

(22) Data de pedido: **1999.09.14**

(30) Prioridade(s): **1998.09.14 US 152845**

(43) Data de publicação do pedido: **2011.06.22**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.12.16**
042/2016

(73) Titular(es):

**THE MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF
NEW YORK UNIVERSITY
ONE GUSTAVE LEVY PLACE NEW YORK NY
10029-4574**

US

(72) Inventor(es):

**ADOLFO GARCIA-SASTRE
PETER PALESE**

US

US

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO
RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA**

PT

(54) Epígrafe: **SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE ARN DO VÍRUS RECOMBINANTE DA DOENÇA DE NEWCASTLE E VACINAS**

(57) Resumo:

ESTA INVENÇÃO REFERE-SE A VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE GENETICAMENTE MANIPULADOS E VETORES VIRAIIS QUE EXPRESSAM GENES HETERÓLOGOS OU GENES VIRAIIS MUTADOS DA DOENÇA DE NEWCASTLE OU UMA COMBINAÇÃO DE GENES VIRAIIS DERIVADOS DE DIFERENTES ESTIRPES DO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE. A INVENÇÃO REFERE-SE À CONSTRUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE MOLDES DE ARN VIRAL DE NDV RECOMBINANTE DE CADEIA NEGATIVA QUE PODEM SER UTILIZADOS COM ARN POLIMERASE DIRIGIDA A ARN, PARA EXPRESSAR PRODUTOS GÉNICOS HETERÓLOGOS EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS APROPRIADAS E/OU PARA RESGATAR O GENE HETERÓLOGO EM PARTÍCULAS DE VÍRUS. NUMA FORMA DE REALIZAÇÃO ESPECÍFICA DA INVENÇÃO, O PRODUTO GÉNICO HETERÓLOGO É UM PÉPTIDO OU PROTEÍNA DERIVADO DO GENOMA DE UM VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA. OS MOLDES DE ARN DA PRESENTE INVENÇÃO PODEM SER PREPARADOS POR TRANSCRIÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE ADN APROPRIADAS UTILIZANDO QUALQUER ARN POLIMERASE DIRIGIDA A ADN, TAIS COMO T7, T3, SP6 POLIMERASE DE BACTERIÓFAGO OU POLIMERASE I EUCARIÓTICA.

RESUMO

"SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE ARN DO VÍRUS RECOMBINANTE DA DOENÇA DE NEWCASTLE E VACINAS"

Esta invenção refere-se a vírus da doença de Newcastle geneticamente manipulados e vetores virais que expressam genes heterólogos ou genes virais mutados da doença de Newcastle ou uma combinação de genes virais derivados de diferentes estirpes do vírus da doença de Newcastle. A invenção refere-se à construção e utilização de moldes de ARN viral de NDV recombinante de cadeia negativa que podem ser utilizados com ARN polimerase dirigida a ARN, para expressar produtos génicos heterólogos em células hospedeiras apropriadas e/ou para resgatar o gene heterólogo em partículas de vírus. Numa forma de realização específica da invenção, o produto génico heterólogo é um péptido ou proteína derivado do genoma de um vírus da imunodeficiência humana. Os moldes de ARN da presente invenção podem ser preparados por transcrição de sequências de ADN apropriadas utilizando qualquer ARN polimerase dirigida a ADN, tais como T7, T3, SP6 polimerase de bacteriófago ou polimerase I eucariótica.

DESCRIÇÃO

"SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE ARN DO VÍRUS RECOMBINANTE DA DOENÇA DE NEWCASTLE E VACINAS"

1. INTRODUÇÃO

A presente invenção refere-se a moldes de ARN do vírus recombinante da doença de Newcastle que podem ser utilizados para expressar produtos génicos heterólogos em sistemas apropriados de células hospedeiras e/ou para construir vírus recombinantes que expressam, empacotam e/ou apresentam o produto génico heterólogo. Os produtos de expressão e vírus quiméricos podem ser, de um modo vantajoso, utilizados em formulações de vacinas. A presente invenção refere-se, também, a vírus recombinantes da doença de Newcastle, geneticamente manipulados, os quais contêm modificações e/ou mutações que tornam o vírus recombinante adequado para utilização em formulações de vacina, tais como um fenótipo atenuado ou imunogenicidade melhorada.

A presente invenção refere-se a vírus recombinantes da doença de Newcastle que induzem vias de interferão e relacionadas. A presente invenção refere-se à utilização dos vírus recombinantes da doença de Newcastle e vetores virais contra uma ampla gama de patogénios e/ou antigénios, incluindo antigénios específicos de tumor. A invenção é demonstrada por meio de exemplos, nos quais foram construídos moldes de ARN do vírus recombinante da doença de Newcastle contendo sequências codificantes génicas heterólogas na polaridade negativa. A

invenção refere-se, ainda, à construção de moldes de ARN do vírus recombinante da doença de Newcastle contendo sequências codificantes génicas heterólogas na polaridade positiva. Tais sequências génicas heterólogas incluem sequências derivadas de um vírus da imunodeficiência humana (HIV).

2. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Vários vírus de ADN foram geneticamente manipulados para dirigir a expressão de proteínas heterólogas em sistemas de células hospedeiras (e. g., vírus vaccinia, baculovírus, etc.). Recentemente, foram realizados avanços semelhantes com vírus de ARN de cadeia positiva (e. g., poliovírus). Pensa-se que os produtos de expressão destas construções, *i. e.*, o produto génico heterólogo ou o vírus quimérico que expressa o produto génico heterólogo, sejam potencialmente úteis em formulações de vacinas (vacinas subunitárias ou de vírus completo). Uma desvantagem da utilização de vírus, tal como vaccinia, para construção de vírus recombinantes ou quiméricos para utilização em vacinas é a ausência de variação nos seus epitopos principais. Esta ausência de variabilidade nas estirpes virais coloca limitações estritas na utilização repetida de vaccinia quimérico, na medida em que múltiplas vacinações irão gerar resistência do hospedeiro à estirpe, de modo que o vírus inoculado não pode infetar o hospedeiro. A inoculação de um indivíduo resistente com vaccinia quimérico não irá, assim, induzir estimulação imunitária.

Em contraste, os vírus de ARN de cadeia negativa, seriam candidatos atrativos para a construção de vírus quiméricos para utilização em vacinas. O vírus de ARN de cadeia negativa, influenza, por exemplo, é desejável, devido à sua ampla

variabilidade genética permitir a construção de um vasto repertório de formulações de vacinas que estimulam a imunidade, sem o risco de desenvolvimento de uma tolerância. Recentemente, a construção de partículas infecciosas de ARN de cadeia negativa, recombinantes ou quiméricas, foi alcançada com o vírus influenza (Patente U.S N° 5166057 de Palese *et al.*).

2.1. O VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE

As famílias de vírus contendo ARN de cadeia simples com envelope do genoma de sentido negativo são classificadas em grupos tendo genomas não segmentados (*Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*) ou aquelas tendo genomas segmentados (*Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae* e *Arenaviridae*). A família *Paramyxoviridae*, descrita em detalhe abaixo e utilizada nos presentes exemplos, contém os vírus da doença de Newcastle (NDV), vírus parainfluenza, vírus Sendai, vírus símio 5 e vírus da papeira.

O Vírus da doença de Newcastle, é um vírus com envelope contendo um genoma de ARN de sentido negativo, de cadeia simples, não segmentado. O ARN genómico contém genes na ordem de 3'-NP-P-M-F-HN-L, descrita de modo mais detalhado abaixo. O ARN genómico contém, também, uma sequência líder na extremidade 3'.

Os elementos estruturais do virião incluem o envelope do vírus que é uma bicamada lipídica derivada da membrana plasmática celular. A glicoproteína, hemaglutinina-neuraminidase (HN), projeta-se para fora do envelope, permitindo que o vírus contenha as atividades de hemaglutinina e neuraminidase. A glicoproteína de fusão (F) que também interage com a membrana

viral é primeiro produzida como um precursor inativo, depois clivada pós-traducionalmente, de modo a produzir dois polipéptidos ligados por dissulfureto. A proteína F ativa está envolvida na penetração de NDV dentro de células hospedeiras, facilitando a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira. A proteína de matriz (M) está envolvida com a montagem viral e interage com a membrana viral, assim como com as proteínas da nucleocápside.

A principal subunidade de proteína da nucleocápside é a proteína de nucleocápside (NP), a qual confere simetria helicoidal na cápside. Em associação com a nucleocápside, estão as proteínas P e L. Pensa-se que a fosfoproteína (P), a qual é submetida a fosforilação, desempenha um papel regulador na transcrição e pode estar, também, envolvida em metilação, fosforilação e poliadenilação. O gene L, que codifica uma ARN polimerase dependente de ARN, é requerido para síntese de ARN viral, juntamente com a proteína P. A proteína L, a qual absorve quase metade da capacidade codificante do genoma viral, é a maior das proteínas virais e desempenha um papel importante, na transcrição e na replicação.

A replicação de todos os vírus de ARN de cadeia negativa, incluindo NDV, é complicada pela ausência de maquinaria celular requerida para replicar ARN. Adicionalmente, o genoma de cadeia negativa não pode ser diretamente traduzido em proteína, mas deve primeiro ser transcrito numa cópia de cadeia positiva (ARNm). Por conseguinte, após entrada numa célula hospedeira, o ARN genómico por si só, não pode sintetizar a ARN polimerase dependente de ARN requerida. As proteínas L, P e NP devem entrar na célula, juntamente com o genoma aquando de infeção.

Admite-se a hipótese de que a maior parte ou a totalidade das proteínas virais que transcrevem ARNm de NDV possam, também, efetuar a sua replicação. O mecanismo que regula as utilizações alternativas (*i. e.*, transcrição ou replicação) do mesmo complemento de proteínas não foi claramente identificado mas parece envolver a abundância de formas livres de uma ou mais proteínas da nucleocápside, em particular, a NP. Diretamente após a penetração do vírus, a transcrição é iniciada pela proteína L, utilizando o ARN de sentido negativo na nucleocápside como um molde. A síntese de ARN viral é regulada de modo que produza ARNm monocistrônicos durante a transcrição.

Após a transcrição, a replicação do genoma do vírus é o segundo evento essencial em infecção por vírus de ARN de cadeia negativa. Como com outros vírus de ARN de cadeia negativa, a replicação do genoma do vírus em vírus da doença de Newcastle (NDV) é mediada por proteínas especificadas por vírus. Os primeiros produtos de síntese de ARN replicativo são cópias complementares (*i. e.*, polaridade-mais) de ARN de genoma de NDV (ARNc). Estas cópias de cadeia-mais (antigenomas) diferem dos transcritos de ARNm de cadeia-mais na estrutura das suas extremidades. Ao contrário dos transcritos de ARNm, os ARNc antigenômicos não estão protegidos e metilados nas extremidades 5' e não estão truncados e poliadenilados nas extremidades 3'. Os ARNc são co-terminais com os seus moldes de cadeia negativa e contêm toda a informação genética em cada segmento de ARN genômico na forma complementar. Os ARNc servem como moldes para a síntese de genomas virais de cadeia negativa de NDV (ARNv).

Os genomas de cadeia negativa de NDV (ARNv) e os antígenomas (ARNc) são encapsulados por proteínas de nucleocápside; as únicas espécies de ARN não encapsuladas de ARN são ARNm de vírus. Quanto ao NDV, o citoplasma é o sítio de replicação de ARN do vírus, tal como é o sítio para transcrição. O agrupamento dos componentes virais parece realizar-se na membrana plasmática da célula hospedeira e é libertado vírus maduro por gemulação.

2.2. MANIPULAÇÃO DE VÍRUS DE ARN DE CADEIA NEGATIVA

As ARN polimerases dirigidas a ARN de vírus de animais têm sido extensivamente estudadas em relação a muitos aspetos de estrutura de proteína e condições de reação. Contudo, os elementos do ARN molde que promovem a expressão ótima pela polimerase podiam ser apenas estudados por inferência, utilizando sequências de ARN viral existentes. Esta análise de promotor é de interesse, dado que se desconhece como uma polimerase viral reconhece ARN virais específicos, de entre os muitos ARN codificados por hospedeiro verificados numa célula infetada.

Os vírus de animais contendo ARN genómico de sentido-mais podem ser replicados quando o ARN derivado de plasmídeo é introduzido em células por transfecção (por exemplo, Racaniello *et al.*, 1981, *Science* 214:916-919; Levis, *et al.*, 1986, *Cell* 44: 137-145). No caso de poliovírus, a polimerase purificada irá replicar um ARN de genoma em reações *in vitro* e, quando esta preparação de ARN de sentido-positivo é transfectada para dentro de células é infecciosa (Kaplan, *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8424-8428). Contudo, os elementos molde que servem como promotor de transcrição para a polimerase codificada

por poliovírus são desconhecidos, uma vez que até homopolímeros de ARN podem ser copiados (Ward, et al., 1988, *J. Virol.* 62: 558-562). Os transcritos de SP6 foram também utilizados para produzir ARN de interferência (DI) defeituosos modelo para o genoma viral Sindbis. Quando o ARN é introduzido em células infectadas, é replicado e empacotado. Demonstrou-se que as sequências de ARN que eram responsáveis pelo reconhecimento pela polimerase viral Sindbis e pelo empacotamento do genoma dentro de partículas de vírus estavam dentro de 162 nucleótidos (nt) da extremidade 5' e 19 nt da extremidade 3' do genoma (Levis, et al., 1986, *Cell* 44: 137-145). No caso do vírus do mosaico de bromo (BMV), um vírus de planta de cadeia positiva, foram utilizados transcritos SP6 para identificar o promotor como uma extremidade 3' semelhante a ARNt de 134 nt (Dreher e Hall, 1988, *J. Mol. Biol.* 201: 31-40). Verificou-se que o reconhecimento e síntese de polimerase era dependente da sequência e das características estruturais secundárias (Dreher, et al., 1984, *Nature* 311: 171-175).

Os vírus de ARN de sentido-negativo têm sido refratários ao estudo dos requisitos de sequência da replicase. A polimerase purificada do vírus da estomatite vesicular é apenas ativa na transcrição quando são incluídos como molde complexos ribonucleoproteicos derivados de vírus (RNP) (De e Banerjee, 1985, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126: 40-49; Emerson e Yu, 1975, *J. Virol.* 15: 1348-1356; Naito e Ishihama, 1976, *J. Biol. Chem.* 251: 4307-4314). No que se refere ao vírus influenza, foi referido que ARN simples purificado a partir de vírus foi utilizado para reconstituir RNP. As proteínas de nucleocápside e polimerase virais foram purificadas em gel e renaturadas no ARN viral utilizando tioredoxina (Szewczyk, et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 7907-7911). Contudo, estes autores não

mostraram que a atividade da preparação era específica para ARN viral de influenza, nem analisaram os sinais que promovem a transcrição.

Foi apenas recentemente possível recuperar vírus de ARN de cadeia negativa utilizando uma abordagem de genética inversa recombinante (Patente U.S. Nº 5166057 de Palese *et al.*). Embora este método fosse originalmente aplicado para manipular genomas de vírus influenza (Luytjes *et al.* 1989, *Cell* 59: 1107-1113; Enami *et al.* 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11563-11567), foi aplicado com êxito a uma ampla variedade de vírus de ARN de cadeia negativa, segmentados e não segmentados, incluindo raiva (Schnell *et al.* 1994, *EMBO J.* 13:4195-4203); 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 Cells* 1:569-579). Contudo, esta abordagem continua por aplicar a genoma de ARN do vírus da doença de Newcastle.

3. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é como definida pelas reivindicações.

São descritos moldes de ARN viral recombinante da doença de Newcastle que podem ser utilizados com ARN polimerase dirigida a ARN, de modo a expressar produtos gênicos heterólogos em células hospedeiras apropriadas e/ou para resgatar o gene heterólogo em partículas virais. Numa forma de realização, a invenção refere-se a vírus recombinantes da doença de Newcastle que induzem vias de interferão e relacionadas. A presente invenção refere-se a vírus recombinantes da doença de Newcastle que contêm modificações que

resultam em fenótipos que tornam o vírus recombinante mais adequado para utilização em formulações de vacinas, e. g., fenótipos atenuados e imunogenicidade melhorada. Noutra forma de realização, a presente invenção refere-se à manipulação de vírus recombinantes da doença de Newcastle e vetores virais que contêm genes heterólogos, incluindo genes de outros vírus, patogénios, genes celulares, antigénios tumorais, etc.

Noutra forma de realização, a presente invenção refere-se à manipulação de vírus recombinantes da doença de Newcastle e vetores virais para a utilização como vacinas. A presente invenção refere-se a formulações de vacinas adequadas para administração a humanos, assim como utilizações veterinárias. As vacinas da presente invenção podem ser concebidas para administração a animais domésticos, incluindo gatos e cães; animais selvagens, incluindo raposas e guaxinins; gado e aves, incluindo cavalos, gado vacum, ovelhas, perus e galinhas.

Ainda noutra forma de realização, a invenção refere-se a vetores virais recombinantes da doença de Newcastle e vírus que são manipulados para codificar genes virais mutantes da doença de Newcastle ou para codificar combinações de genes a partir de diferentes estirpes de vírus da doença de Newcastle. Os moldes de ARN da presente são preparados por transcrição de sequências de ADN apropriadas com ARN polimerase dirigida a ADN. Os moldes de ARN resultantes são de polaridade negativa e contêm sequências terminais apropriadas que possibilitam que o aparelho de síntese de ARN viral reconheça o molde. Em alternativa, os moldes de ARN de polaridade positiva que contêm sequências terminais apropriadas que possibilitam que o aparelho de síntese de ARN viral reconheça o molde podem ser também utilizados. A expressão a partir de moldes de ARN de polaridade positiva pode ser

alcançada por transfecção de plasmídeos tendo promotores que são reconhecidos pela ARN polimerase dependente de ADN. Por exemplo, ADN plasmídico codificando moldes de ARN positivo sob o controlo de um promotor T7 pode ser utilizado em combinação com o sistema T7 de vírus vaccinia.

Podem ser construídos ARNm bicistrónicos de modo a permitir a iniciação interna de tradução de sequências virais e permitir a expressão de sequências codificantes proteicas estranhas a partir do sítio de iniciação terminal regular, ou vice-versa. Em alternativa, uma proteína estranha pode ser expressa a partir de unidade transcricional interna, na qual a unidade transcricional tem um sítio de iniciação e sítio de poliadenilação. Noutra forma de realização, o gene estranho é inserido dentro de um gene de NDV, de modo a que a proteína expressa resultante seja uma proteína de fusão.

Os moldes de ARN viral recombinante mutante da doença de Newcastle da presente invenção podem ser utilizados para transfectar linhas celulares transformadas que expressam a ARN polimerase dependente de ARN e permitir a complementação. Em alternativa, um plasmídeo expressando a partir de um promotor apropriado, pode ser utilizado para transfecção de ARN específica de vírus (quimérica). A complementação pode ser também alcançada com a utilização de um vírus auxiliar que proporcione a ARN polimerase dependente de ARN. Adicionalmente, um sistema de replicação não dependente de vírus para o vírus da doença de Newcastle é também descrito. O subconjunto mínimo de proteínas do vírus da doença de Newcastle necessário para replicação e expressão específicas do vírus são as três proteínas, L, P e NP, que podem ser expressas a partir de plasmídeos por um sistema T7 de vírus vaccinia. Ainda noutra forma de realização, quando

plasmídeos codificando a cópia antígenómica do genoma de NDV são utilizados para proporcionar o genoma viral, o subconjunto mínimo de proteínas do vírus da doença de Newcastle necessário para replicação e expressão específicas do vírus são as proteínas L e P. Quando a cópia antígenómica do genoma de NDV é transcrita, a proteína polimerase NP é a primeira proteína transcrita, deste modo não é necessário proporcionar adicionalmente a polimerase NP *in trans*.

Os produtos de expressão e/ou viriões quiméricos obtidos podem ser, de um modo vantajoso, utilizados em formulações de vacinas. Os produtos de expressão e viriões quiméricos da presente invenção podem ser manipulados para produzir vacinas contra uma ampla gama de patogénios, incluindo antigénios virais, antigénios tumorais e autoantigénios envolvidos em distúrbios autoimunes. Em particular, os viriões quiméricos da presente invenção podem ser manipulados para produzir vacinas anti-HIV, em que um polipéptido imunogénico de gp160 e/ou de proteínas internas de HIV é manipulado dentro da proteína glicoproteína HN, de modo a construir uma vacina que seja capaz de desencadear respostas imunitárias humorais e mediadas por células de vertebrados. A utilização de vírus recombinante da doença de Newcastle para este efeito é especialmente atrativa, dado que o vírus da doença de Newcastle não é patogénico em humanos. A utilização de vírus recombinante da doença de Newcastle para distribuição de antigénios tumorais é particularmente atrativa, dadas as propriedades antineoplásicas e imunopotenciadoras conhecidas do vírus.

3.1. DEFINIÇÕES

Como aqui utilizado, os seguintes termos terão os significados indicados:

ARNc =	ARN antigenómico
HIV =	vírus da imunodeficiência humana
L =	proteína grande
M =	proteína de matriz (linhas dentro de envelope)
MDCK =	células renais caninas Madin Darby
MDBK =	células renais bovinas Madin Darby
moi =	multiplicidade de infeção
NA =	neuraminidase (glicoproteína de envelope)
NDV =	Vírus da Doença de Newcastle
NP =	nucleoproteína (associada a ARN e requerida para atividade de polimerase)
NS =	proteína não estrutural (função desconhecida)
nt =	nucleótido
PA, PB1, PB2 =	componentes de ARN polimerase dirigida a ARN
RNP =	ribonucleoproteína
rRNP =	RNP recombinante
ARNv =	ARN de vírus genómico
WSN =	vírus influenza A/WSN/33
vírus WSN-HK:	vírus de reordenamento contendo sete genes do vírus WSN e o gene NA do vírus influenza A/HK/8/68

4. DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIG. 1. Representação esquemática do minigenoma de NDV. A ilustração de topo representa o plasmídeo PNDVCAT incluindo o promotor T7; a sequência 5' terminal (extremidade 5' de ARN genômico, 191 nt); o nucleótido inserido (CTTAA); 667 nt da ORF CAT; a sequência 3' terminal (extremidade 3' de ARN genômico, 121 nt) o Bbs1 e sítios de nuclease. A ilustração inferior representa o ARN quimérico NDV-CAT resultando de transcrição *in vitro*. Como um resultado da amplificação baseada em NDV e transcrição do minigenoma quimérico NDV-CAT, a atividade CAT é detetada nas células transfectadas.

FIG. 2A-C. Representação esquemática dos vetores de expressão PTMI.

PTM1-NP codifica a proteína NP de NDV.

PTM1-P codifica a proteína P de NDV.

PTM1-L codifica a proteína L de NDV.

FIG. 3. Sequência de ARN de regiões terminais não codificantes 5' e 3' de NDV (sentido positivo). As sequências 5' em relação ao gene CAT representam 121 nt da região terminal não codificante 5' de genoma de sentido positivo de NDV, compreendendo 65 nt da sequência líder (em negrito), seguidos de 56 nt da UTR do gene NP. As sequências 3' em relação ao gene CAT representam os nucleótidos inseridos cuuaa (em letra minúscula) e 191 nt da região terminal não codificante de genoma de sentido positivo de NDV, compreendendo 127 nt da UTR do gene L, seguidos de 64 nt da região atrelado (a negrito).

FIG. 4A-B. Representação esquemática de uma estrutura de clones recombinantes de NDV. FIG 4B. Representação de NDV

infeccioso expressando Env e Gag de HIV. Painel de topo, Env e Gag de HIV estão entre os genes M e L. Painel inferior, Env e Gag de HIV estão 3' em relação ao gene NP.

FIG. 5. Representação esquemática das extremidades 3' e 5' de NDV como alinhadas com a sequência de Kurilla *et al.* 1985 *Virology* 145:203-212 (extremidade 3') e Yusoff *et al.* 1987 *Nucleic Acids Research* 15:3961-3976 (extremidade 5').

FIG. 6. Método de genética inversa, baseado em plasmídeo, para expressão baseada em NDV de um gene estranho. As células são infectadas com um vírus vaccinia recombinante expressando a T7 polimerase. Além disso, as células são transfectadas com 1) ADN plasmídicos codificando as proteínas L, NP e P de NDV, sob o controlo transcricional de um promotor T7 (pTM1-L, pTM1-NP e pTM1-P, respetivamente) e 2) um ADN plasmídico codificando um minigenoma quimérico NDV-CAT, sob o controlo transcricional de um promotor T7 (pT7-NDV-CAT-RB). A extremidade 3' apropriada do minigenoma NDV-CAT é alcançada confiando na clivagem facilitada por meio de uma sequência de ribozima (RB). A amplificação e transcrição do minigenoma quimérico NDV-CAT resultam em atividade CAT detetável nas células transfectadas. As regiões não codificantes nas extremidades 3' e 5' do minigenoma NDV-CAT são representadas como caixas pretas.

FIG. 7. Resgate de NDV de sintético. As células são infectadas com um vírus vaccinia recombinante expressando a T7 polimerase. Além disso, as células são transfectadas com 1) ADN plasmídicos codificando as proteínas L, NP e P de NDV, sob o controlo transcricional de um promotor T7 (pTM1-L, pTM1-NP e pTM1-P, respetivamente) e 2) um ADN plasmídico codificando o minigenoma de NDV, sob o controlo transcricional de um

promotor T7 (pT7-NDV+-RB). A extremidade 3' apropriada do minigenoma de NDV é alcançada confiando na clivagem facilitada por meio de uma sequência de ribozima (RB). A amplificação e transcrição do antígenoma de NDV resultam no resgate de vírus NDV infecciosos. As regiões não codificantes nas extremidades 3' e 5' do antígenoma de NDV são representadas como caixas pretas.

FIG. 8. Expressão baseada em NDV de um gene estranho inserido como uma unidade transcricional interna dentro do antígenoma de NDV. As células são infectadas com um vírus vaccinia recombinante expressando a T7 polimerase. Além disso, as células são transfectadas com 1) ADN plasmídicos codificando as proteínas L, NP e P de NDV, sob o controle transcricional de um promotor T7 (pTM1-L, pTM1-NP e pTM1-P, respectivamente) e 2) um ADN plasmídico codificando um antígenoma quimérico NDV-CAT, sob o controle transcricional de um promotor T7 (pT7-NDV-CAT-RB). No antígenoma quimérico NDV-CAT, a fase de leitura aberta CAT substitui a fase de leitura aberta HN de ocorrência natural do antígenoma de NDV de tipo selvagem. A extremidade 3' apropriada do antígenoma quimérico NDV-CAT é alcançada confiando na clivagem facilitada por meio de uma sequência de ribozima (RB). A amplificação e transcrição do antígenoma quimérico NDV-CAT resultam em atividade CAT detetável nas células transfectadas. As regiões não codificantes nas extremidades 3' e 5' do antígenoma quimérico NDV-CAT são representadas como caixas pretas.

5. DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se a vírus da doença de Newcastle geneticamente manipulados e vetores virais que expressam genes

heterólogos ou genes virais mutados da doença de Newcastle ou uma combinação de genes virais derivados de diferentes estirpes do vírus da doença de Newcastle. A invenção refere-se à construção e utilização de moldes de ARN viral de NDV recombinante de cadeia negativa que podem ser utilizados com ARN polimerase dirigida a ARN, de modo a expressar produtos génicos heterólogos em células hospedeiras apropriadas e/ou para resgatar o gene heterólogo em partículas de vírus. Numa forma de realização específica da invenção, o produto génico heterólogo é um péptido ou proteína derivado do genoma de um vírus da imunodeficiência humana. Os moldes de ARN da presente invenção podem ser preparados *in vitro* ou *in vivo* por transcrição de sequências de ADN apropriadas utilizando uma ARN polimerase dirigida a ADN, tais como T7, T3, a SP6 polimerase de bacteriófago ou uma polimerase eucariótica, tal como polimerase I.

Os moldes de ARN recombinante podem ser utilizados para transfectar linhas celulares contínuas/transfectadas que expressam proteínas de ARN polimerase dirigidas a ARN, permitindo a complementação, como demonstrado por meio de exemplos de trabalho, nos quais transcritos de ARN de ADN clonado contendo a região codificante - em orientação de sentido negativo - do gene da cloranfenicol acetiltransferase (CAT), flanqueada pelos nucleótidos 5' terminais e 3' terminais do ARN de NDV-CL (estirpe Califórnia 11914/estirpe semelhante a 1944) (Meindl *et al.*, 1974 *Virology* 58: 457-463) foram transfectados em células expressando as proteínas polimerases de NDV. Numa forma de realização preferida, é utilizado um sistema de replicação não dependente de vírus para recuperar NDV quimérico, no qual ADN plasmídico codificando o genoma ou antígenoma de NDV é co-expresso com ADN plasmídico codificando o subconjunto mínimo

de proteínas do vírus da doença de Newcastle necessário para replicação e expressão específicas do vírus, como demonstrado por meio de exemplo de trabalho como descrito *infra*.

A capacidade de reconstituir NDV *in vivo* permite a concepção de novos vírus quiméricos NDV que expressam genes estranhos ou que expressam genes de NDV mutantes. A capacidade de reconstituir NDV *in vivo* permite também a concepção de novos NDV quiméricos que expressam genes de diferentes estirpes de NDV. Uma forma de alcançar este objetivo envolve a modificação de genes de NDV existentes. Por exemplo, o gene HN pode ser modificado para conter sequências estranhas nos seus domínios externos. Se a sequência heteróloga for epitopos ou antigénios de patogénios, estes vírus quiméricos podem ser utilizados para induzir uma resposta imunitária protetora contra o agente de doença a partir do qual estes determinantes são derivados.

De acordo com a presente invenção, é construído um ARN quimérico, no qual uma sequência codificante derivada da região codificante gp160 do vírus da imunodeficiência humana é inserida dentro da sequência codificante HN de NDV e vírus quimérico produzido a partir de transfecção deste segmento de ARN quimérico para dentro de uma célula hospedeira infetada com NDV de tipo selvagem. Além disso, um tal vírus quimérico deve ser capaz de desencadear uma resposta imunitária humoral e mediada por células de vertebrado. A presente invenção refere-se, além disso, à indução de vias de interferão e relacionadas por vírus recombinantes ou quiméricos NDV.

A presente invenção refere-se à utilização de vetores virais e vírus quiméricos da invenção para formular vacinas contra uma ampla gama de vírus e/ou antigénios, incluindo

antigénios tumorais. Os vetores virais e vírus quiméricos da presente invenção podem ser utilizados para modular o sistema imunitário de um indivíduo por estimulação de uma resposta imunitária humoral, uma resposta imunitária celular ou por estimulação de tolerância a um antigénio. Como aqui utilizado, um indivíduo significa: humanos, primatas, cavalos, vacas, ovelhas, porcos, cabras, cães, gatos, espécies aviárias e roedores. Aquando da distribuição de antigénios tumorais, a invenção pode ser utilizada para tratar indivíduos tendo doença passível de rejeição mediada por imunidade, tais como tumores não sólidos ou tumores sólidos de dimensão reduzida. Está também contemplado, que a distribuição de antigénios tumorais pelos vetores virais e vírus quiméricos aqui descritos, será útil para tratamento subsequente à remoção de tumores sólidos de grandes dimensões. A invenção pode ser também utilizada para tratar indivíduos que são suspeitos de terem cancro.

A invenção pode ser dividida nas fases seguintes, apenas para efeitos de descrição e não a título limitativo: (a) construção de moldes de ARN recombinante; (b) expressão de produtos génicos heterólogos utilizando os moldes de ARN recombinante; e (c) resgate do gene heterólogo em partículas de vírus recombinantes. Para clareza de discussão, a invenção é descrita nos Exemplos de trabalho, utilizando NDV-CL (estirpe Califórnia 11914/estirpe semelhante a 1944), contudo qualquer estirpe de NDV pode ser utilizada.

5.1. CONSTRUÇÃO DOS MOLDES DE ARN RECOMBINANTE

Uma forma de realização específica da presente invenção é a identificação do Requerente da sequência nucleotídica correta

das extremidades 5' e 3' do ARN de genomas de sentido negativo de NDV. Como mostrado na Figura 5, a sequência nucleotídica das extremidades 5' e 3' do ARN de genoma de sentido negativo de NDV da presente invenção difere significativamente da sequência de extremidades 3' de NDV anteriormente divulgada. A identificação da sequência nucleotídica correta das extremidades 5' e 3' de NDV permite, pela primeira vez, a manipulação de moldes de ARN de NDV recombinante, a expressão dos moldes de ARN recombinante e o resgate de partículas de NDV recombinante. A presente invenção abrange não apenas as extremidades 5' e 3' possuindo a sequência nucleotídica, como mostrado na Figura 5, mas abrange também quaisquer modificações ou mutações na extremidade ou quaisquer seus fragmentos que ainda mantenham a função da extremidade de tipo selvagem, *i. e.*, os sinais necessários para o aparelho de síntese de ARN viral reconheça o molde.

As sequências codificantes de genes heterólogos flanqueadas pelo complemento do sítio de ligação de polimerase/promotor viral, *e. g.*, o complemento de extremidade 3' do vírus NDV da presente invenção ou os complementos das extremidades do vírus NDV 3' e 5', podem ser construídas utilizando técnicas conhecidas na técnica. Os moldes de ARN resultantes podem ser de polaridade negativa e conter sequências terminais apropriadas que permitem que o aparelho de síntese de ARN viral reconheça o molde. Em alternativa, os moldes de ARN de polaridade positiva que contêm sequências terminais apropriadas que permitem que o aparelho de síntese de ARN viral reconheça o molde podem ser também utilizados. As moléculas de ADN recombinante contendo estas sequências híbridas podem ser clonadas e transcritas por uma ARN polimerase dirigida a ADN, tal como T7, T3, a SP6 polimerase de bacteriófago ou polimerase eucariótica, tal como polimerase I e semelhantes, de modo a produzir, *in vitro* ou *in vivo*, os moldes

de ARN recombinante que possuem as sequências virais apropriadas que permitem o reconhecimento e atividade de polimerase viral.

Ainda noutra forma de realização, qualquer sequência heteróloga pode ser virtualmente construída dentro dos vírus quiméricos da presente invenção, incluindo mas não limitada a antigénios, tais como 1) antigénios que sejam característicos de um patogénio; 2) antigénios que sejam característicos de doença autoimune; 3) antigénios que sejam característicos de um alergénio; e 4) antigénios que sejam característicos de um tumor. Por exemplo, as sequências génicas heterólogas que podem ser manipuladas dentro dos vírus quiméricos da invenção incluem mas não estão limitadas a epitopos de vírus da imunodeficiência humana (HIV), tal como gp160; antigénio de superfície de vírus da hepatite B (HBsAg); as glicoproteínas de vírus de herpes (e. g., gD, gE); VP1 de poliovírus; e determinantes antigénicos de patogénios não virais, tais como bactérias e parasitas, para indicar apenas alguns.

Os antigénios que são característicos de doença autoimune, tipicamente, serão derivados da superfície celular, citoplasma, núcleo, mitocôndria e semelhantes de tecidos de mamífero, incluindo antigénios característicos de diabetes Mellitus, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatoide, anemia perniciosa, doença de Addison, esclerodermia, gastrite atrófica autoimune, diabetes juvenil e lúpus eritematoso discoide.

Os antigénios que são alergénios são, em geral, proteínas ou glicoproteínas, incluindo antigénios derivado de pólenes, pó, bolores, esporos, pelo, insetos e alimentos.

Os antigénios que são característicos de antigénios tumorais, tipicamente, serão derivados da superfície celular, citoplasma, núcleo, organelos e semelhantes de células de tecido tumoral. Os exemplos incluem antigénios característicos de proteínas tumorais, incluindo proteínas codificadas por oncogenes mutados; proteínas virais associadas a tumores; e glicoproteínas. Os tumores incluem mas não estão limitados àqueles derivados dos tipos de cancro: lábio, nasofaringe, faringe e cavidade oral, esófago, estômago, cólon, reto, fígado, vesícula biliar, pâncreas, laringe, pulmão e brônquio, melanoma de pele, mama, cérvix, uterino, ovário, bexiga, rim, útero, cérebro e outras partes do sistema nervoso, tireoide, próstata, testículos, doença de Hodgkin, linfoma de não Hodgkin, mieloma múltiplo e leucemia.

Numa forma de realização específica da invenção, as sequências heterólogas são derivadas do genoma do vírus da imunodeficiência humana (HIV), de um modo preferido, vírus 1 da imunodeficiência humana ou vírus 2 da imunodeficiência humana. Noutra forma de realização da invenção, as sequências codificantes heterólogas podem ser inseridas dentro de uma sequência codificante do gene de NDV, de modo que seja expresso um produto génico quimérico que contenha a sequência peptídica heteróloga dentro da proteína viral de NDV. Numa tal forma de realização da invenção, as sequências heterólogas podem ser também derivadas do genoma de um vírus da imunodeficiência humana (HIV), de um modo preferido, vírus 1 da imunodeficiência humana ou vírus 2 da imunodeficiência humana.

Nos casos em que as sequências heterólogas sejam derivadas de HIV, tais sequências podem incluir mas não estão limitadas a sequências derivadas do gene env (*i. e.*, sequências codificando a totalidade ou parte de gp160, gp120 e/ou gp41), o gene pol

(*i. e.*, sequências codificando a totalidade ou parte de transcriptase inversa, endonuclease, protease e/ou integrase), o gene gag (*i. e.*, sequências codificando a totalidade ou parte de p7, p6, p55, p17/18, p24/25) tat, rev, nef, vif, vpu, vpr e/ou vpx.

Ainda noutra forma de realização, as sequências génicas heterólogas que podem ser manipuladas dentro dos vírus quiméricos, incluem aquelas que codificam proteínas com atividades imunopotenciadoras. Os exemplos de proteínas imunopotenciadoras incluem, mas não estão limitados a citocinas, interferão tipo 1, interferão gama, fatores estimuladores de colónias, interleucina -1, -2, -4, -5, -6, -12.

Uma abordagem para a construção destas moléculas híbridas é inserir a sequência codificante heteróloga dentro de um complemento de ADN de um gene de NDV, de modo que a sequência heteróloga seja flanqueada pelas sequências virais requeridas para atividade de polimerase viral; *i. e.*, o sítio de ligação de polimerase/promotor viral, a seguir designado por sítio de ligação de polimerase viral, e um sítio de poliadenilação. Numa forma de realização preferida, a sequência codificante heteróloga é flanqueada pelas sequências virais que compreendem os promotores de replicação das extremidades 5' e 3', as sequências de iniciação génica e terminação génica e os sinais de empacotamento que se verificam nas extremidades 5' e/ou 3'. Numa abordagem alternativa, os oligonucleótidos codificando o sítio de ligação da polimerase viral, *e. g.*, o complemento da extremidade 3', ou ambas as extremidades dos segmentos genómicos do vírus, podem ser ligados à sequência codificante heteróloga, de modo a construir a molécula híbrida. A colocação de um gene estranho ou segmento de um gene estranho dentro de uma sequência

alvo era anteriormente ditada pela presença de sítios de restrição enzimática apropriados, dentro da sequência alvo. Contudo, avanços recentes na biologia molecular atenuaram grandemente este problema. Os sítios de restrição enzimática podem ser facilmente colocados dentro de uma sequência alvo através da utilização de mutagênese dirigida pontual (e. g., ver, por exemplo, as técnicas descritas por Kunkel, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82;488). Variações na tecnologia de reação de polimerização em cadeia (PCR), descritas *infra*, permitem também a inserção específica de sequências (*i. e.*, sítios de restrição enzimática) e permitem a fácil construção de moléculas híbridas. Em alternativa, as reações de PCR poderiam ser utilizadas para preparar moldes recombinantes, sem a necessidade de clonagem. Por exemplo, as reações de PCR poderiam ser utilizadas para preparar moléculas de ADN de cadeia dupla contendo um promotor de ARN polimerase dirigido a ADN (e. g., T3, T7 ou SP6 de bacteriófago) e a sequência híbrida contendo o gene heterólogo e o sítio de ligação de polimerase de NDV. Os moldes de ARN poderiam ser, depois, transcritos diretamente a partir deste ADN recombinante. Ainda noutra forma de realização, os moldes de ARN recombinante podem ser preparados por ligação de ARN especificando a polaridade negativa do gene heterólogo e o sítio de ligação de polimerase viral utilizando uma ARN ligase. Os requisitos de sequência para atividade de polimerase viral e construções que podem ser utilizadas de acordo com a invenção são descritos nas subsecções abaixo.

5.1.1. INSERÇÃO DA SEQUÊNCIA GÊNICA HETERÓLOGA DENTRO DOS GENES HN, P, NP, M, F, L

Os segmentos gênicos codificando para as proteínas HN, P, NP, M, F ou L podem ser utilizados para a inserção de produtos gênicos heterólogos. A inserção da sequência de um gene estranho dentro de qualquer um destes segmentos poderia ser realizada por uma substituição completa da região codificante viral com o gene estranho ou por uma substituição parcial. A substituição completa seria provavelmente melhor realizada através da utilização da mutagênese dirigida por PCR. Resumidamente, um iniciador A de PCR conteria, da extremidade 5' para 3': um sítio de restrição enzimática único, tal como um sítio de restrição enzimática de classe IIS (*i. e.*, uma enzima "desfasadora"; que reconhece uma sequência específica mas cliva o ADN a montante ou a jusante dessa sequência); um segmento de nucleótidos complementar a uma região do gene de NDV; e um segmento de nucleótidos complementar à parte codificante carboxi-terminal do produto gênico estranho. O iniciador B de PCR conteria, da extremidade 5' para 3': um sítio de restrição enzimática único; um segmento de nucleótidos complementar a um gene de NDV; e um segmento de nucleótidos correspondente à parte codificante 5' do gene estranho. Após uma reação de PCR utilizando estes iniciadores com uma cópia clonada do gene estranho, o produto pode ser excisado e clonado utilizando os sítios de restrição únicos. A digestão com enzima de classe IIS e transcrição com a polimerase de fago purificada iria produzir uma molécula de ARN contendo as extremidades não traduzidas exatas do gene de NDV com inserção de um gene estranho. Numa forma de realização alternativa, as reações iniciadas de PCR poderiam ser utilizadas para preparar ADN de cadeia dupla contendo a sequência promotora de bacteriófago e a

sequência gênica híbrida, de modo que os moldes de ARN possam ser diretamente transcritos, sem clonagem.

5.1.2. INSERÇÃO DA SEQUÊNCIA GÊNICA HETERÓLOGA DENTRO DO GENE HN

As atividades de hemaglutinina e neuraminidase de NDV são codificadas por um único gene, HN. A proteína HN é uma glicoproteína de superfície fundamental do vírus. Para uma variedade de vírus, tal como influenza, foi demonstrado que as proteínas hemaglutinina e neuraminidase contêm um determinado número de sítios antigénicos. Consequentemente, esta proteína é um potencial alvo para a resposta imunitária humoral após infeção. Por conseguinte, a substituição de sítios antigénicos dentro de HN com uma parte de uma proteína estranha pode proporcionar uma resposta humoral vigorosa contra o péptido estranho. Se uma sequência for inserida dentro da molécula HN e for expressa na superfície externa da HN seria imunogénica. Por exemplo, um péptido derivado de gp160 de HIV poderia substituir um sítio antigénico da proteína HN, resultando no desencadeamento de uma resposta imunitária humoral. Numa abordagem diferente, a sequência peptídica estranha pode ser inserida dentro do sítio antigénico, sem deletar quaisquer sequências virais. Os produtos de expressão de tais construções podem ser úteis em vacinas contra o antigénio estranho e podem, de facto, contornar um problema anteriormente discutido, aquele de propagação do vírus recombinante no hospedeiro vacinado. Uma molécula HN intacta com apenas uma substituição em sítios antigénicos pode permitir a função de HN e, deste modo, permitir a construção de um vírus viável. Por conseguinte, este vírus pode ser cultivado sem a necessidade de funções auxiliares

adicionais. O vírus pode ser também atenuado de outros modos, de modo a evitar qualquer perigo de fuga acidental.

Podem ser preparadas outras construções híbridas, de modo a expressar proteínas na superfície celular ou possibilitar que as mesmas sejam libertadas da célula. Como uma glicoproteína de superfície, a HN tem uma sequência sinal clivável amino-terminal, necessária para transportar para a superfície celular e uma sequência carboxi-terminal, necessária para ancoramento membranar. De modo a expressar uma proteína estranha intacta na superfície celular, pode ser necessário utilizar estes sinais de HN, de modo a produzir uma proteína híbrida. Neste caso, a proteína de fusão pode ser expressa como uma proteína de fusão separada a partir de um promotor interno adicional. Em alternativa, se apenas os sinais de transporte estiverem presentes e o domínio de ancoramento membranar estiver ausente, a proteína pode ser segregada para fora da célula.

5.1.3. CONSTRUÇÃO DE ARN BICISTRÓNICO E EXPRESSÃO PROTEICA HETERÓLOGA

O ARNm bicistrónico poderia ser construído de modo a permitir a iniciação interna de tradução de sequências virais e permitir a expressão de sequências codificantes proteicas estranhas a partir do sítio de iniciação terminal regular. Em alternativa, pode ser construída uma sequência de ARNm bicistrónica, em que a sequência viral é traduzida a partir da fase de leitura aberta terminal regular, enquanto a sequência estranha é iniciada a partir de um sítio interno. Podem ser utilizadas determinadas sequências de locais internos de entrada do ribossoma (IRES). As sequências IRES que são escolhidas devem

ser curtas o suficiente, de modo a não interferirem com as limitações de empacotamento do vírus da doença de Newcastle. Deste modo, prefere-se que a IRES escolhida para uma tal abordagem bicistrónica tenha não mais de 500 nucleótidos de comprimento, com menos de 250 nucleótidos sendo preferido. Além disso, prefere-se que a IRES utilizada não partilhe homologia de sequência ou estrutural com elementos picomavirais. Elementos IRES preferidos incluem, mas não estão limitados à IRES BiP de mamífero e à IRES do vírus da hepatite C.

Em alternativa, uma proteína estranha pode ser expressa a partir de uma nova unidade transcricional interna, na qual a unidade transcricional tem um sítio de iniciação e sítio de poliadenilação. Noutra forma de realização, o gene estranho é inserido dentro de um gene de NDV, de modo que a proteína expressa resultante seja uma proteína de fusão.

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

Os moldes recombinantes, preparados como descrito acima, podem ser utilizados numa variedade de modos para expressar os produtos génicos heterólogos em células hospedeiras apropriadas ou para produzir vírus quiméricos que expressam os produtos génicos heterólogos. Numa forma de realização, o molde recombinante pode ser utilizado para transfectar células hospedeiras apropriadas, pode dirigir a expressão do produto génico heterólogo em elevados níveis. Os sistemas de células hospedeiras que proporcionam elevados níveis de expressão incluem linhas celulares contínuas que proporcionam funções virais, tais como linhas celulares super-infetadas com NDV,

linhas celulares manipuladas para complementar funções de NDV, etc.

Numa forma de realização alternativa da invenção, os moldes recombinantes podem ser utilizados para transfectar linhas celulares que expressam uma proteína polimerase viral, de modo a se alcançar expressão do produto génico heterólogo. Para isto, linhas celulares transformadas que expressam uma proteína polimerase, tal como a proteína L, podem ser utilizadas como células hospedeiras apropriadas. As células hospedeiras podem ser analogamente manipuladas para proporcionar outras funções virais ou funções adicionais, tais como NP ou HN.

Noutra forma de realização, um vírus auxiliar pode proporcionar a proteína ARN polimerase utilizada pelas células, com de modo a se alcançar expressão do produto génico heterólogo.

Ainda noutra forma de realização, as células podem ser transfectadas com vetores codificando proteínas virais, tais como as proteínas NP, P e L. Exemplos de tais vetores estão ilustrados nas FIG 2A-2C.

5.3. PREPARAÇÃO DE VÍRUS QUIMÉRICO DE ARN DE CADEIA NEGATIVA

De modo a preparar vírus quimérico, ARN, ADNc ou ARN de vírus NDV modificado codificando para o genoma de NDV e/ou proteínas estranhas, no sentido positivo ou negativo, podem ser utilizados para transfectar células que proporcionam proteínas e funções virais requeridas para replicação e resgate ou são, também, infetadas com um vírus NDV "parental". Numa abordagem alternativa, plasmídeos codificando o ARN de NDV genómico ou

antigenómico, de tipo selvagem ou modificado, podem ser co-transfectados em células hospedeiras com plasmídeos codificando proteínas polimerases virais, e. g., NP, P ou L. Noutra forma de realização, plasmídeos codificando o ARN de NDV antigenómico podem ser co-transfectados com plasmídeos codificando proteínas P e L polimerases virais, dado que a proteína polimerase NP é a primeira proteína transcrita pela cópia antigenómica do genoma de NDV, não é necessário proporcionar, adicionalmente, a polimerase NP *in trans*.

Numa forma de realização da presente invenção, a técnica de genética inversa pode ser utilizada para manipular o vírus de ARN quimérico de cadeia negativa, esta técnica envolve a preparação de ARN virais recombinantes sintéticos que contêm as regiões não codificantes do ARN de vírus de cadeia negativa que são essenciais para o reconhecimento por polimerases virais e para empacotamento de sinais necessários para gerar um virião maduro. Os ADN e ARN plasmídicos recombinantes sintéticos podem ser replicados e resgatados em partículas virais infecciosas por qualquer número de técnicas conhecidas na técnica, como descrito na Patente U.S. Nº 5166057, concedida em 24 de novembro de 1992; na Patente U.S. Nº 5854037, concedida em 29 de dezembro de 1998; na Publicação de Patente Europeia EP 0702085A1, publicada a 20 de fevereiro de 1996; no Pedido de Patente U.S. com o Nº de Série 09/152845; nas Publicações de Patente Internacional PCT WO97/12032, publicadas a 3 de abril de 1997; documento WO96/34625, publicado a 7 de novembro de 1996; na Publicação de Patente Europeia EP-A780475; documento WO 99/02657, publicado em 21 de janeiro de 1999; documento WO 98/53078, publicado em 26 de novembro de 1998; documento WO 98/02530, publicado em 22 de janeiro de 1998; documento WO 99/15672, publicado em 1 de abril de 1999; documento WO 98/13501, publicado em 2 de abril de 1998;

documento WO 97/06270, publicado em 20 de fevereiro de 1997 e documento EPO 780475A1, publicado em 25 de junho de 1997.

Existem várias diferentes abordagens que podem ser utilizadas para aplicar a abordagem de genética inversa ao resgate de vírus de ARN de cadeia negativa. Primeiro, os ARN recombinantes são sintetizados a partir de um molde de ADN recombinante e reconstituídos *in vitro* com complexo de polimerase viral purificado, de modo a formar ribonucleoproteínas (RNP) recombinantes que podem ser utilizadas para transfectar células. Noutra abordagem, uma transfecção mais eficiente é alcançada se as proteínas polimerase virais estiverem presentes durante a transcrição dos ARN sintéticos, *in vitro* ou *in vivo*. Com esta abordagem, os ARN sintéticos podem ser transcritos a partir de plasmídeos de ADNc que são co-transcritos *in vitro*, com plasmídeos de ADNc codificando as proteínas polimerases, ou transcritos *in vivo* na presença de proteínas polimerases, *i. e.*, em células que expressam transientemente ou constitutivamente as proteínas polimerases.

Numa forma de realização alternativa, pode ser utilizada uma combinação de técnicas de genética inversa e técnicas de reordenamento para manipular vírus atenuados tendo os epitopos desejados em vírus de ARN segmentados. Por exemplo, um vírus atenuado (produzido por selecção natural, mutagénese ou por técnicas de genética inversa) e uma estirpe transportando o epitopo de vacina desejado (produzido por selecção natural, mutagénese ou por técnicas de genética inversa) pode ser co-infetado em hospedeiros que permitam o reordenamento dos genomas segmentados. Os reordenados que exibam o fenótipo atenuado e o epitopo desejado podem ser, depois, seleccionados.

Após o reordenamento, os novos vírus podem ser isolados e os seus genomas identificados através de análise de hibridação. Em abordagens adicionais aqui descritas, a produção de vírus quimérico infeccioso pode ser replicada em sistemas de células hospedeiras que expressam uma proteína polimerase viral de NDV (e. g., em sistemas de expressão de vírus/células hospedeiras; linhas celulares transformadas manipuladas para expressar uma proteína polimerase, etc.), de modo que o vírus quimérico infeccioso seja resgatado. Neste caso, o vírus auxiliar não necessita de ser utilizado, dado que esta função é proporcionada pelas proteínas polimerases virais expressas.

De acordo com a presente invenção, pode ser utilizada qualquer técnica conhecida dos especialistas na técnica para alcançar a replicação e resgate de vírus quiméricos. Uma abordagem envolve proporcionar proteínas virais e funções requeridas para replicação *in vitro*, antes de transfectar células hospedeiras. Numa tal forma de realização, as proteínas virais podem ser proporcionadas na forma de vírus de tipo selvagem, vírus auxiliar, proteínas virais purificadas ou proteínas virais expressas de um modo recombinante. As proteínas virais podem ser proporcionadas antes, durante ou após a transcrição dos ADNc ou ARN sintéticos codificando o vírus quimérico. A mistura integral pode ser utilizada para transfectar células hospedeiras. Noutra abordagem, as proteínas virais e funções requeridas para replicação podem ser proporcionadas antes ou durante a transcrição dos ADNc ou ARN sintéticos codificando o vírus quimérico. Numa tal forma de realização, as proteínas virais e funções requeridas para replicação são proporcionadas na forma de vírus de tipo selvagem, vírus auxiliar, extratos virais, ADNc ou ARN sintéticos que expressam as proteínas virais são introduzidas dentro da célula hospedeira por meio de infeção

ou transfecção. Esta infeção/transfecção ocorre antes ou simultaneamente à introdução dos ADNc ou ARN sintéticos codificando o vírus quimérico.

Numa abordagem particularmente desejável, as células manipuladas para expressar todos os genes virais de NDV podem resultar na produção de vírus quimérico infeccioso que contém o genótipo desejado; eliminando, deste modo, a necessidade de um sistema de seleção. Teoricamente, pode substituir-se qualquer um dos seis genes ou parte de qualquer um dos seis genes de NDV com uma sequência estranha. Contudo, uma parte necessária desta equação é a capacidade de propagar o vírus defeituoso (defeituoso, em virtude de um produto génico viral normal estar em falta ou alterado). Existem várias possíveis abordagens para rodear este problema. Numa abordagem, um vírus tendo uma proteína mutante pode ser cultivado em linhas celulares que são construídas para expressar constitutivamente a versão de tipo selvagem da mesma proteína. Desta forma, a linha celular complementa a mutação no vírus. Podem ser utilizadas técnicas semelhantes para construir linhas celulares transformadas que expressam constitutivamente qualquer dos genes de NDV. Estas linhas celulares que são preparadas para expressar a proteína viral podem ser utilizadas para complementar o defeito no vírus recombinante e, desse modo, propagar o mesmo. Em alternativa, para propagar vírus recombinante, podem estar disponíveis determinados sistemas de especificidade de hospedeiro natural.

Ainda noutra forma de realização, as proteínas virais e funções requeridas para replicação podem ser proporcionadas como material genético na forma de ADNc ou ARN sintéticos, de modo que sejam co-transcritas com os ADNc ou ARN sintéticos codificando o vírus quimérico. Numa abordagem particularmente

desejável, os plasmídeos que expressam o vírus quimérico e a polimerase viral e/ou outras funções virais são co-transfectados em células hospedeiras, como descrito nos Exemplos, ver a Secção 11 *supra*.

Outra abordagem para propagar o vírus recombinante pode envolver co-cultura com vírus de tipo selvagem. Esta pode ser realizada tomando simplesmente o vírus recombinante e co-infetar células com este e outro vírus de tipo selvagem (de um modo preferido, uma estirpe de vacina). O vírus de tipo selvagem deve complementar para o produto génico viral defeituoso e permitir o crescimento de vírus de tipo selvagem e recombinantes. Em alternativa, pode ser utilizado um vírus auxiliar para suportar a propagação do vírus recombinante.

Noutra abordagem, os moldes sintéticos podem ser replicados em células co-infectadas com vírus recombinantes que expressam a proteína polimerase do vírus NDV. De facto, este método pode ser utilizado para resgatar vírus recombinante infeccioso de acordo com a invenção. Para o efeito, a proteína polimerase de NDV pode ser expressa em qualquer sistema de expressão vetor/célula hospedeira, incluindo mas não limitado a vetores de expressão viral (e. g., vírus vaccinia, adenovírus, baculovírus, etc.) ou linhas celulares que expressam uma proteína polimerase (e. g., ver Krystal *et al.*, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2709-2713). Além disso, a infeção de células hospedeiras expressando todas as seis proteínas de NDV pode resultar na produção de partículas de vírus quimérico infecciosas. Este sistema eliminaria a necessidade para um sistema de selecção, dado que todo o vírus recombinante produzido seria do genótipo desejado. Deve ser notado que pode ser possível construir um vírus recombinante sem alterar a viabilidade viral. Estes vírus

alterados seriam, depois, cultivados até serem competentes e não necessitarem de funções auxiliares para se replicarem.

5.4. FORMULAÇÕES DE VACINA UTILIZANDO OS VÍRUS QUIMÉRICOS

A invenção abrange formulações de vacina compreendendo o vírus de ARN de cadeia negativa manipulado da presente invenção. A invenção abrange a utilização dos vírus NDV recombinantes que foram modificados em formulações de vacina, de modo a conferirem proteção L contra infecção por NDV. Ainda noutra forma de realização, os vírus NDV recombinantes da presente invenção podem ser utilizados como um veículo para expressar epitopos estranhos que induzem uma resposta protetora contra qualquer de uma variedade de patogénios.

A invenção abrange formulações de vacina a serem administradas a humanos e animais. Em particular, a invenção abrange formulações de vacina a serem administradas a animais domésticos, incluindo cães e gatos; animais selvagens, incluindo raposas e guaxinins; e gado, incluindo gado vacum, cavalos e porcos, ovelhas e cabras; e aves, incluindo galinha e peru.

A invenção abrange formulações de vacina que são úteis contra agentes causando doença aviária, incluindo NDV, Vírus da Doença de Marek (MDV), Vírus da Doença Infecciosa Bursal (IBDV), Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV), Vírus da Bursite Infecciosa, Vírus da Anemia Aviária (CAV), Vírus da Laringotraqueíte Infecciosa (ILV), Vírus da Leucose Aviária (ALV), Vírus da Reticuloendoteliose (RV) e Vírus Influenza Aviário.

Noutra forma de realização, a invenção abrange formulações de vacina que são úteis contra agentes que causam doença doméstica, incluindo vírus da raiva, vírus da leucemia felina (FLV) e vírus da esgana canina. Ainda noutra forma de realização, a invenção abrange formulações de vacina que são úteis para proteger gado contra o vírus da estomatite vesicular, vírus da raiva, vírus da peste bovina, vírus da varíola suína e, além disso, proteger animais selvagens contra o vírus da raiva.

Podem ser utilizados vírus atenuados produzidos pela abordagem de genética inversa nas formulações de vacinas e farmacêuticas aqui descritas. As técnicas de genética inversa podem ser também utilizadas para manipular mutações adicionais a outros genes virais importantes para a produção de vacinas, *i. e.*, os epitopos de variantes de estirpes vacinais úteis podem ser manipulados dentro dos vírus atenuados. Alternativamente, epitopos completamente estranhos, incluindo antigénios derivados de outros patogénios virais ou não virais, podem ser manipulados dentro das estirpes atenuadas. Por exemplo, os antigénios de vírus não relacionados, tais como antigénios parasitas de HIV (gp160, gp120, gp41) (*e. g.*, malária), antigénios bacterianos ou fúngicos ou antigénios tumorais podem ser manipulados dentro da estirpe atenuada. Alternativamente, os epitopos que alteram o tropismo do vírus *in vivo* podem ser manipulados dentro dos vírus quiméricos atenuados da invenção.

Pode ser construída virtualmente qualquer sequência génica heteróloga dentro dos vírus quiméricos da invenção para utilização em vacinas. De um modo preferido, os epitopos que induzem uma resposta imunitária protetora contra qualquer de uma variedade de patogénios ou antigénios que se ligam a anticorpos neutralizantes, podem ser expressos por, ou como, parte dos

vírus quiméricos. Por exemplo, as sequências génicas heterólogas que podem ser construídas dentro dos vírus quiméricos da invenção incluem, mas não estão limitadas a glicoproteínas de influenza, em particular, hemaglutinina H5, H7, epitopos virais da Doença de Marek; epitopos do Vírus da Doença Infecciosa Bursal (IBDV), Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV), Vírus da Anemia Aviária (CAV), Vírus da Laringotraqueíte Infecciosa (ILV), Vírus da Leucose Aviária (ALV), Vírus da Reticuloendoteliose (RV), Vírus da Influenza Aviária (AIV), vírus da raiva, vírus da leucemia felina, vírus da esgana canina, vírus da estomatite vesicular, vírus da peste bovina e vírus da varíola suína (ver Fields et al. (ed.), 1991, *Fundamental Virology, Segunda Edição*, Raven Press, Nova Iorque)

Ainda noutra forma de realização, as sequências génicas heterólogas que podem ser manipuladas dentro dos vírus quiméricos incluem aquelas que codificam proteínas com atividades imunopotenciadoras. Os exemplos de proteínas imunopotenciadoras incluem, mas não estão limitados, a citocinas, interferão tipo 1, interferão gama, fatores estimuladores de colónias, interleucina -1, -2, -4, -5, -6, -12.

Além disso, as sequências génicas heterólogas que podem ser construídas dentro dos vírus quiméricos da invenção para utilização em vacinas incluem, mas não estão limitadas a sequências derivadas de um vírus da imunodeficiência humana (HIV), de um modo preferido, de tipo 1 ou tipo 2. Numa forma de realização preferida, um péptido imunogénico derivado de HIV que pode ser a fonte de um antigénio pode ser construído dentro de um NDV quimérico que pode ser, depois, utilizado para desencadear uma resposta imunitária de vertebrado. Tais péptidos derivados de HIV podem incluir, mas não estão limitados a

sequências derivadas do gene env (*i. e.*, sequências codificando a totalidade ou parte de gp160, gp 120 e/ou gp41), o gene pol (*i. e.*, sequências codificando a totalidade ou parte de transcriptase inversa, endonuclease, protease e/ou integrase), o gene gag (*i. e.*, sequências codificando a totalidade ou parte de p7, p6, p55, p17/18, p24/25) tat, rev, nef, vif, vpu, vpr e/ou vpx.

Outras sequências heterólogas podem ser derivadas do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg); antígenos de superfície do vírus da hepatite A ou C, as glicoproteínas do vírus de Epstein Barr; as glicoproteínas do papilomavírus humano; as glicoproteínas do vírus sincicial respiratório, vírus da parainfluenza, vírus Sendai, vírus símio 5 ou vírus da papeira; as glicoproteínas do vírus da influenza; as glicoproteínas de vírus de herpes (*e. g.*, gD, gE); VP1 de poliovírus; determinantes antigénicos de patógenos não virais, tais como bactérias e parasitas, para nomear apenas alguns. Noutra forma de realização, pode ser expressa a totalidade ou porções de genes de imunoglobulina. Por exemplo, regiões variáveis de imunoglobulinas anti-idiotípicas que mimetizam tais epitopos podem ser construídas dentro dos vírus quiméricos da invenção.

Outras sequências heterólogas podem ser derivadas de antígenos tumorais e os vírus quiméricos resultantes ser utilizados para produzir uma resposta imunitária contra as células tumorais conduzindo a regressão tumoral *in vivo*. Estas vacinas podem ser utilizadas em combinação com outros regimes terapêuticos, incluindo, mas não limitados a quimioterapia, terapia de radiação, cirurgia, transplantação de medula óssea, etc., para o tratamento de tumores. De acordo com a presente

invenção, os vírus recombinantes podem ser manipulados para expressar antigénios associados a tumores (TAA), incluindo mas não limitados, a antigénios tumorais humanos reconhecidos por células T (Robbins a Kawakami, 1996, *Curr. Opin. Immunol.* 8:628-636,), proteínas de linhagem melanocítica, incluindo gp100, MART-1/MelanA, TRP-1 (gp75), tirosinase; antigénios específicos de tumores largamente partilhados, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-1, N-acetilglucosaminiltransferase V, p15; antigénios específicos de tumores mutados, β -catenina, MUM-1, CDK4; antigénios de não melanoma para carcinoma da mama, ovariano, cervical e pancreático, HER-2/neu, papilomavírus humano E6, E7, MUC-1.

Pode ser formulada uma vacina viral recombinante viva ou uma vacina viral recombinante inactivada. Uma vacina viva pode ser preferida, em virtude de a multiplicação no hospedeiro conduzir a um estímulo prolongado de tipo e magnitude semelhantes em relação àquele ocorrendo em infeções naturais e, assim, confere imunidade substancial, de longa duração. A produção de tais formulações de vacinas de vírus recombinante vivo pode ser realizada utilizando métodos convencionais, envolvendo a propagação do vírus em cultura celular ou no alantoide do embrião de pintainho, seguida de purificação. Além disso, dado que se demonstrou que o NDV é não patogénico em humanos, este vírus é altamente adequado para utilização como uma vacina viva.

A este respeito, a utilização de NDV geneticamente manipulado (vetores) para fins vacinais pode desejar a presença de características de atenuação nestas estirpes. A introdução de mutações apropriadas (e. g., deleções) dentro dos moldes utilizados para transfecção pode proporcionar os novos vírus com

características de atenuação. Por exemplo, as mutações sem sentido específicas que são associadas a sensibilidade a temperatura ou adaptação ao frio podem ser transformadas em mutações de deleção. Estas mutações devem ser mais estáveis do que as mutações pontuais associadas a mutantes sensíveis ao frio ou à temperatura e as frequências de inversão devem ser extremamente baixas.

Em alternativa, podem ser construídos vírus quiméricos com características "suicidas". Tais vírus passariam apenas por um ou alguns ciclos de replicação dentro do hospedeiro. Quando utilizado como uma vacina, o vírus recombinante passaria por ciclo(s) limitado(s) de replicação e induziria um nível suficiente de resposta imunitária, mas não avançaria no hospedeiro humano e causaria doença. Os vírus recombinantes carecendo de um ou mais dos genes de NDV ou possuindo genes de NDV mutados não seriam capazes de passar por sucessivos ciclos de replicação. Os vírus defeituosos podem ser produzidos em linhas celulares que permanentemente expressam tais gene ou genes. Os vírus carecendo de gene(s) essencial(ais) irão ser replicados nestas linhas celulares mas, quando administrados ao hospedeiro humano, não serão capazes de completar um ciclo de replicação. Tais preparações podem transcreever e traduzir - neste ciclo abortivo - um número suficiente de genes para induzir uma resposta imunitária. Em alternativa, poderiam ser administradas quantidades maiores das estirpes, de modo que estas preparações sirvam como vacinas de vírus inativados (mortos). Quanto a vacinas inativadas, prefere-se que o produto génico heterólogo seja expresso como um componente viral, de modo que o produto génico seja associado ao virião. A vantagem de tais preparações é que podem conter proteínas nativas e não sofrem inactivação por tratamento com formalina ou outros

agentes utilizados na preparação de vacinas de vírus mortos. Em alternativa, o NDV mutado, preparado a partir de ADNc, pode ser altamente atenuado, de modo que se replique durante apenas alguns ciclos.

Noutra forma de realização deste aspeto da invenção, as formulações de vacina inativadas podem ser preparadas utilizando técnicas convencionais para "matar" os vírus quiméricos. As vacinas inativadas são "mortas" no sentido em que a sua infecciosidade foi destruída. Idealmente, a infecciosidade do vírus é destruída sem afetar a sua imunogenicidade. De modo a preparar vacinas inativadas, o vírus quimérico pode ser cultivado em cultura celular ou no alantoide do embrião de pintainho, purificado por ultracentrifugação zonal, inativado por formaldeído ou β -propiolactona e agregado. A vacina resultante é habitualmente inoculada intramuscularmente.

De modo a melhorar a resposta imunológica, os vírus inativados podem ser formulados com um adjuvante adequado. Tais adjuvantes podem incluir, mas não estão limitados a géis minerais, e. g., hidróxido de alumínio; substâncias tensioativas, tais como liolecitina, polióis plurónicos, polianiões; péptidos; emulsões de óleo; e adjuvantes humanos potencialmente úteis, tais como BCG e *Corynebacterium parvum*.

Podem ser utilizados muitos métodos para introduzir as formulações de vacina descritas acima, estes incluem, mas não estão limitados a vias oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea e intranasal. Pode ser preferido introduzir a formulação vacinal de vírus quimérico por meio da via natural de infeção do patogénio para o qual a vacina é concebida.

6. EXEMPLO: EXPRESSÃO E EMPACOTAMENTO DE UM GENE ESTRANHO POR NDV RECOMBINANTE

É descrita a expressão do gene da cloranfenicol transferase (CAT) utilizando o minigenoma de NDV. O minigenoma de NDV foi preparado utilizando pNDVCAT, um plasmídeo recombinante contendo o gene CAT. O plasmídeo pNDVCAT é um plasmídeo pUC19 contendo em sequência: o promotor T7; a extremidade 5' do ARN genômico de NDV, compreendendo 191 nucleótidos de sequência de ARN de NDV não codificante; 5 nucleótidos inseridos (3'CTTAA); a sequência codificante completa do gene da cloranfenicol transferase (CAT) na ordem invertida e complementada; a extremidade 3' da sequência de ARN genômico de NDV, compreendendo 121 nucleótidos de sequência de ARN de NDV não codificante; um sítio de clonagem *BbsI* e diversos sítios de restrição permitindo a transcrição corrida do molde. O pNDVCAT pode ser transcrito utilizando a T7 polimerase, de modo a criar um ARN com sequências flanqueadoras de sentido viral da doença de Newcastle em torno de um gene CAT, em orientação invertida.

O comprimento de um ARN de paramixovírus pode ser um fator fundamental que determina o nível de replicação de ARN, com a replicação de genoma sendo mais eficiente quando o número total de nucleótidos é um múltiplo de seis. Quanto a NDV, a questão de se esta regra de seis é crítica para replicação foi examinada por geração de mini-replicas CAT de comprimentos variáveis, diferindo em um a cinco nucleótidos. Apenas uma construção cujo genoma era divisível por seis era capaz de induzir elevada atividade CAT.

6.1. CONSTRUÇÃO DO MINIGENOMA DO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE

De modo a construir um minigenoma de NDV, como descrito *supra*, foi utilizada a seguinte estratégia. A sequência 5' terminal de ARN de NDV genômico foi obtida por RACE (Gibco, BRL) utilizando técnicas padrão na técnica. O molde para a reação RACE era ARN genômico que foi purificado a partir de viriões de NDV (NDV-CL: Califórnia 11914/semelhante a 1944). Como ilustrado na Figura 3, esta sequência terminal compreendia 64 nucleótidos de uma sequência atrelado, mais 127 nucleótidos da região não traduzida do gene L. Localizada adjacente à sequência viral de 191 nucleótidos, foi inserida uma sequência de 5 nucleótidos (3'CCTTAA). Um gene CAT compreendia 667 nucleótidos da fase de leitura aberta de CAT que foi colocada entre as regiões virais 5' e 3' terminais não codificantes. De modo a se obter uma região 3' terminal da sequência de NDV, foi utilizado RT-PCR. O molde para a reação de RT-PCR era ARN genômico de NDV poliadenilado *in vitro*. Como ilustrado na Figura 3, a região 3' terminal de 121 nucleótidos era constituída por 56 nucleótidos da região não traduzida do gene NP, mais 65 nucleótidos de uma sequência líder. A construção resultante do minigenoma de NDV é mostrada na FIG. 1. As sequências nucleotídicas da região 3' e 5' terminal não codificante são mostradas na FIG. 3.

6.2. CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO NP, P & L DE NDV

Como descrito na Secção 5, a transcrição ou replicação de um genoma de ARN de cadeia negativa requer diversos componentes

proteicos a serem introduzidos com o vírus, incluindo a proteína L, proteína P e proteína NP. De modo a facilitar a expressão a partir do minigenoma de NDV, os genes codificando cada uma das proteínas L, P e NP foram clonados dentro de vetores de expressão pTM1, como ilustrado na FIG. 2A-C. Os vetores de expressão pTM1 compreendem um promotor T7, diversos sítios de clonagem para inserção do gene de interesse (L, P ou NP), um terminador T7, uma origem de replicação pUC19 e um gene de resistência à ampicilina. De modo a construir os plasmídeos de expressão, ADN de comprimento completo de nucleoproteína de NDV (NP), fosfoproteína (P) e polimerase (L) foi obtido por amplificação por RT-PCR. Estes ADN foram clonados dentro do vetor expressão pTM1 de T7 polimerase, respetivamente (FIG. 2A-C).

6.3. TRANSCRIÇÃO DE ARN DO MINIGENOMA DE NDV

A transcrição de ARN a partir de plasmídeo de minigene de NDV foi realizada com o *Kit Ribomax* (Promega), como indicado pelos manuscritos. De modo a permitir a transcrição corrida, 1 µg de plasmídeo de minigenoma de NDV (pNDVCAT) foi digerido com *Bbs I*. O plasmídeo linearizado foi, depois, utilizado como um molde de reação de transcrição (durante 2 horas, a 37 °C). De modo a remover o molde de ADN, a mistura de reação resultante foi tratada com ADNase isenta de ARNase (durante 15 min., a 37 °C) e purificada por extração de fenol-clorofórmio, seguida de precipitação por etanol.

6.4. TRANSFECCÕES CELULARES

Células Cos-1 ou células 293T foram cultivadas sobre placas de 35 mm e infetadas com o vírus auxiliar rVV T7, a uma multiplicidade de infecção (moi) de, aproximadamente, 1 durante 1 hora, antes de transfecção. As células foram, depois, transfectadas com os vetores de expressão codificando as proteínas NP, P e L de NDV. Especificamente, as transfecções foram realizadas com DOTAP (Boehringer Mannheim). Após a infecção por vírus auxiliar, as células foram transfectadas com pTM1-NP (1 µg), pTM1-P (1 µg) e pTM1-L (0,1 µg), durante 4 horas. As transfecções de controlo, carecendo da proteína L, foram realizadas num conjunto paralelo de células com pTM1-NP (1 µg), pTM1-P (1 µg) e pTM1-L falso (0 µg). Após o período de incubação de 4 horas, as células foram submetidas a transfecção de ARN com 0,5 µg do ARN quimérico NDV-CAT (-) (ver a FIG. 1). Após a transfecção de ARN, as células foram deixadas incubar durante 18 horas. Os lisados celulares foram subseqüentemente recolhidos para o ensaio CAT.

6.5. ENSAIOS CAT

Os ensaios CAT foram realizados de acordo com processos padrão, adaptados de Gorman *et al.*, 1982, *Mol. Cell. Biol.* 2: 1044-1051. Os ensaios continham 10 µL de ¹⁴C cloranfenicol (0,5 µCi; 8,3 nM; NEN), 20 µL de acetil CoA a 40 mM (Boehringer) e 50 µL de extratos celulares em tampão Tris a 0,25 M (pH 7,5). Os tempos de incubação foram 16-18 horas.

6.6. RESULTADOS

Em cada linha celular transfectada com os vetores de expressão NP, P, L e o ARN quimérico NDV-CAT, foram obtidos elevados níveis de expressão de CAT, 18 horas após infecção. Além disso, as células transfectadas de controlo carecendo da proteína L não expressaram CAT.

7. RESGATE DE VÍRUS NDV INFECCIOSOS UTILIZANDO ARN DERIVADO DE ADN RECOMBINANTE ESPECÍFICO

As experiências descritas nas subsecções abaixo demonstram o resgate de NDV infeccioso, utilizando ARN que é derivado de ADN recombinantes específicos. Os ARN correspondendo ao ARN quimérico NDV-CAT podem ser utilizados para mostrar que os 191 nucleótidos da extremidade 5' e os 121 nucleótidos dos nucleótidos 3' terminais dos ARN virais contêm todos os sinais necessários para transcrição, replicação e empacotamento de ARN modelo de NDV. Os ARN contendo todas as unidades transcricionais dos genomas de NDV podem ser expressos a partir de plasmídeos transfectados. Deste modo, esta tecnologia permite a manipulação de vírus NDV infecciosos utilizando clones de ADNc e mutagénese específica pontual dos seus genomas. Além disso, esta tecnologia pode permitir a construção de vírus quiméricos de NDV infecciosos que podem ser utilizados como vetores eficientes para expressão génica em cultura de tecidos, animais ou homem.

8. EXEMPLO: VÍRUS RECOMBINANTE DA DOENÇA DE NEWCASTLE CONTENDO UM EPITOPO gp160 ANTIGÊNICO DE HIV INSERIDO DENTRO DO GENOMA DE NDV

No Exemplo aqui apresentado, um NDV quimérico é construído para expressar um antígeno heterólogo derivado de gp160 de HIV. As experiências descritas nas subsecções abaixo demonstram a utilização de um molde de ARN recombinante para produzir um NDV quimérico que expressa um péptido derivado de gp160 de HIV dentro do genoma de NDV e, além disso, este NDV quimérico é utilizado para desencadear uma resposta imunitária humoral e mediada por células de vertebrado.

8.1. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEO

Os clones recombinantes de ADNc de NDV expressando proteínas gp160 de HIV podem ser construídos de vários modos conhecidos na técnica. Por exemplo, como ilustrado na Figura 4, as proteínas Env e Gag de HIV podem ser inseridas dentro do NDV em várias localizações. Num exemplo, as proteínas Env e Gag são inseridas entre os genes M e L. Num exemplo diferente, as proteínas Env e Gag são inseridas 3' em relação ao gene NP (entre a sequência líder e NP). Em alternativa, estas proteínas de HIV irão ser incorporadas entre as proteínas de envelope de NDV (HN e F) na extremidade 3'. Estas proteínas podem ser também inseridas dentro ou entre qualquer dos genes de NDV.

8.2. PRDUÇÃO DE VÍRUS QUIMÉRICO INFECCIOSO

A transfecção de ARN derivado de plasmídeo compreendendo um genoma recombinante de NDV pode ser transfectada para dentro de células, tais como, por exemplo, COS, 293 MDBK e a selecção de vírus quimérico infeccioso pode ser realizada como anteriormente descrito. Ver a Patente U.S. Nº 5166057. O ARN resultante pode ser transfectado para dentro de células infetadas com vírus de tipo selvagem por utilização de processos padrão de protocolos de transfecção. Após a transfecção, o sobrenadante pode ser recolhido e utilizado a diferentes diluições, de modo a infetar novas células na presença de antissoro de NDV. O sobrenadante pode ser também utilizado para ensaios de placa na presença do mesmo antissoro. O vírus resgatado pode ser, depois, purificado e caracterizado e utilizado, por exemplo, na produção de anticorpo.

8.3. ENSAIOS DE INIBIÇÃO DE HEMOGLUTINAÇÃO E NEUTRALIZAÇÃO DE VÍRUS

Os ensaios de inibição de hemaglutinação (HI) são realizados como anteriormente descrito (Palmer, D.F. *et al.*, 1975, *Immunol. Ser.* 6: 51-52). Os anticorpos monoclonais (2G9, 4B2, 2F10, 25-5) são preparados por processos padrão com um anticorpo monoclonal humano anti-gp120. O fluido ascítico contendo anticorpos monoclonais é tratado com enzima de destruição de recetor, como anteriormente descrito (Palmer, D.F. *et al.*, 1975, *Immunol. Ser.* 6:51-52).

Para o ensaio de neutralização de vírus, células em placas de 30 mm de diâmetro são infetadas por vírus. Após uma adsorção de 1 h, é adicionado um revestimento de agar contendo anticorpo

a diferentes diluições. A monocamada celular é, depois, corada com violeta de cristal a 0,1%, 72 h após a infecção.

8.4. IMUNIZAÇÃO

Murganhos BALB/c de 6 semanas de idade são infetados com o vírus por meio da via aerossol ou são imunizados intraperitonealmente (i.p.) com 10 µg de vírus purificado. Para todas as imunizações de reforço, 10 µg de vírus purificado são administrados i.p. Os soros são recolhidos 7 dias após cada imunização.

8.5. RADIOIMUNOENSAIO

O radioimunoensaio é realizado como anteriormente descrito (Zaghouani, H. *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5645-6549). Resumidamente, placas de microtitulação são revestidas com 5 µg/mL de conjugado péptido-BSA, saturado com BSA a 2%, em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) e incubado com diversas diluições de soro. Os anticorpos ligados são revelados por utilização de anticorpo monoclonal capa anti-murganho marcado com ¹²⁵I.

8.6. RADIOIMUNOPRECIPITAÇÃO

A linha celular T humana, H9, é infetada de um modo agudo com HIV. Quatro dias após infecção, 5×10^7 células infetadas são marcadas com ³⁵S-cisteína, ³⁵S-metionina e ³H-isoleucina, a 2×10^6 /mL, em meios contendo 100 µCi de cada isótopo por mL. Após

20 h de marcação metabólica, os viriões radioativos são sedimentados por centrifugação, durante 1 h, a 45000 rpm. O sedimento é, depois, ressuspensão em 1,0 mL de tampão de lise contendo Triton X-100 a 1% e fluoreto de fenilmetilssulfonilo (PMSF) a 2 mM. Aproximadamente 20 µL de soros ou 0,5 µg de anticorpo monoclonal (em 20 µL de PBS) e 175 µL de lisado de virião são incubados, de um dia para o outro, a 4 °C, em 0,5 mL de tampão de imunoprecipitação contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) a 0,5%, BSA a 1 mg/mL, Triton X-100 a 2% e fosfato de sódio a 50 mM (pH 7,4). Os complexos antigénio-anticorpo são ligados a esférulas de proteína A-Sepharose e são analisados por electroforese num gel de SDS-poliacrilamida a 10%.

8.7. ENSAIOS DE NEUTRALIZAÇÃO DE HIV-1

O ensaio de neutralização *in vitro* é realizado como descrito anteriormente (Nara, P.L. *et al.*, 1987, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 3: 283-302). Resumidamente, diluições em série de duas vezes de soro inactivado por calor são incubadas, durante 1 h, à temperatura ambiente, com 150-200 unidades de formação de sincício de vírus HIV produzido em células H9. A mistura vírus/soro é incubada, durante 1 h, a 37 °C, com 50000 células CEMs tratadas com DEAE-dextrano (aderidas a placas de microtitulação utilizando poli-L-lisina) ou 50000 células de suspensão H9. Após adsorção de vírus, o vírus não ligado é removido e 200 µL de meios são adicionados a cada placa. Quatro dias após infecção, 50 µL de meios de sobrenadante são removidos para quantificação de proteína viral p24^{gag} (Coulter Source, Inc.). O número total de sincícios em células CEMs é contado cinco dias após infecção. Os títulos de neutralização são calculados por comparação com poços de controlo de apenas vírus

e são expressos como o inverso da diluição de soro mais elevada que reduziu o número de sincícios em mais de 50% ou inibiu a síntese de p24 em mais de 50%.

8.8. INDUÇÃO DE RESPOSTA CTL

Murganhos BALB/c são imunizados com 0,2 mL de suspensão viral contendo 10^7 PFU de vírus quimérico NDV. 7 dias mais tarde, células do baço são obtidas e novamente estimuladas *in vitro*, durante 5 dias, com células do baço irradiadas, isoladas ou revestidas com péptidos imunogénicos, na presença de concanavalina A a 10% no sobrenadante, como anteriormente descrito (Zaghouani, H. *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148: 3604-3609).

8.9. ENSAIO DE CITÓLISE

As células alvo revestidas com péptidos são marcadas com $\text{Na}^{51}\text{Cr}_4$ (100 $\mu\text{Ci}/10^6$ células), durante 1 h, a 37 °C. Após serem lavadas duas vezes, as células são transferidas para placas de 96 poços de fundo em V, as células efetoras são adicionadas e incubadas, a 37 °C, em CO_2 a 7%. Quatro horas mais tarde, o sobrenadante é recolhido e contado. A libertação máxima de crómio é determinada por incubação das células com detergente Nonidet P40 a 1%. A percentagem de lise específica é calculada de acordo com a seguinte fórmula: $[(\text{cpm das amostras} - \text{cpm de libertação espontânea}) / (\text{cpm de libertação máxima} - \text{cpm de libertação espontânea})] \times 100$.

9. EXPRESSÃO INTRACELULAR DE ARN QUIMÉRICO NDV-CAT

De modo a aumentar a eficiência de expressão de minigenomas de NDV, foi construído um plasmídeo (pT7-NDV-CAT-RB) para expressão intracelular de ARN de NDV-CAT. Isto foi alcançado por inserção de uma ribozima derivada do vírus da hepatite delta, diretamente a seguir à extremidade da região não codificante 3' do ARN de NDV-CAT. A co-transfecção de pTM1-NP, pTM1-P, pTM1-L e pT7-NDV-CAT-RT) dentro de células 293, 293T, COS1, CV1 ou fibroblastos de embrião de galinha (CEF) que foram anteriormente infectadas com rVV-T7 ou com vírus vaccinia Ankara modificado expressando T7 polimerase (MVA-T7), resultou em elevados níveis de atividade CAT (Fig. 6). A atividade CAT foi, aproximadamente, 100 a 1000 vezes superior àquela alcançada por transfecção direta de ARN do ARN de NDV-CAT.

10. RESGATE DE VÍRUS NDV INFECCIOSO UTILIZANDO ARN DERIVADO DE ADN RECOMBINANTE ESPECÍFICO

De modo a alcançar o resgate de vírus recombinante a partir de um sistema derivado de plasmídeo, não dependente de vírus, um plasmídeo permitindo a expressão intracelular do antigenoma de comprimento completo de NDV foi agrupado. O ADNc de NDV foi submetido a RT-PCR em vários pedaços a partir de ARN purificado de uma estirpe semelhante a Califórnia de NDV (NDV-CL) (Meindl *et al.*, 1974 *Virology* 58:457-463). Os pedaços de ADNc foram ligados e agrupados dentro de um plasmídeo com sequências flanqueadoras de promotor T7 e ribozima, resultando no plasmídeo pT7-NDV+RB. Uma mutação silenciosa criando um novo sítio de restrição XmaI foi introduzida dentro da fase de leitura aberta

L de pT7-NDV+-RB. Monocamadas celulares CEF em placas de 10 cm foram infetadas com MVA-T7 a uma multiplicidade de infecção de, aproximadamente, 0,1. Uma hora mais tarde, as células foram transfectadas (lipofectadas) com 2,4 µg de pTM1-NP, 1,2 µg de pTM1-P, 1,2 µg de pTM1-L e 1,5 µg de pT7-NDV+-RB. Após 8 h de incubação a 37 °C, foi adicionado meio novo. 20 h após a transfecção, o inibidor do vírus vaccinia, araC, foi adicionado a uma concentração final de 60 µg/mL. Dois dias após transfecção, foi adicionado meio novo contendo 100 µg/mL de araC. O sobrenadante de células transfectadas no dia 4 após transfecção foi utilizado para inocular a câmara alantoide de ovos de galinha embrionados, de 10 dias de idade. Após dois dias de incubação a 37 °C, o fluido alantóide foi recolhido e verificou-se ser positivo para a presença de vírus NDV-CAT por hemaglutinação. A análise do ARN isolado a partir do vírus resgatado confirmou a presença do sítio Xmal introduzido de novo, confirmando que o vírus era derivado do ADNc plasmídico clonado. Uma representação esquemática do processo do protocolo de resgate é mostrada na Fig. 7.

11. EXPRESSÃO DE UM GENE ESTRANHO DE UM CISTRÃO INTERNO DE UM GENOMA QUIMÉRICO DE NDV

O plasmídeo pT7-NDV+-CAT/RN-RB foi construído por substituição da fase de leitura aberta HN em ADNc de NDV-CL com a fase de leitura aberta CAT. Nucleótidos extra adicionais foram adicionados dentro das regiões não codificantes, de modo a permitir um comprimento nucleotídico total do ARN quimérico de NDV resultante que fosse divisível por seis. A co-transfecção de pT7-NDV+-CAT/HN-RB, juntamente com pTM1-NP, pTM1-P e pTM1-L, para dentro de monocamadas CEF que foram anteriormente infetadas

com vírus MVA-T7, resultou em atividade CAT como medida no dia 2 após transfecção (Fig. 8). Estes resultados demonstram que é possível utilizar NDV como um vetor para expressão de genes estranhos clonados como unidades transcricionais dentro do genoma de NDV.

Lisboa, 25 de janeiro de 2016

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ARN recombinante compreendendo uma sequência de ARN heteróloga flanqueada pelas regiões não codificantes 3' e 5' de um genoma de ARN de vírus da doença de Newcastle (NDV), as referidas regiões contendo um sítio de ligação específico para uma ARN polimerase de um vírus da doença de Newcastle e sinais requeridos para a replicação e transcrição mediadas por NDV, em que a sequência de ARN heteróloga é heteróloga para o referido genoma de ARN de NDV.

2. Molécula de ARN recombinante de acordo com a Reivindicação 1, a qual é uma molécula híbrida na qual as regiões não codificantes 3' e 5' estão ligadas à sequência de ARN heteróloga.

3. Molécula de ARN recombinante de acordo com a Reivindicação 1, em que a sequência de ARN heteróloga é inserida dentro de uma sequência codificante do gene de NDV, de modo que quando um produto génico quimérico é expresso, o produto génico quimérico contém a sequência peptídica heteróloga dentro da proteína viral de NDV.

4. Molécula de ARN recombinante de acordo com a Reivindicação 1, em que a sequência de ARN heteróloga substitui completa ou parcialmente a região codificante viral de um gene de NDV.

5. Molécula de ARN recombinante de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 ou 3, em que a sequência de ARN heteróloga

é inserida dentro das sequência codificante do gene HN, P, NP, M, F ou L.

6. Molécula de ARN recombinante de acordo com a Reivindicação 5, em que a sequência de ARN heteróloga é inserida dentro da sequência codificante do gene HN ou F.
7. Molécula de ARN recombinante de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 6, em que a sequência heteróloga é um gene de outro vírus, um gene de um patógeno, um gene celular ou um antigénio, tal como um antigénio que é característico de um patógeno, uma doença autoimune, um alergénio ou um tumor.
8. Molécula de ARN recombinante de acordo com a Reivindicação 7, em que a sequência heteróloga é um antigénio que é característico de uma doença autoimune ou um tumor.
9. Molécula de ARN recombinante de acordo com a Reivindicação 7, em que a sequência heteróloga é uma glicoproteína, de um modo preferido, uma glicoproteína de influenza ou uma glicoproteína de vírus de herpes, vírus Epstein, vírus do papiloma humano ou vírus sincicial respiratório.
10. Molécula de ARN recombinante de acordo com a Reivindicação 7, na qual o referido gene de outro vírus é derivado de vírus da imunodeficiência humana, vírus de influenza, vírus sincicial respiratório, vírus da doença de Marek, vírus da doença infecciosa bursal, vírus da bronquite infecciosa, vírus da bursite infecciosa, vírus da

anemia aviária, vírus da laringotraqueíte infecciosa, vírus da leucose aviária, vírus da reticuloendoteliose, vírus influenza aviário, vírus da raiva, vírus da esgana felina, vírus da estomatite vesicular, vírus da peste bovina ou vírus da varíola suína.

11. Molécula de ARN recombinante de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 10, em que a molécula de ARN tem polaridade negativa.
12. Molécula de ARN recombinante de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 10, em que a molécula de ARN tem polaridade positiva.
13. Célula recombinante compreendendo sequências nucleotídicas codificando uma molécula de ARN recombinante de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 12 e proteínas P e L de ARN polimerase de NDV.
14. Vírus quimérico de ARN de cadeia negativa compreendendo a molécula de ARN recombinante de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 11.
15. Método para a produção de um vírus quimérico de ARN de cadeia negativa, compreendendo a transfecção de uma célula hospedeira com sequências nucleotídicas codificando a molécula de ARN recombinante de qualquer uma das Reivindicações 1 a 12 e as funções virais requeridas para replicação e transcrição e a recuperação do vírus quimérico a partir da cultura.

16. Formulação de vacina compreendendo um vírus quimérico de ARN de cadeia negativa geneticamente manipulado de acordo com a Reivindicação 14, o genoma do qual codifica um epítopo heterólogo.
17. Formulação de vacina da Reivindicação 16, na qual o epítopo heterólogo é uma proteína imunopotenciadora.
18. Formulação de vacina da Reivindicação 16 ou Reivindicação 17 para utilização como um medicamento.
19. Molécula de ADN codificando a molécula de ARN codificante de qualquer uma das Reivindicações 1 a 12.
20. Vírus quimérico de ARN de cadeia negativa produzido pela abordagem de genética inversa, o referido vírus compreendendo uma molécula de ARN recombinante compreendendo uma sequência de ARN flanqueada pelas regiões 3' e 5' de um genoma de NDV, as referidas regiões contendo um sítio de ligação específico para uma ARN polimerase de um NDV e sinais requeridos para a replicação e transcrição mediadas por NDV.
21. Molécula de ADN codificando uma molécula de ARN recombinante compreendendo uma sequência de ARN flanqueada pelas regiões 3' e 5' de um genoma de NDV, as referidas regiões contendo um sítio de ligação específico para uma ARN polimerase de um NDV e sinais requeridos para a replicação e transcrição mediadas por NDV.
22. Método de produção de uma molécula de ARN, compreendendo a transfecção de uma célula hospedeira com a molécula de ADN

da reivindicação 21 e as funções virais requeridas para replicação e transcrição e a recuperação da molécula de ARN recombinante a partir da cultura.

Lisboa, 25 de janeiro de 2016

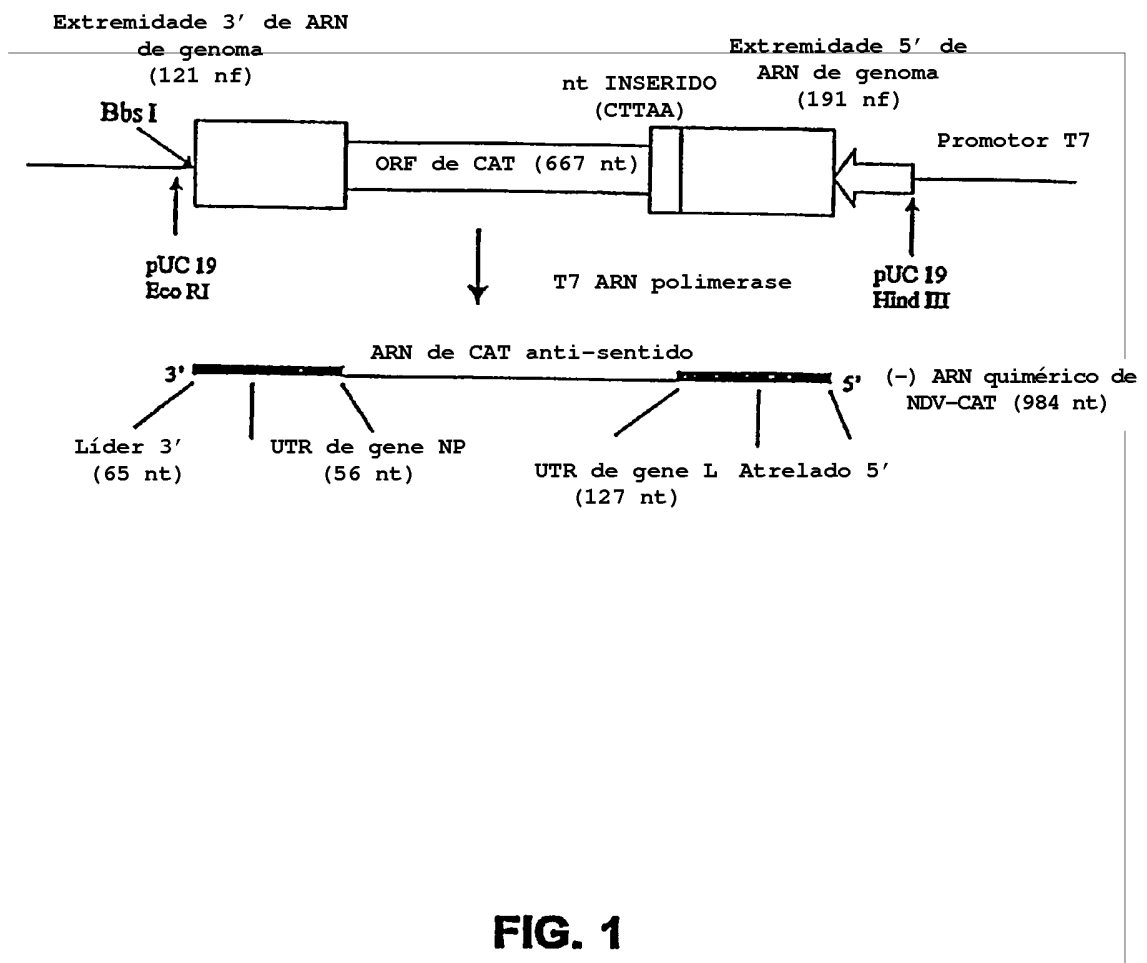


FIG. 1

pTM1-NP

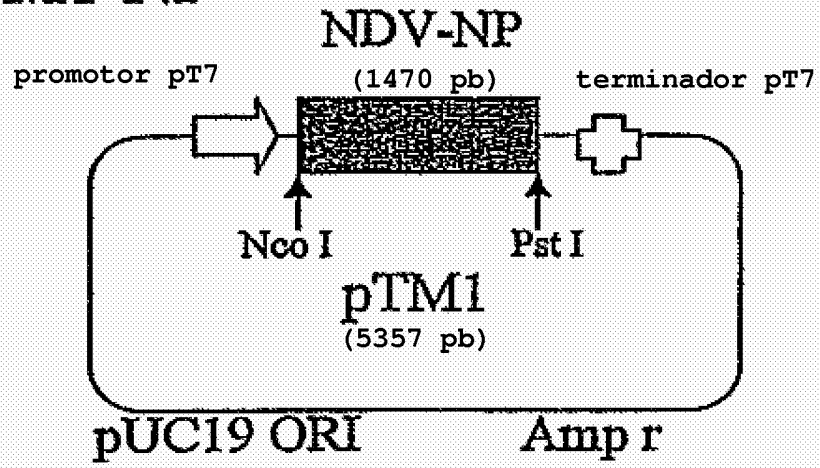


FIG. 2A

pTM1-P

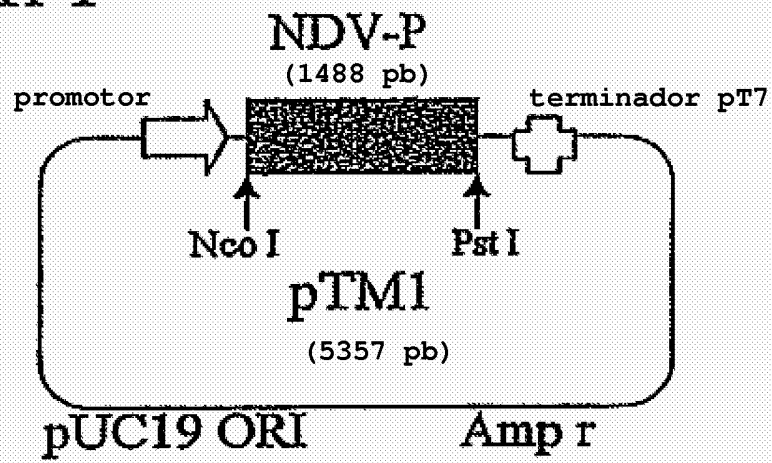


FIG. 2B

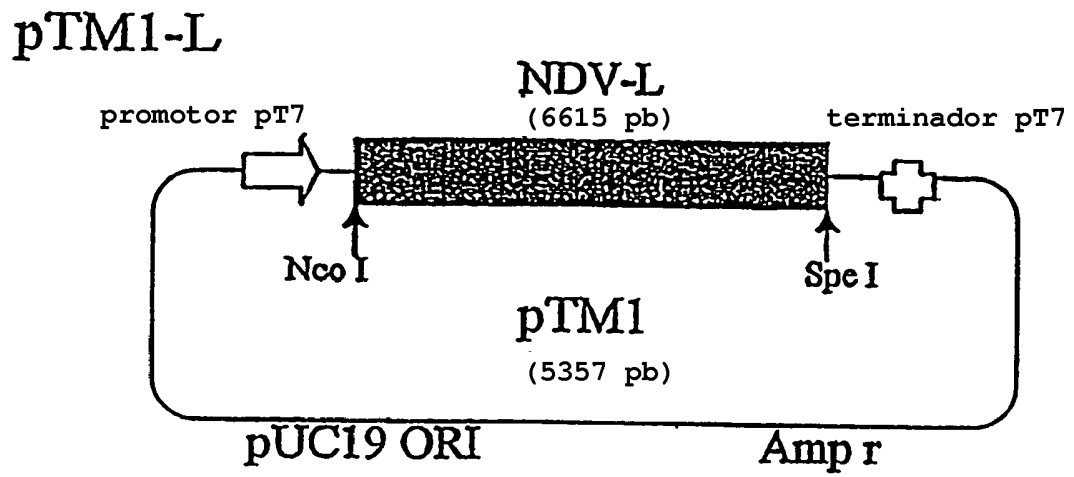


FIG. 2C

5' ACCAACAGAGAAUCCGUAAGGUACGUUAAAAGCGAAGGAGCAAUUGAAGUCGCACGGG
UAGAAGGUGUGAAUCUCGAGUGOGAGCCOGAAGCACAAACUCGAGAAAGCCUUCUACCAAC-
----- Gene CAT (667 nt) -----cuuaa
CGACAAUCACAUAUUAUAGGCUCUUUUUCUGGCCAAUUGUAUCCUUGUUGAUUUAAUCAUA
CUAUGUUAGAAAAAGUUGAACUCOGACUCCUUAGGACUCGAAACUCGAACUCAAAUAAAUGU
CUUAGAAAAGAUUGCGCACAGUUUUCUUGAGUGUAGUCUUGUCAUUCACCAAUCUUUGU
UUGGU-3'

FIG. 3

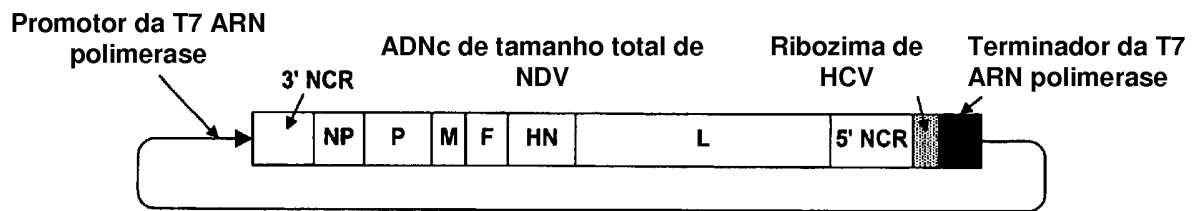


FIG. 4A

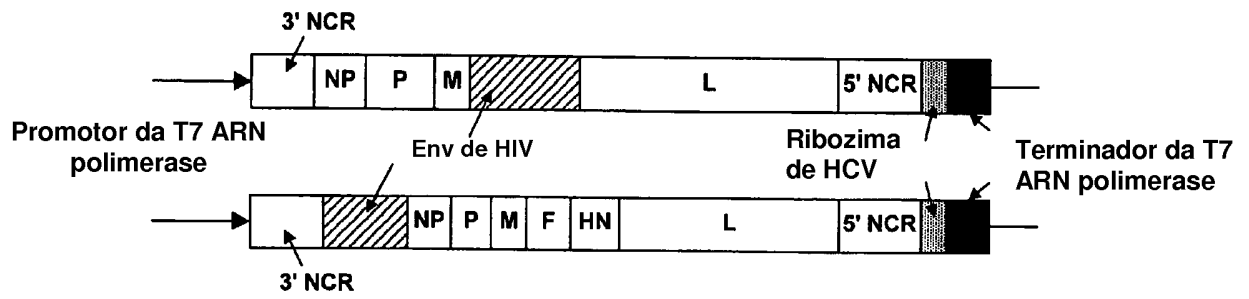


FIG. 4B

```

1   TGGTTTGTCTCTTAGGCATTCCATGCAATTTTTCGCTTCCTCGTTAACTT   50
1   TGGTTTGTCTCTTAGGCATTCAATGCTATTTCCGCTTCCTCGTTAACTT   50
*****
51  CAGCGTGCCCATCTTCCACACTTAGAGCTCACGCTCGGGCTTCGTGTTTG   100
51  CAACGTGCCCATCTTCCACACTTAGAGCTCACGCTCGGGCTTCGTGTTTG   100
** *****
101 AGCTCTTTCGGAAGAtGGTTG   121
101 AGCTCTTTCGGAAGACGGTTG   121
*****

```

extremidade 5'

```

1   ACCAAACAAAGATTTGGTGAATGACAAGACTACACTCAAGAATAACTGTG   50

51  cgcaatctttttctAAGACATTATTGAGTTCGAGTTCGAGTCCTAAGG   100
     nnnnnnAAGACATTATTGAGTTCGAATTCGAGCTCTAAGG
     *****

101 AGTCGGAGTTCAACTTTTTTCTAACATAGTATGATTAAATCAACAAGGAT   150
     AGTCGGAGTTCAACTTTTTTCTAACATAGTATAATTAATCACCAAGGAT
     *****

151 ACAATTGGCCAGAAAAGGAGCCTATTAATATGTGATTGTCTG   191
     ACAATTGGCCAGAAAAGGAGCCTATTAATATGTGATTTTCG
     *****

```

FIG. 5

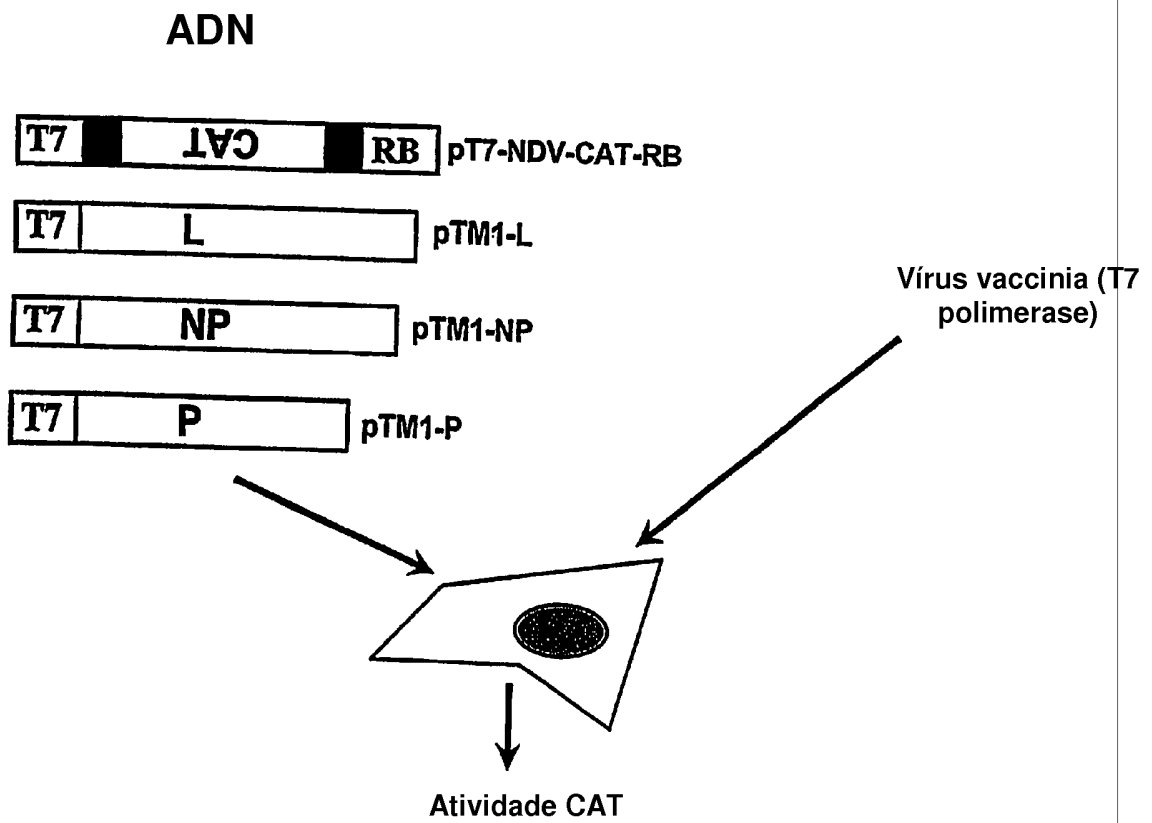


FIG. 6

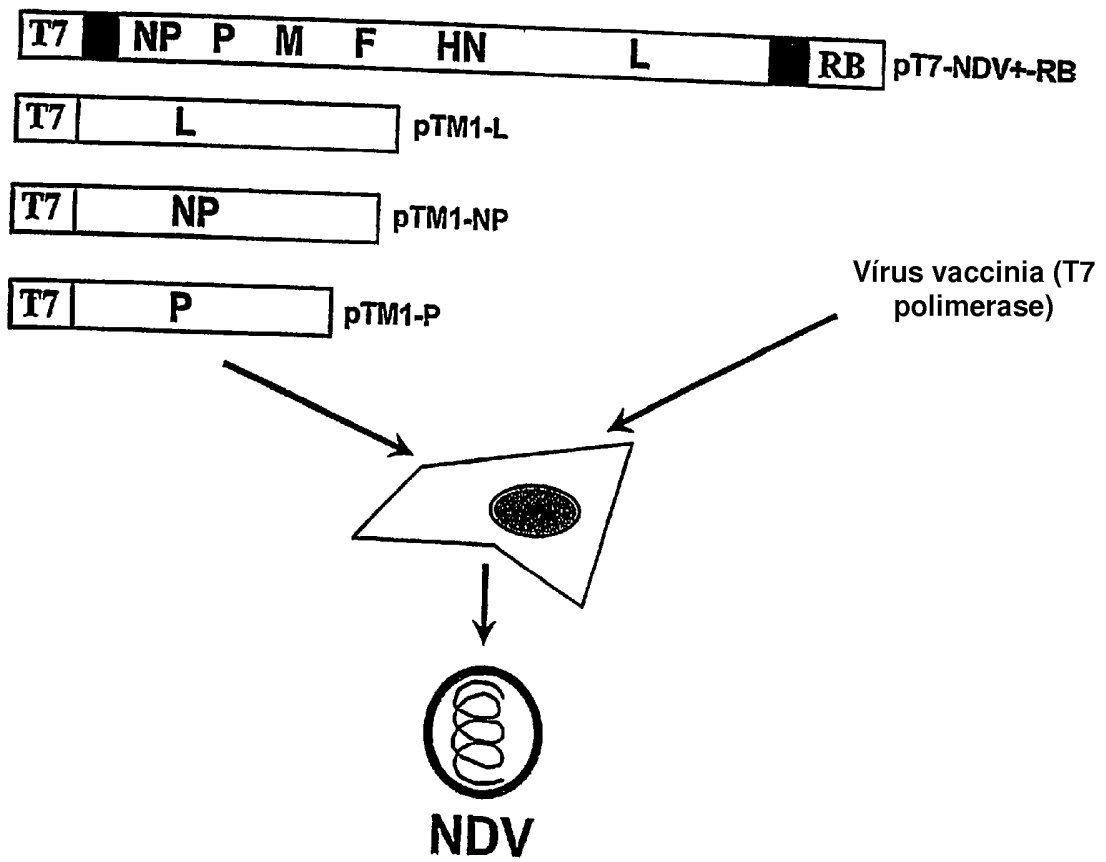


FIG. 7

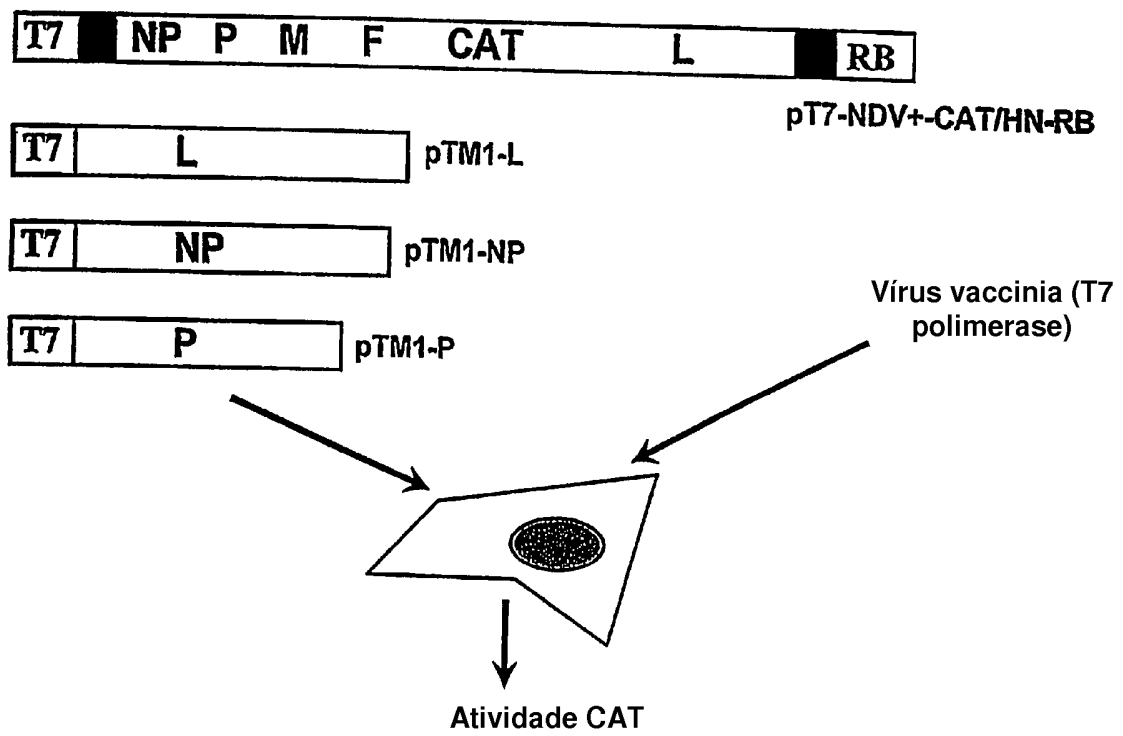


FIG. 8