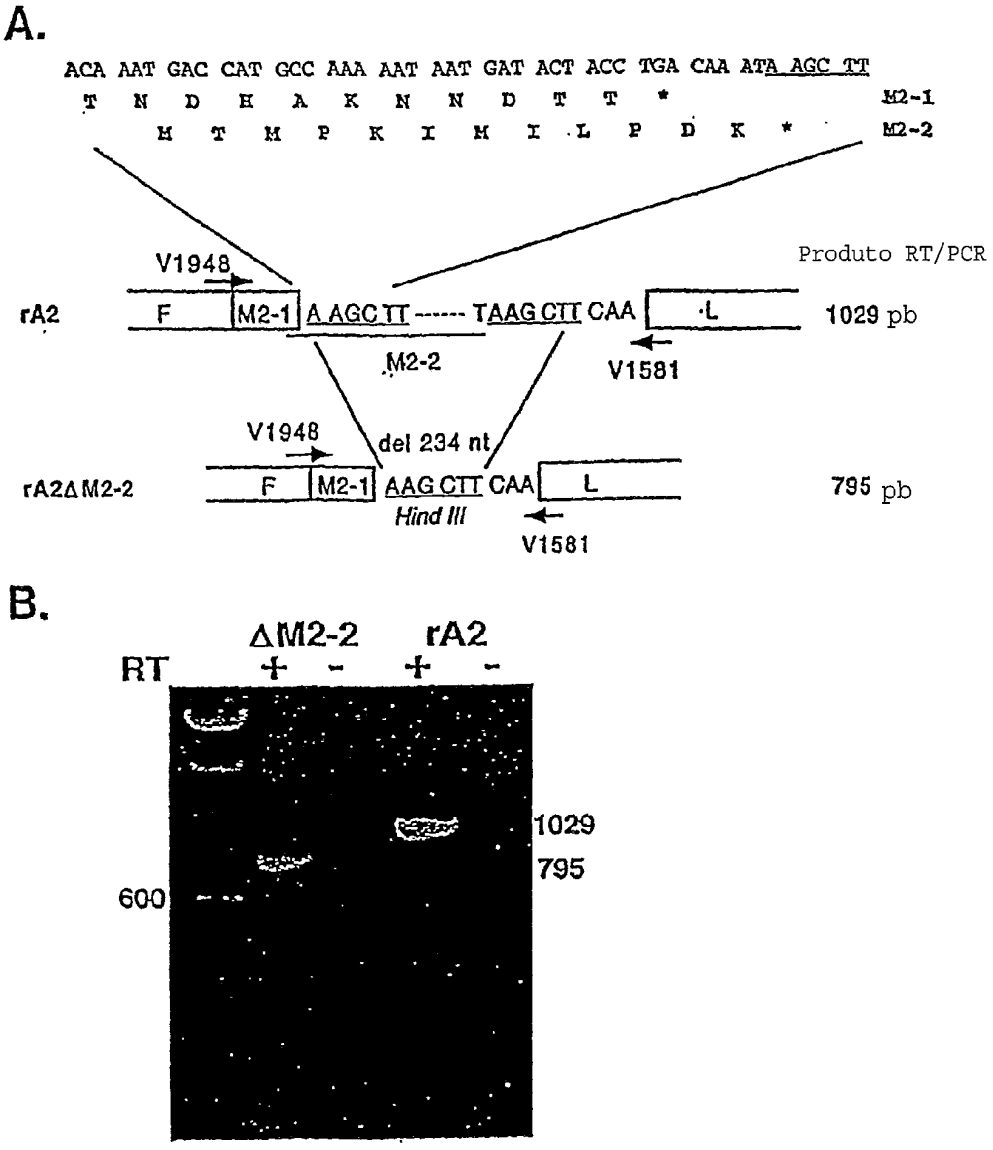

A.
ACA AAT GAC CAT GCC AAA AAT AAT GAT ACT ACC TGA CAA ATA AGC TT
T N D H A K N N D T T *
M2-1
M T M P K I M I L P D K *
M2-2
Produto RT/PCR
V1948
rA2
F
M2-1
A AGC TT ------ TAAG CTT CAA
L
1029 pb
M2-2
V1581
V1948
del 234 nt
rA2ΔM2-2
F
M2-1
AAG CTT CAA
L
795 pb
Hind III
V1581
B.
ΔM2-2
rA2
RT
+ - + -
1029
795
600

FIG. 13

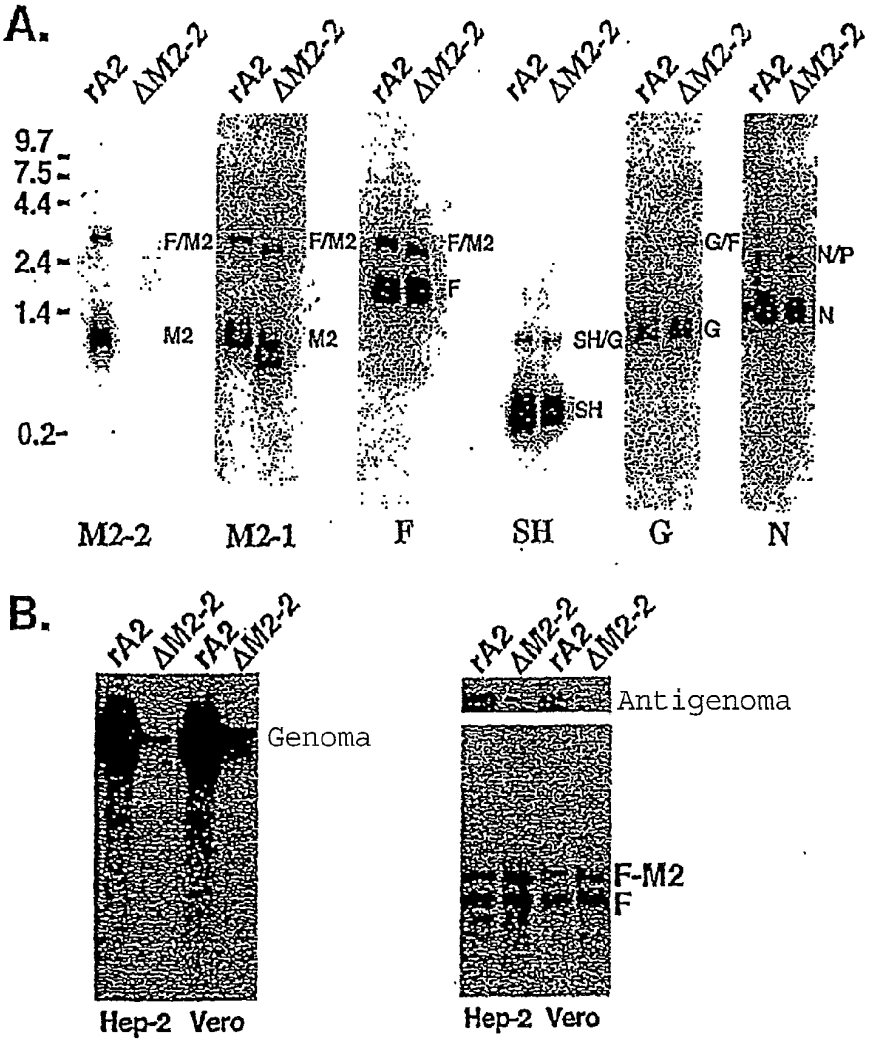

A.
rA2
ΔM2-2
9.7
7.5
4.4
2.4
1.4
0.2
F/M2
M2
F
SH/G
SH
G/F
G
N/P
N
M2-2
M2-1
F
SH
G
N
B.
Genoma
Antigenoma
F-M2
F
Hep-2
Vero

FIG. 14

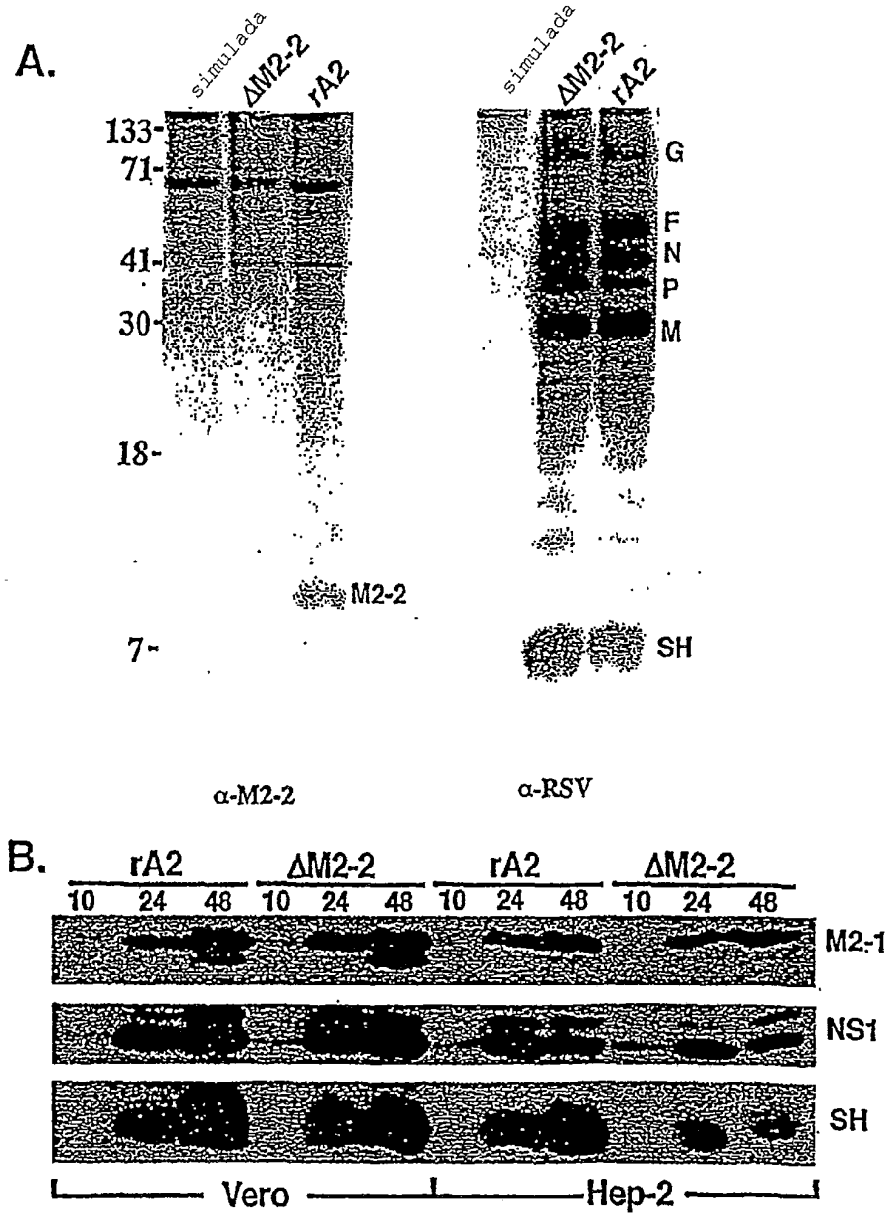

A.
simulada
ΔM2-2
rA2
133-
71-
41-
30-
18-
7-
M2-2
G
F
N
P
M
SH
α-M2-2
α-RSV
B.
rA2
ΔM2-2
rA2
ΔM2-2
10 24 48 10 24 48 10 24 48 10 24 48
M2-1
NS1
SH
Vero
Hep-2

FIG. 15

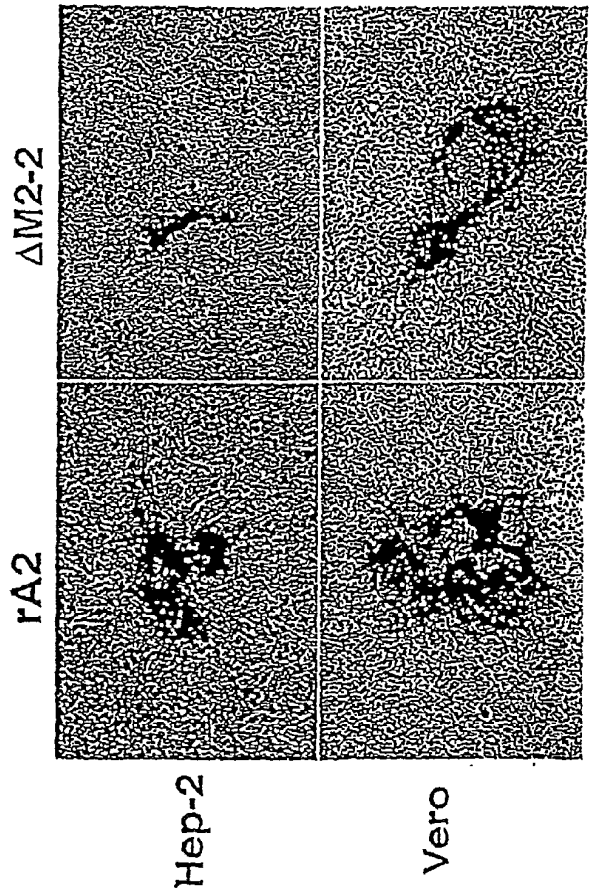
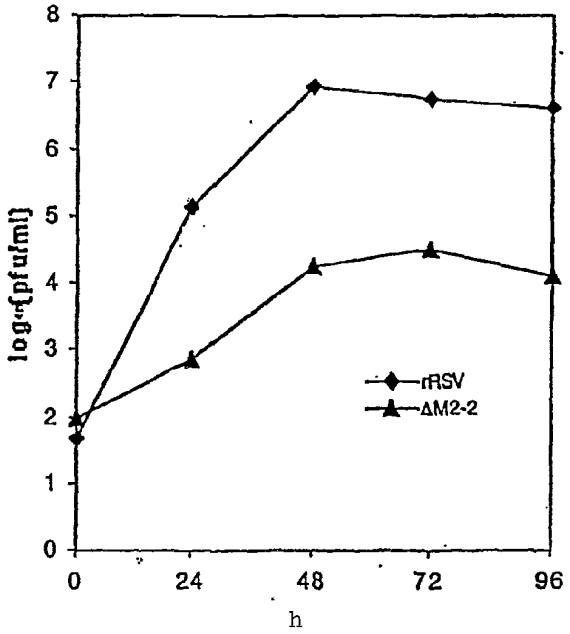


FIG. 16

Células Hep-2



Células Vero

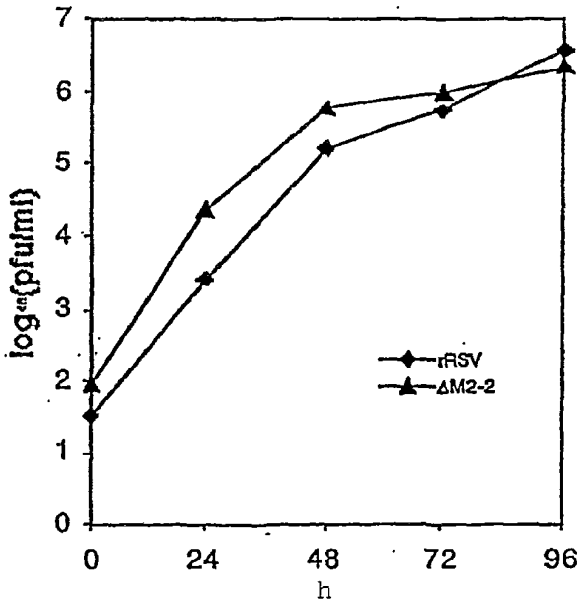


FIG. 17

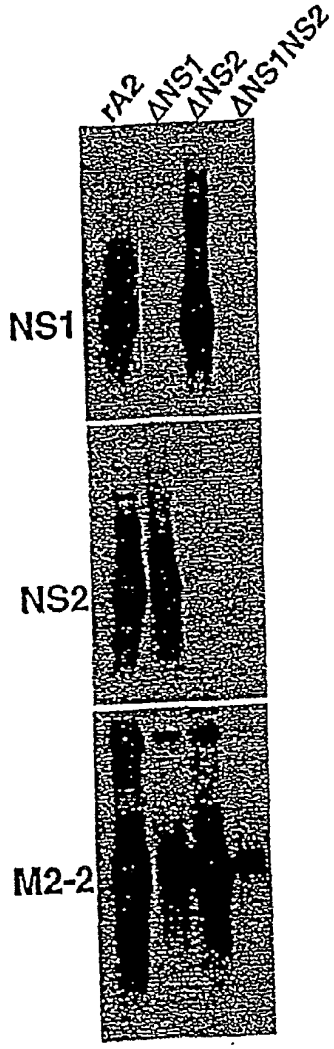


FIG. 18

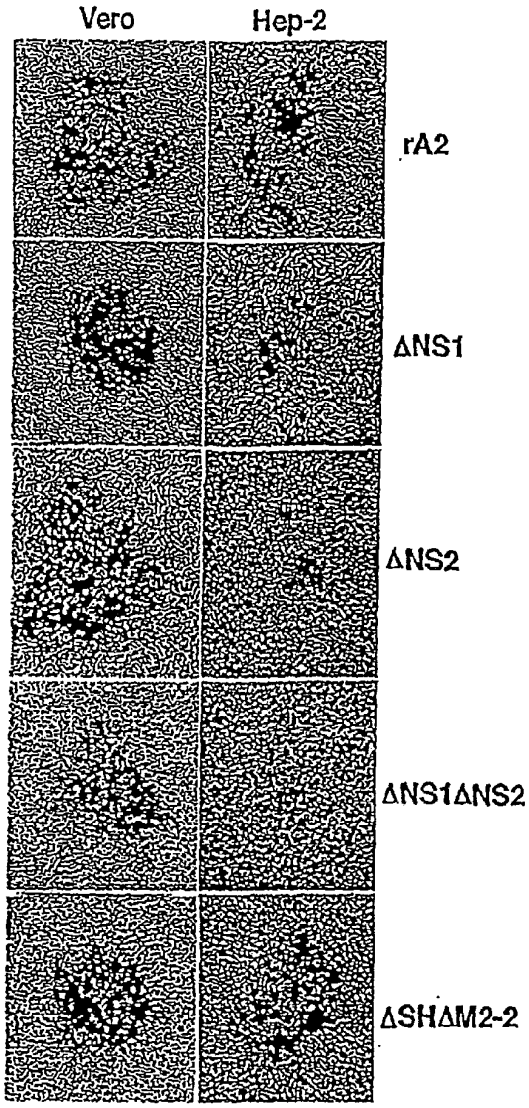


FIG. 19

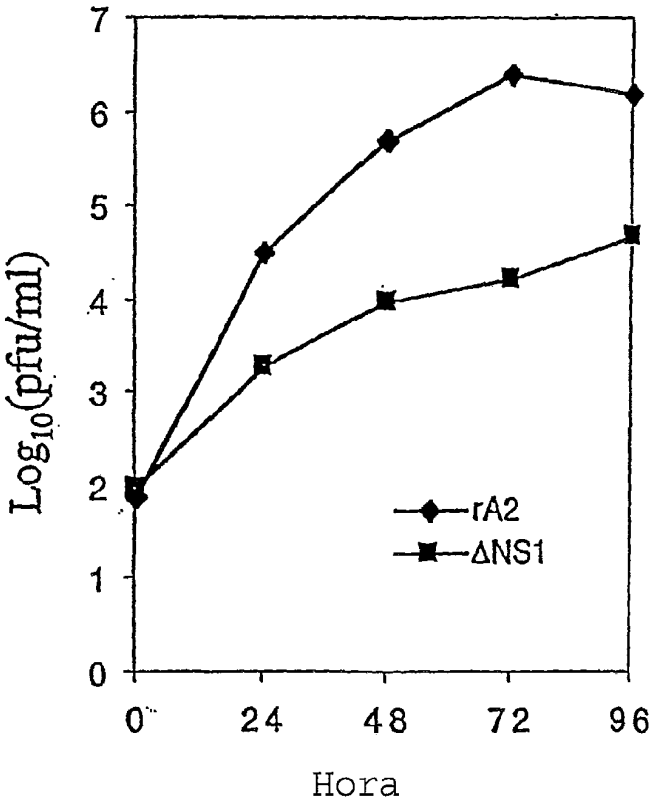


FIG. 20

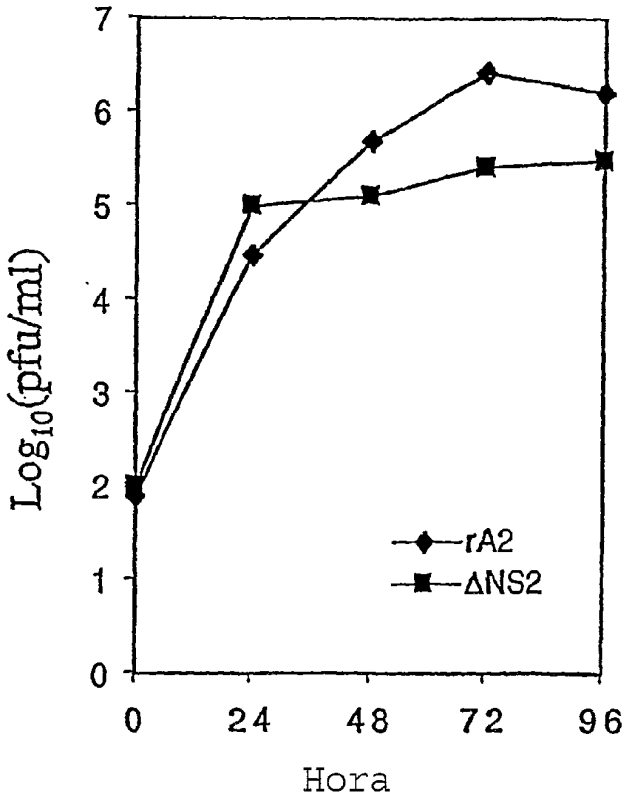


FIG. 21

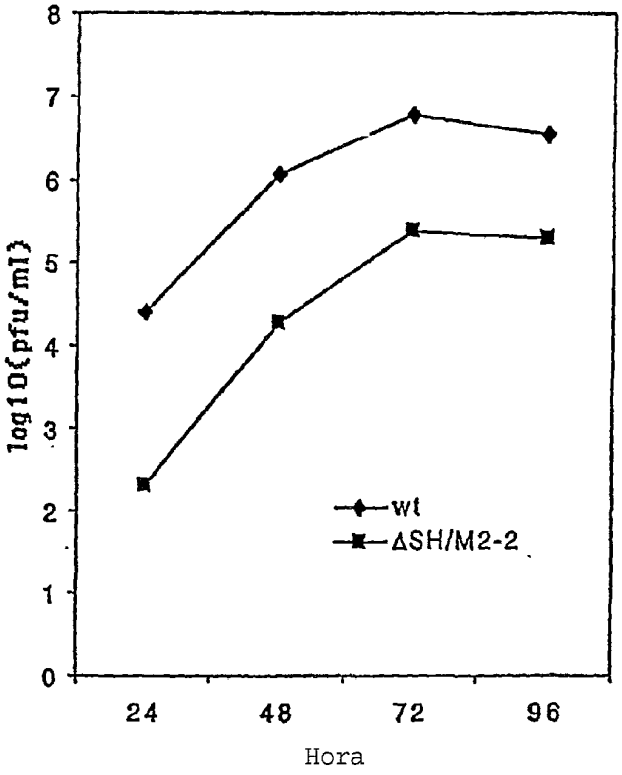


FIG. 22

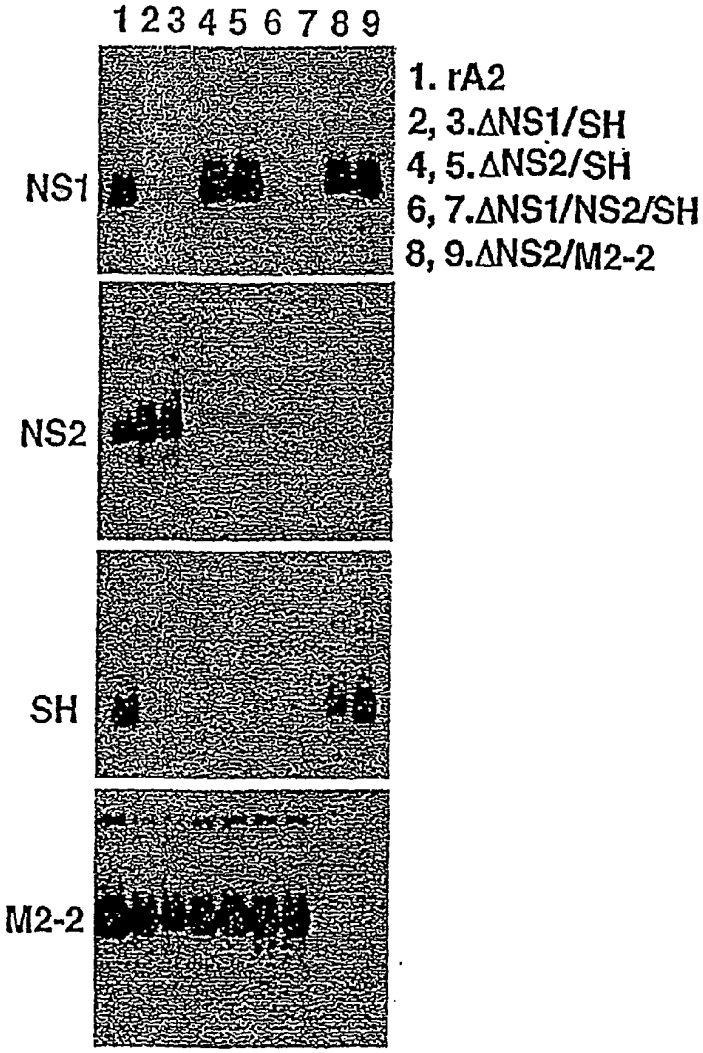

1 2 3 4 5 6 7 8 9
NS1
NS2
SH
M2-2
1. rA2
2, 3.ΔNS1/SH
4, 5.ΔNS2/SH
6, 7.ΔNS1/NS2/SH
8, 9.ΔNS2/M2-2

FIG. 23

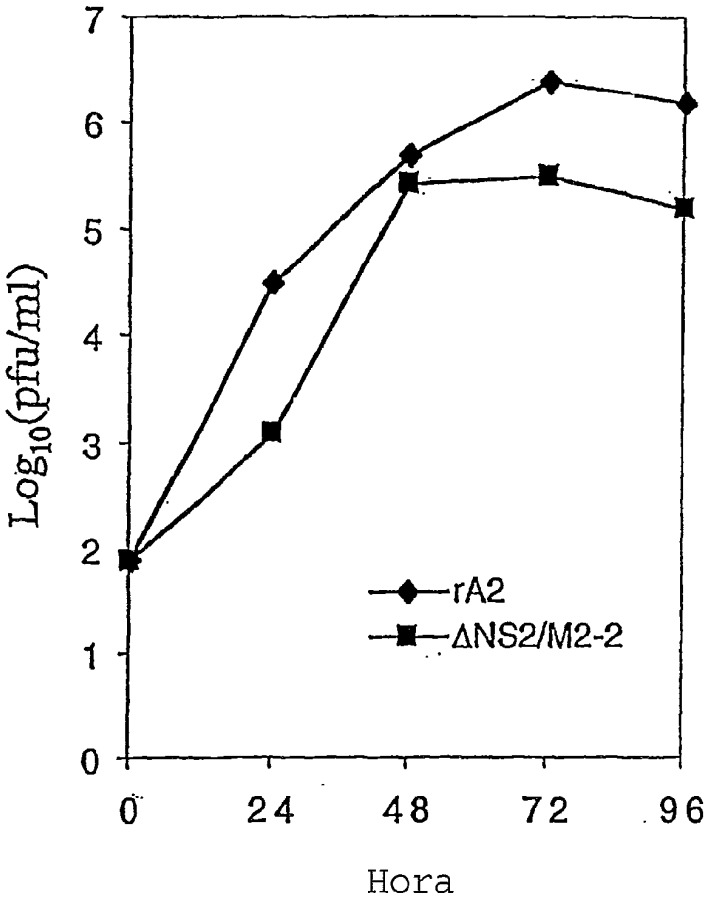


FIG. 24

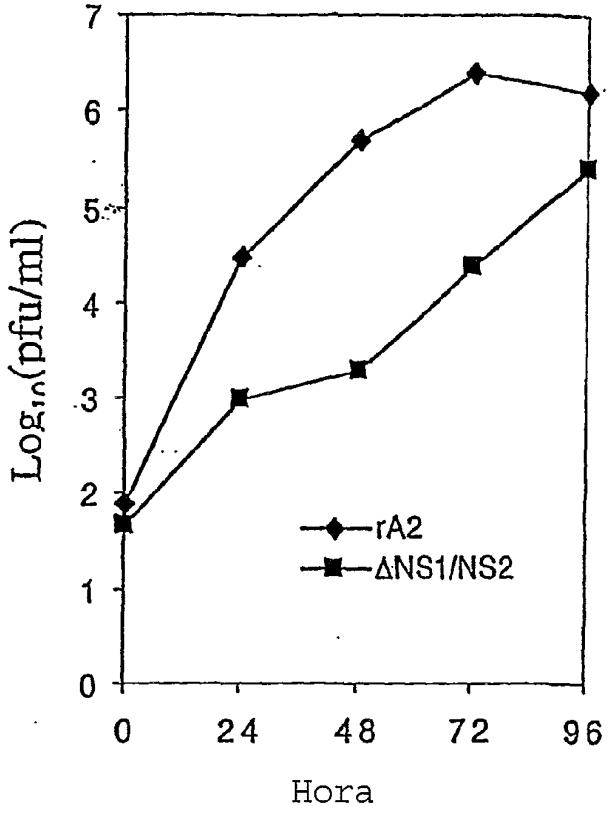


FIG. 25

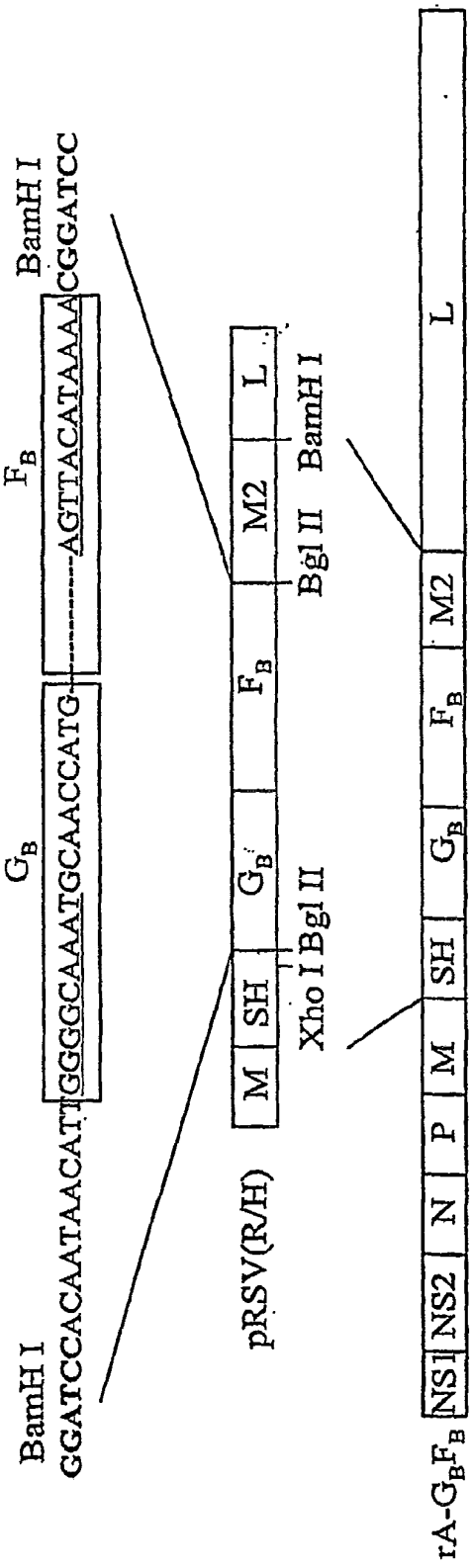

BamH I
GGATCCACAATAACAT
G_B
GGGGCAAATGCAACCATG
F_B
AGTTACATAAAA
BamH I
CGGATCC
pRSV(R/H)
M
SH
G_B
F_B
M2
L
Xho I Bgl II
Bgl II BamH I
rA-G_BF_B
NS1
NS2
N
P
M
SH
G_B
F_B
M2
L

FIG. 26

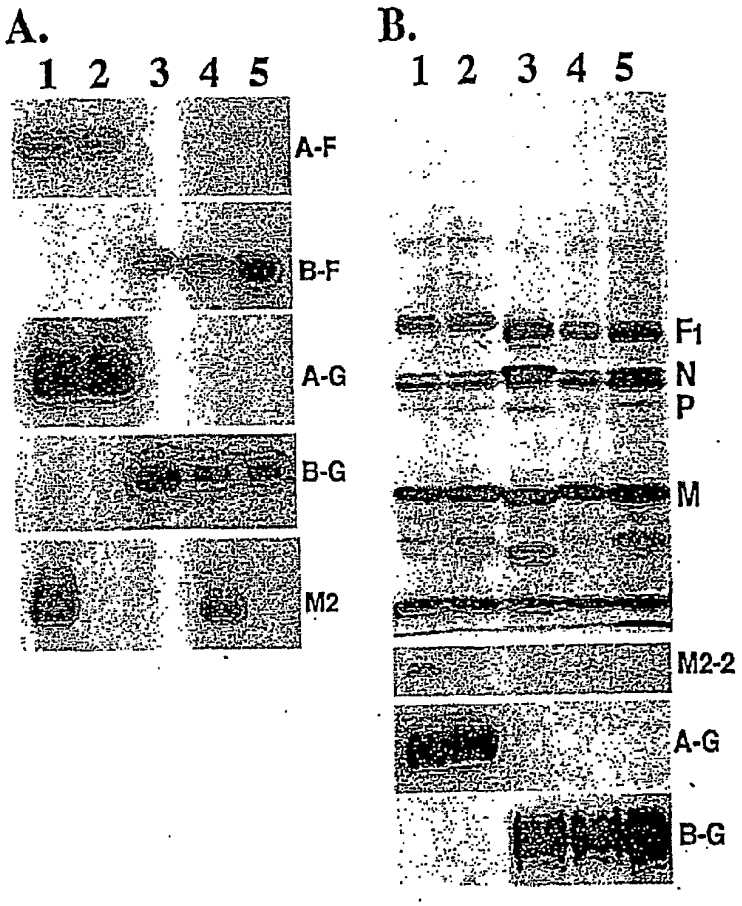


FIG. 27

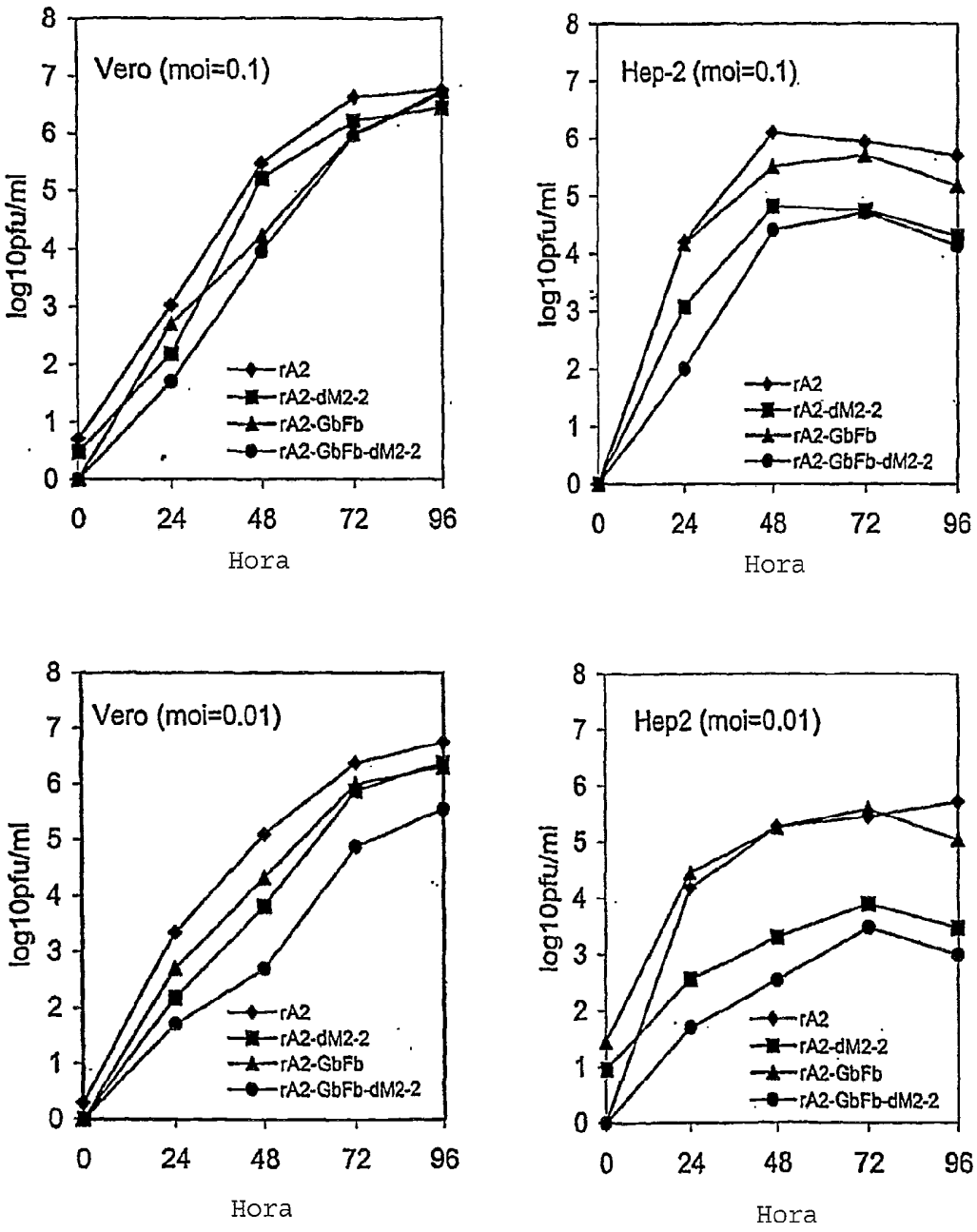

Vero (moi=0.1)
log10pfu/ml
Hora
rA2
rA2-dM2-2
rA2-GbFb
rA2-GbFb-dM2-2
Hep-2 (moi=0.1)
log10pfu/ml
Hora
rA2
rA2-dM2-2
rA2-GbFb
rA2-GbFb-dM2-2
Vero (moi=0.01)
log10pfu/ml
Hora
rA2
rA2-dM2-2
rA2-GbFb
rA2-GbFb-dM2-2
Hep2 (moi=0.01)
log10pfu/ml
Hora
rA2
rA2-dM2-2
rA2-GbFb
rA2-GbFb-dM2-2

FIG. 28