



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1292615 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 14/115 (2006.01) **C12N 7/00** (2006.01)

C07K 14/13 (2006.01) **A61K 39/165** (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **2001.06.21**

(30) Prioridade(s): **2000.06.23 US 213655**

(43) Data de publicação do pedido: **2003.03.19**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.10.25**
001/2007

(73) Titular(es):

WYETH HOLDINGS CORPORATION
FIVE GIRALDA FARMS MADISON, NEW JERSEY
07940 US

(72) Inventor(es):

CHRISTOPHER, L. PARKS US

(74) Mandatário:

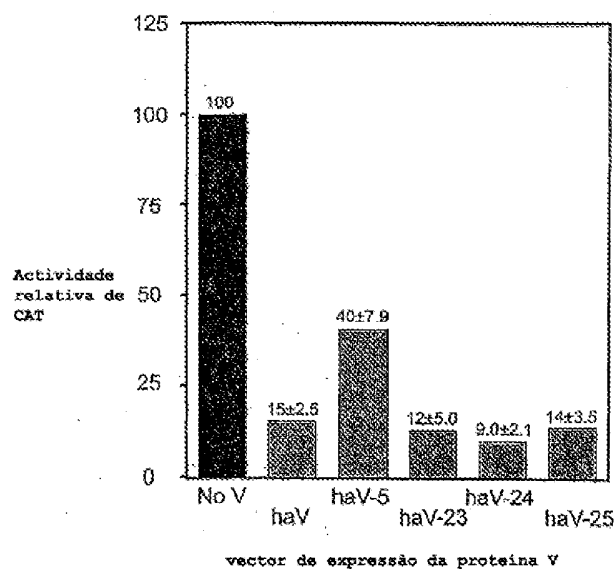
ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PROTEÍNAS V MODIFICADAS D MORBILLIVIRUS**

(57) Resumo:

RESUMO**"PROTEÍNAS V MODIFICADAS DE *Morbillivirus*"**

São descritos *Morbillivirus* modificados possuindo pelo menos uma mutação na região correspondente aos aminoácidos 112-134 da proteína V do vírus do sarampo em que um ou ambos os aminoácidos 113 ou 114 estão mutados. Tais *Morbillivirus* modificados exibem reduzida repressão da expressão génica. Podem ser incluídas mutações ou deleções adicionais noutras regiões do genoma, incluindo na região carboxi-terminal.



DESCRIÇÃO

"PROTEÍNAS V MODIFICADAS DE *Morbillivirus*"

Campo do Invento

Este invento refere-se a vírus de ARN de cadeia simples, de sentido negativo, gerados de forma recombinante e isolados do género *Morbillivirus* possuindo uma ou mais mutações e/ou deleções que reduzem a repressão normalmente causada pela proteína V.

Antecedentes do Invento

Os vírus de ARN de cadeia simples, de sentido negativo, com envelope são organizados e expressos de forma única. O ARN genómico de vírus de cadeia simples de sentido negativo serve duas funções de molde no contexto de uma nucleocápside: como molde para a síntese de ARNs mensageiros (ARNms) e como molde para a síntese da cadeia antigenoma (+). A replicação viral ocorre após a síntese dos ARNms e requer a síntese contínua de proteínas virais. A cadeia do antigenoma (+) sintetizada de novo serve como molde para a geração de mais cópias do ARN genómico de cadeia (-).

O complexo ARN-polimerase dependente de ARN actua e consegue a transcrição e replicação através do

acoplamento dos sinais que actuam em *cis* na extremidade 3' do genoma, em particular, na região do promotor. Os genes virais são então transcritos unidireccionalmente a partir do molde do genoma da sua extremidade 3' para 5'.

Com base na reclassificação revista em 1993 pelo Internacional Committee on the Taxonomy of Viruses, foi estabelecida uma Ordem, designada *Mononegavirales*. Esta Ordem contém três famílias de vírus com envelope com genomas de ARN não segmentados e de cadeia simples de polaridade negativa (sentido negativo). Estas famílias são a *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Filoviridae*. A família *Paramyxoviridae* foi ainda dividida em duas subfamílias, *Paramyxovirinae* e *Pneumovirinae*. A subfamília *Paramyxovirinae* contém três géneros, *Respirovirus* (anteriormente *Paramixovirus*), *Rubulavirus* e *Morbillivirus*. A subfamília *Pneumovirinae* contém o género *Pneumovirus*. A nova classificação é baseada em critérios morfológicos, na organização do genoma viral, nas actividades biológicas e no parentesco de sequência dos genes e produtos génicos. A actual classificação taxonómica dos *Morbillivirus* é como se segue:

Ordem *Mononegavirales*

Família *Paramyxoviridae*

Subfamília *Paramyxovirinae*

Género *Morbillivirus*

Vírus do sarampo

Morbillivirus do golfinho

Vírus da esgana canina

Vírus da peste dos pequenos ruminantes

Vírus da esgana das focas

Vírus da peste bovina

Para muitos destes vírus, não está disponível qualquer tipo de vacina. Assim, há a necessidade de desenvolver vacinas contra tais patógenos humanos e animais. Tais vacinas teriam que provocar uma resposta imunitária protectora no receptor. As características qualitativas e quantitativas de uma resposta tão favorável são extrapoladas a partir das observadas nos sobreviventes da infecção pelo vírus natural, que, em geral, estão protegidos de reinfecção pelo mesmo vírus ou vírus altamente aparentados durante um período significativo subsequente.

Na tentativa de desenvolver tais vacinas pode ser considerada uma variedade de abordagens, incluindo a utilização de: (1) vacinas de proteínas virais individuais purificadas (vacinas de subunidade); (2) preparações de vírus inteiros inactivados; e (3) vírus vivos atenuados.

As vacinas de subunidade têm a característica

desejável de serem puras, definíveis e produzidas em abundância de forma relativamente fácil através de vários meios, incluindo métodos de expressão de ADN recombinante. Até à data, com a excepção notável do antigénio de superfície da hepatite B, as vacinas de subunidade virais provocam geralmente apenas uma imunidade de curta duração e/ou inadequada, particularmente em receptores ingénuos.

Preparações de vírus inteiros inactivados com formalina da poliomielite (IPV) e da hepatite A provaram ser seguras e eficazes. Em contraste, a imunização com vírus inteiros inactivados de forma semelhante tais como vacinas do vírus sincicial respiratório e do vírus do sarampo provocaram respostas imunitárias desfavoráveis e/ou perfis de resposta que predispunham os vacinados a doença exagerada ou aberrante quando confrontados subsequentemente com o vírus natural ou de "tipo selvagem".

Os derivados vivos apropriadamente atenuados de vírus de tipo selvagem oferecem uma distinta vantagem como candidatos a vacinas. Como agentes vivos, que se replicam, eles iniciam a infecção nos receptores durante a qual os produtos dos genes virais são expressos, processados e apresentados no contexto das moléculas do MHC de classe I e II específicas dos vacinados, provocando respostas imunitárias humorais e mediadas por células, bem como padrões coordenados de citocinas e quimocinas, que se assemelham ao perfil imunitário protector dos sobreviventes da infecção natural.

Este padrão de resposta imunitária favorável contrasta com as respostas delimitadas provocadas pelas vacinas inactivadas ou de subunidade, que são tipicamente e amplamente restringidas ao braço de vigilância imunitária humoral. Mais, o perfil da resposta imunitária provocada por algumas vacinas de vírus inteiros inactivados com formalina, p. ex., as vacinas do vírus do sarampo e do vírus sincicial respiratório desenvolvidas na década de 1960, não só não conseguiram proporcionar uma protecção sustentada, como de facto conduziram a uma predisposição a doença aberrante, exagerada e mesmo fatal, quando o receptor da vacina era confrontado mais tarde com o vírus de tipo selvagem.

Embora os vírus vivos atenuados tenham características altamente desejáveis como candidatos a vacinas, provou-se que eram difíceis de desenvolver. As principais dificuldades residem na necessidade de isolar um derivado do vírus de tipo selvagem que tenha perdido o seu potencial de produção de doença (*i.e.* a virulência), ao mesmo tempo que mantém uma competência de replicação suficiente para infectar o receptor e provocar o perfil de resposta imunitária desejado numa abundância adequada.

Historicamente, este delicado equilíbrio entre virulência e atenuação foi conseguido através de passagem em série de um isolado viral de tipo selvagem através de diferentes tecidos ou células hospedeiros sob condições variáveis de crescimento (tais como temperatura). Este

processo favorece presumivelmente o crescimento de variantes virais (mutantes), algumas das quais possuem a característica favorável de atenuação. Ocasionalmente, também é conseguida mais atenuação através de mutagénese química.

Este esquema de propagação/passagem conduz tipicamente à emergência de derivados de vírus que são sensíveis à temperatura, adaptados ao frio e/ou alterados no seu espectro de hospedeiros - cujo um ou todos são mudanças dos vírus de tipo selvagem, causadores de doença - *i.e.* mudanças que podem ser associadas a atenuação.

Diversas vacinas de vírus vivos, incluindo aquelas para a prevenção do sarampo e da papeira (que são paramixovírus), e para a protecção contra a poliomielite e a rubéola (que são vírus de ARN de cadeia positiva), foram geradas através desta abordagem e proporcionam o pilar dos actuais regimes de imunização infantil em todo mundo.

Não obstante, isto significa que gerar candidatos a vacinas de vírus vivos atenuados é demorado e, no melhor dos casos, imprevisível, assentando grandemente no crescimento selectivo desses mutantes genómicos de ocorrência aleatória com características de atenuação desejáveis. Os vírus resultantes podem ter o fenótipo desejado *in vitro*, e parecem mesmo estar atenuados nos modelos animais. No entanto, demasiado frequentemente permanecem sob-atenuados ou sobre-atenuados no hospedeiro

humano ou animal para quem se pretende que sejam candidatos a vacinas.

Mesmo em relação às vacinas actuais em uso, há ainda a necessidade de vacinas mais eficazes. Por exemplo, as vacinas actuais do sarampo proporcionam uma protecção razoavelmente boa. No entanto, as recentes epidemias de sarampo sugerem deficiências na eficácia das vacinas actuais. Apesar da imunização materna, ocorreram taxas elevadas de infecção aguda de sarampo em crianças com idade inferior a um ano, reflectindo a incapacidade das vacinas para induzir níveis de anticorpos anti-sarampo comparáveis aos desenvolvidos após uma infecção de sarampo de tipo selvagem (entradas 1, 2 e 3 na Bibliografia). Como resultado, as mães imunizadas com vacinas são menos capazes de proporcionar aos seus bebés anticorpos passivos derivados através da placenta suficientes para proteger os recém-nascidos para além dos primeiros meses de vida.

As infecções agudas de sarampo em adolescentes previamente imunizados e em adultos jovens apontam para um problema adicional. Estas falhas secundárias das vacinas indicam limitações na capacidade das vacinas actuais para induzirem e manterem uma protecção antiviral que seja abundante e de longa duração (4, 5 e 6). Recentemente, foi revelado ainda um outro potencial problema. A proteína hemaglutinina do isolado de sarampo de tipo selvagem mostrou ao longo dos últimos 15 anos uma distância progressivamente crescente das estirpes de vacina (7). Esta

"deriva antigénica" levanta preocupações legítimas de que as estirpes de vacina possam não conter o repertório antigénico ideal necessário para proporcionar uma protecção óptima. Assim, há a necessidade de vacinas melhoradas.

A concepção racional de vacinas seria ajudada por uma melhor compreensão destes vírus, em particular, pela identificação dos determinantes de virulência viralmente codificados bem como das mudanças genómicas que são responsáveis pela atenuação.

Devido à sua significância como principal causa de morbilidade e mortalidade humanas, o vírus do sarampo foi estudado de forma bastante extensa. O vírus do sarampo é uma grande partícula relativamente esférica, com envelope composta por dois compartimentos, uma membrana lipoproteica e um núcleo de uma partícula ribonucleoproteica, possuindo cada um funções biológicas distintas (8). O envelope do virião é uma membrana plasmática derivada da célula do hospedeiro modificada por três proteínas especificadas pelo vírus: A hemaglutinina (H; aproximadamente 80 quilodaltons (kD)) e as glicoproteínas de fusão ($F_{1,2}$; aproximadamente 60 kD) projectam-se na superfície do virião e conferem à partícula viral capacidades de ligação e entrada na célula hospedeira (9). Os anticorpos para H e/ou F são considerados protectores uma vez que neutralizam a capacidade do vírus para iniciar a infecção (10, 11 e 12). A proteína da matriz (M; aproximadamente 37 kD) é a proteína anfipática que reveste a superfície interna da

membrana, que se pensa orquestrar a morfogénese do virião e consumir assim a reprodução do vírus (13). O núcleo do virião contém o ARN genómico de 15894 nucleótidos de comprimento sobre o qual é conferida a actividade de molde através da sua íntima associação com aproximadamente 2600 moléculas da proteína da nucleocápside (N) de aproximadamente 60 kD (14, 15 e 16). Frouxamente associados a esta partícula helicoidal de ribonucleoproteína com aproximadamente um micrómetro de comprimento estão níveis enzimáticos da ARN-polimerase dependente do ARN viral (L; aproximadamente 240 kD) que concertada com o cofactor da polimerase (P; aproximadamente 70 kD), e talvez ainda outras proteínas especificadas pelo vírus bem como codificadas pelo hospedeiro, transcreve e replica as sequências do genoma do vírus do sarampo (17).

As seis proteínas estruturais do virião do vírus do sarampo são codificadas por seis genes contíguos, que não se sobrepõem e que são alinhados como se segue: 3'-N-P-M-F-H-L-5'. Foram também identificados mais dois produtos génicos do vírus do sarampo com uma função até agora incerta. Estas duas proteínas não estruturais, conhecidas como C (aproximadamente 20 kD) e V (aproximadamente 45 kD), são ambas codificadas pelo gene P. A proteína C é codificada por um segundo enquadramento de leitura dentro do ARNm de P. A proteína V é codificada por um ARNm derivado do gene P editado co-transcricionalmente que codifica uma proteína híbrida possuindo as sequências amino-terminais de P e um domínio carboxi-terminal rico em

cisteína semelhante a um dedo de zinco que falta na proteína P (9).

Todos os *Morbillivirus* produzem uma proteína V (18), incluindo o vírus do sarampo, o vírus da peste bovina, o vírus da esgana canina e o vírus da esgana das focas (19). A proteína V do vírus do sarampo é uma proteína não estrutural codificada pelo gene P (8). Tal como a maioria dos paramixovírus, o vírus do sarampo codifica múltiplas proteínas a partir do gene P incluindo a proteína V, a proteína P e a proteína C (9). A tradução de ambas as proteínas P e V inicia-se no mesmo codão de metionina resultando em polipéptidos que são idênticos para os primeiros 230 aminoácidos. O terminal carboxilo (terminal C) da proteína V difere da proteína P porque a edição do ARN ocorre nalguns ARNms do gene P que causam uma mudança de enquadramento que resulta na tradução de um único terminal C da proteína V mais curto (18). A sequência de aminoácidos da proteína C não se relaciona com a proteína V e P porque é traduzida inteiramente a partir de um enquadramento de leitura diferente que começa num codão de iniciação da tradução a jusante (20).

Os ARNms de P e V do vírus do sarampo partilham o mesmo codão de iniciação e os primeiros 230 aminoácidos das proteínas P e V são idênticos. O ARNm de V contém uma inserção do resíduo "G" que expande a sequência "GGG" nos nucleótidos 2496 a 2498 para incluir um quarto resíduo "G". A edição ocorre durante a transcrição quando um resíduo "G"

extra não dirigido pelo molde é inserido entre os nucleótidos 2495 e 2499, causando uma mudança no enquadramento de leitura, pela qual os 276 aminoácidos carboxi-terminais da proteína P são substituídos por um carboxi-terminal de 68 aminoácidos rico em cisteína da proteína V.

A função da proteína V não é bem compreendida, mas todos os *Morbillivirus* codificam uma proteína V. Isto indica que a proteína V executa funções benéficas que tornaram vantajoso aos *Morbillivirus* conservar a capacidade de sintetizar a proteína V. Sabe-se que a expressão da proteína V não é essencial para a replicação viral em células em cultura (19, 21-25), mas em sistemas modelo animais a expressão da proteína V parece influenciar a gravidade da infecção. Por exemplo, o vírus de Sendai (um paramixovírus não *Morbillivirus*) produz normalmente pneumonia em sistemas modelo de ratinho mas é menos virulento se a infecção for efectuada com um vírus recombinante que seja deficiente para a expressão da proteína V (22 e 26). O vírus da parainfluenza de tipo 3 humano recombinante (outro paramixovírus não *Morbillivirus*) exhibe também um fenótipo atenuado em roedores e macacos se um defeito na expressão da proteína D for combinado com um defeito no enquadramento de leitura aberto da proteína V (23).

De forma semelhante, os resultados dos estudos com sistemas modelo animais utilizados para o vírus do

sarampo sugerem também um papel para a proteína V na patogenicidade. A infecção do pulmão do rato do algodão pelo vírus do sarampo recombinante gera menos descendência viral se o vírus infectante for deficiente para a expressão da proteína V (27). Também, a sobrevivência de timócitos humanos em tecido transplantado em ratinhos SCID era menos susceptível à infecção com vírus do sarampo se o vírus infectante não expressasse a proteína V (28). Finalmente, ratinhos CD46 transgênicos inoculados intracranialmente com vírus do sarampo tinham maiores taxas de sobrevivência se o vírus não expressasse a proteína V (29). A conclusão de que a proteína V do vírus do sarampo tem um papel na patogenicidade é também suportada pelas análises da sequência que verificaram mutações na região de codificação da proteína V nas variantes menos patogénicas ou nas estirpes de vacina (30 e 31). Tomados em conjunto, estes resultados apoiam a hipótese de que a proteína V tem um papel importante na determinação da virulência do vírus do sarampo e de vários outros paramixovírus.

Embora pareça claro que a proteína V pode influenciar o curso da infecção, o mecanismo por detrás deste fenómeno não é conhecido. Os resultados de vários estudos começaram a atribuir potenciais funções à proteína V. Por exemplo, mostrou-se que as sequências de aminoácidos partilhadas pela proteína V e pela proteína P medeiam a interacção com a proteína da nucleocápside (N) viral (27 e 32-39). Esta interacção entre a proteína V e a proteína N parece afectar a distribuição celular da proteína N (27,

40, 41) e tem provavelmente algumas funções adicionais não identificadas. Verificou-se também que algumas proteínas V interagem com proteínas celulares (42, 43), e no exemplo do vírus símio 5 (SV5), é possível que a interacção com uma proteína celular seja responsável pela inibição da via de sinalização do interferão durante a infecção (44). Para além das interacções proteína-proteína que envolvem a proteína V, vários estudos ligaram a proteína V a mecanismos de controlo que regulam a expressão e replicação génica viral. A expressão da proteína V do vírus de Sendai num sistema de expressão transiente inibe a replicação de uma partícula deficiente-de interferência (DI) (45) e inibe de forma semelhante a replicação da partícula DI numa reacção de transcrição *in vitro* (35). Consistente com estas observações que relacionam a proteína V com repressão, foi observado que diversos vírus deficientes para a expressão da proteína V produzem níveis elevados de ARN genómico, ARNm e de proteínas virais durante a infecção (21, 26, 27).

Para além das propriedades agora descritas, todas as proteínas V virais contêm um terminal C rico em cisteína. As proteínas V dos paramixovírus não partilham um grau elevado de semelhança de aminoácidos, mas todas contêm sete resíduos de cisteína posicionados de forma idêntica (46). Esta característica impressionante conduziu à especulação (47) de que as proteínas V possam realmente ser proteínas de dedo de zinco ou que pelo menos formem algum tipo de estrutura secundária coordenada por zinco (48, 49, 50), e, de facto, verificou-se que várias proteínas V se

ligam a zinco (51, 52, 53). A possibilidade da proteína V formar uma estrutura coordenada por zinco gera um interesse considerável porque estes tipos de estruturas formam frequentemente domínios proteicos que estão envolvidos na interacção de ácidos nucleicos ou na interacção proteína-proteína (48, 49, 50). É também digno de nota que um vírus de Sendai recombinante que expresse uma proteína V truncada sem a região C-terminal única é também menos patogénico, sugerindo que o papel da proteína V na patogenicidade requer este domínio (24).

Para além das sequências que codificam as proteínas especificadas pelo vírus, o genoma do vírus do sarampo contém domínios não codificantes de proteína distintivos que se assemelham aos que dirigem as vias transcricional e replicativa de vírus aparentados (9, 54). Estes sinais reguladores encontram-se nas extremidades 3' e 5' do genoma do vírus do sarampo e em curtas regiões internas que abrangem cada fronteira intercistronica. Os últimos codificam o putativo promotor e/ou elementos reguladores da sequência que dirigem a transcrição genómica, a encapsidação do genoma e do antigenoma e a replicação. Os últimos sinalizam a terminação da transcrição e a poliadenilação de cada ARNm viral monocistronico e depois o reinício da transcrição do gene seguinte. Em general, o complexo da polimerase do vírus do sarampo parece responder a estes sinais muito como as ARN-polimerases dependentes de ARN de outros vírus de ARN de cadeia negativa não segmentados (9, 54, 55, 56). A

transcrição inicia-se na extremidade 3' do genoma do vírus do sarampo ou próximo desta e prossegue então no sentido 5' produzindo ARNms monocistrônicos (16, 54, 57).

O vírus do sarampo parece ter prolongado os seus domínios reguladores terminais para além dos limites das sequências líder e de codificação reboque (54). Para o sarampo, estas regiões englobam os 107 nucleótidos genómicos a 3' (a "região genómica promotora 3'", também referida como o "promotor prolongado", que compreende 52 nucleótidos que codificam a região líder, seguidos de três nucleótidos intergénicos, e 52 nucleótidos que codificam a região não traduzida 5' do ARNm de N) e os 109 nucleótidos da extremidade 5' (69 codificam a região não traduzida 3' do ARNm de L, o trinucleótido intergénico e 37 nucleótidos que codificam o reboque). Dentro destes aproximadamente 100 nucleótidos 3'-terminais tanto do genoma como do antigenoma existem duas regiões curtas de sequência nucleotídica partilhada: 14 de 16 nucleótidos nas extremidades 3' absolutas do genoma e do antigenoma são idênticos. Interna a esses terminais, foi encontrada uma região adicional de 12 nucleótidos de absoluta identidade de sequência. A sua posição nos locais em que a transcrição do genoma do vírus do sarampo se deve iniciar e a replicação do antigenoma deve começar e próximo destes, sugere que estes curtos domínios únicos da sequência englobam uma região promotora prolongada.

Estes elementos discretos da sequência podem

ditar locais alternativos da iniciação da transcrição - o domínio interno exigindo a iniciação da transcrição no local de início do gene N, e o domínio 3'-terminal dirigindo a produção do antígenoma (54, 58, 59). Para além do seu papel regulador como determinantes que actuam em *cis* da transcrição e da replicação, estas regiões promotoras genómicas e antígenómicas prolongadas a 3' codificam as extremidades 5' nascentes dos ARNs do antígenoma e do genoma, respectivamente. Dentro destes ARNs nascentes reside como sinais ainda não identificados para a nucleação da proteína N, outro elemento regulador chave necessário para a formação do molde da nucleocápside e consequentemente para a amplificação da transcrição e da replicação.

Em todos os *Morbillivirus*, os sinais de acção em *cis* necessários para funções virais essenciais, incluindo a replicação, a transcrição e a encapsidação estão contidos nos terminais genómicos não codificantes. Os elementos obrigatórios de acção em *trans* para a funcionalidade estão contidos nos genes N, P e L. Factores de acção em *trans* adicionais, tais como as proteínas V e C, podem modular a funcionalidade. Mutações em qualquer uma destas regiões podem resultar na alteração de funções vitais, incluindo atenuação da eficiência da transcrição/replicação viral.

A aparente ligação entre a expressão da proteína V e a patogenicidade, e o interesse contínuo na atenuação de vacinas (30, 60) conduziram à necessidade de examinar

mais detalhadamente a função da proteína V do vírus do sarampo. Em particular, existe a necessidade de utilizar sistemas de expressão transiente para estudar diversas propriedades da proteína V incluindo a actividade de repressão da proteína V, a interacção da proteína V com a proteína N e a capacidade da proteína V para se ligar a ARN.

Sumário do Invento

Concordantemente, é um objecto deste invento identificar regiões dos genomas de *Morbillivirus* responsáveis pela repressão da expressão génica através da proteína V desses vírus. É outro objecto deste invento gerar versões mutantes da proteína V de *Morbillivirus* nas quais a repressão da expressão génica seja reduzida. É ainda outro objecto deste invento gerar *Morbillivirus* gerados de forma recombinante contendo uma ou mais dessas mutações. É ainda outro objecto deste invento formular vacinas ou composições imunogénicas contendo tais *Morbillivirus* gerados de forma recombinante. Numa concretização do invento, a proteína V é do vírus do sarampo.

Estes e outros objectos do invento tal como discutidos abaixo são alcançados para *Morbillivirus* através de um vírus de ARN de cadeia simples de sentido negativo não segmentado, gerado de forma recombinante, isolado do género *Morbillivirus* tal como definido na reivindicação 1. Numa concretização do invento, estes aminoácidos são

mutados para alanina.

Outra modificação da proteína V pode ser feita através da mutação ou deleção de pelo menos uma porção da região carboxi-terminal (C-terminal) da proteína V de *Morbillivirus*, correspondendo aos aminoácidos 231-299 da proteína V do vírus do sarampo, do vírus da esgana canina e do *Morbillivirus* do golfinho, e aos aminoácidos 231-303 do vírus da peste bovina.

Estas modificações têm o efeito de reduzir a repressão da expressão génica pela proteína V num sistema de mini-replicação. Os resultados são facilmente estendidos à recuperação de *Morbillivirus* infeccioso inteiro através da utilização do sistema de "recuperação" conhecido na arte e descrito abaixo.

O mini-replicação do vírus do sarampo com expressão do gene repórter da cloranfenicol-acetiltransferase (CAT) em ensaios transientes foi fortemente reprimido pela proteína V. A actividade de repressão foi diminuída pela substituição de aminoácidos numa região situada no terço amino-terminal da proteína entre os aminoácidos 112-134, bem como através de mutação ou deleção pelo menos numa porção da região C-terminal rica em cisteína da proteína V (aminoácidos 231-299).

No caso do vírus do sarampo, as mutações descritas acima podem ainda ser combinadas com mutações que

são atenuantes, como se segue:

1) pelo menos uma mutação atenuante na região promotora genómica 3' seleccionada a partir do grupo que consiste no nucleótido 26 (A → T), nucleótido 42 (A → T ou A → C) e no nucleótido 96 (G → A), onde estes nucleótidos são apresentados na cadeia positiva, antigenómica, no sentido da mensagem;

2) pelo menos uma mutação atenuante no gene da ARN-polimerase seleccionada a partir do grupo que consiste nas mudanças de nucleótidos que produzem mudanças num aminoácido seleccionado a partir do grupo que consiste nos resíduos 331 (isoleucina → treonina), 1409 (alanina → treonina), 1624 (treonina → alanina), 1649 (arginina → metionina), 1717 (ácido aspártico → alanina), 1936 (histidina → tirosina), 2074 (glutamina → arginina) e 2114 (arginina → lisina);

3) para o gene N, pelo menos uma mutação atenuante seleccionada a partir do grupo que consiste nas mudanças de nucleótidos que produzem mudanças num aminoácido seleccionado a partir do grupo que consiste nos resíduos 129 (glutamina → lisina), 148 (ácido glutâmico → glicina) e 479 (serina → treonina);

4) para o gene P, pelo menos uma mutação atenuante seleccionada a partir do grupo que consiste nas mudanças de nucleótidos que produzem mudanças num aminoácido seleccionado a partir do grupo que consiste nos resíduos 225 (ácido glutâmico → glicina), 275 (cisteína → tirosina) e 439 (leucina → prolina);

5) para o gene C, pelo menos uma mutação

atenuante seleccionada a partir do grupo que consiste nas mudanças de nucleótidos que produzem mudanças num aminoácido seleccionado a partir do grupo que consiste nos resíduos 73 (alanina → valina), 104 (metionina → treonina) e 134 (serina → tirosina); e

6) para o sinal de terminação do gene F (sinal de terminação da transcrição que actua em *cis*), a mudança no nucleótido 7243 (T → C), onde estes nucleótidos são apresentados na cadeia positiva, antigenómica, isto é, no sentido da mensagem (codificação).

Noutra concretização deste invento, estes *Morbillivirus* mutantes são utilizados para preparar vacinas ou composições imunogénicas que provocam uma resposta imunitária protectora contra a forma de tipo selvagem de cada vírus.

Noutra concretização deste invento, é descrito um método para reduzir a repressão causada por uma proteína V de *Morbillivirus* que compreende a inserção de pelo menos uma mutação na proteína V de *Morbillivirus*, em que a referida mutação é seleccionada a partir do grupo que consiste na mutação dos aminoácidos 113 e 114.

Ainda noutra concretização deste invento, é descrita uma sequência nucleotídica isolada codificando uma proteína V de *Morbillivirus* que foi modificada através da inserção de pelo menos uma mutação na proteína V de *Morbillivirus*, em que a referida mutação é seleccionada a

partir do grupo que consiste na mutação dos aminoácidos 113 e 114 da proteína V do vírus do sarampo ou dos aminoácidos de uma proteína V de *Morbillivirus* que correspondam a estes.

Ainda noutra concretização deste invento, é proporcionada uma composição que compreende um vector de transcrição compreendendo uma molécula de ácido nucleico isolada codificando um genoma ou antígenoma de um *Morbillivirus*, em que a porção da molécula de ácido nucleico isolada que codifica a proteína V é a sequência nucleotídica que foi modificada através da inserção de pelo menos uma mutação na proteína V de *Morbillivirus*, em que a referida mutação é seleccionada a partir do grupo que consiste na mutação dos aminoácidos 113 e 114 da proteína V do vírus do sarampo ou dos aminoácidos de uma proteína V de *Morbillivirus* que correspondem a estes, juntamente com pelo menos um vector de expressão que compreenda pelo menos uma molécula de ácido nucleico isolada codificando as proteínas de acção em *trans* N, P e L necessárias para a encapsidação, transcrição e replicação, pelo que células hospedeiras são transformadas, infectadas ou transfectadas com estes vectores e cultivadas sob condições que permitam a co-expressão destes vectores para produzir o *Morbillivirus* desejado. Cada um desses vírus é então utilizado para preparar vacinas ou composições imunogénicas que provoquem uma resposta imunitária protectora contra a forma de tipo selvagem de cada vírus.

Breve Descrição das Figuras

A Figura 1A representa os quatro vectores plasmídicos de expressão utilizados para as transfecções. Os vectores de expressão dependentes da ARN-polimerase T7 (61) foram preparados para dirigir a expressão dos genes N, P, L ou V de tipo selvagem de Edmonston em células infectadas com MVA/T7 (62).

A Figura 1B representa o mini-replicação que foi derivado de pMV107-CAT (63). A sequência líder da vacina do vírus do sarampo de Edmonston em pMV107-CAT foi convertida na sequência de tipo selvagem (60). A transcrição do ADN plasmídico do mini-replicação através da ARN-polimerase T7 gerou uma cópia do mini-replicação de ARN de sentido negativo em células transfectadas.

A Figura 1C representa um ensaio de CAT que demonstra o efeito da expressão da proteína V na actividade do mini-replicação num ensaio de expressão transiente. A pista 1 foi o controlo positivo obtido a partir das células que foram transfectadas com todos os vectores plasmídicos (N, P e L) necessários para dirigir a expressão do mini-replicação. A pista 2 foi idêntica à pista 1, excepto que as células foram transfectadas com todos os plasmídeos excepto o vector da polimerase L. Nas pistas 3 a 7, foram incluídas na transfecção quantidades crescentes de vector de expressão da proteína V. A massa total de ADN transfectado foi mantida constante através da inclusão da quantidade

apropriada de ADN do vector sem qualquer inserção. A actividade relativa de CAT foi calculada com base na actividade de 100% na pista 1.

Figura 2 representa uma comparação das sequências de aminoácidos das proteínas V de quatro *Morbillivirus* diferentes. A sequência de aminoácidos da proteína V do vírus do sarampo de tipo selvagem de Edmonston (número de acesso do GeneBank AF266288) (SEQ ID NO: 1) foi comparada com a do vírus da esgana canina (AF014953) (SEQ ID NO: 4), a do vírus da peste bovina (Z30697) (SEQ ID NO: 2) e a do *Morbillivirus* do golfinho (Z47758) (SEQ ID NO: 3). As regiões contendo níveis mais elevados de identidade estão sublinhadas com uma barra estriada e são designadas como regiões conservadas (CR1 a CR6). As sequências notáveis adicionais estão sublinhadas com uma barra preta. Estas incluem regiões envolvidas na interacção da proteína V (e P) com a proteína N (34), uma região envolvida na localização celular do complexo de proteínas V-N (27, 64), e a região rica em cisteína contendo o domínio de ligação a zinco (51). Outras sequências de interesse incluem uma região básica entre 229-234, uma substituição de aminoácidos da vacina do vírus do sarampo (ácido glutâmico para glicina) na posição 225 (30), e uma região de repetição de leucina remanescente de um fecho de leucina entre as posições 93-107 (65, 66). A região comum à proteína V e P prolonga-se do aminoácido 1-230 e as sequências únicas da proteína V (letras de aminoácidos a cheio) prolongam-se de 231-299. As posições de aminoácidos

dadas na Figura ao longo do topo das sequências alinhadas correspondem às da proteína V do vírus do sarampo.

A Figura 3 representa um mapa dos vectores de expressão da proteína V do vírus do sarampo mutante. Os vectores de expressão da proteína V marcados com epitopo utilizados nestes estudos são mostrados de forma esquemática. Os vectores da proteína V mutante foram gerados numa estrutura do plasmídeo vector que expressava a proteína V com uma etiqueta HA do vírus da gripe (67) em vez da metionina iniciadora da proteína V. Os destaques da sequência são mostrados num mapa da proteína V no topo da Figura e são descritos mais completamente em relação à descrição da Figura 2 acima. As proteínas de tipo selvagem (haV-wt) e mutantes (haV1-11) são ilustradas abaixo do mapa da proteína V. A etiqueta HA é desenhada como uma caixa estriada no terminal amino e a restante sequência da proteína V é desenhada como uma caixa aberta. As substituições de aminoácidos estão indicadas como pontos pretos juntamente com as posições dos aminoácidos e as mudanças de aminoácidos. Os mutantes de deleção ou truncagem estão desenhados com um mapa da proteína V interrompido. A Figura 4A representa a repressão do mini-replicação por proteínas V de vírus do sarampo mutantes, na forma de um ensaio de CAT mostrando os resultados de uma experiência de expressão transiente testando a actividade das proteínas V mutantes (haV-1 a haV-8; ver a descrição para a Figura 3). A quantidade de vector de proteína V (200 ou 400 ng) e a identidade dos mutantes são mostradas na

Figura 4A por baixo do ensaio de CAT. A actividade relativa é calculada como uma percentagem da pista 2 que foi derivada de uma transfecção efectuada sem qualquer vector de expressão da proteína V. A pista 1 foi um controlo negativo efectuado sem a proteína L.

A Figura 4B representa um "Western blot" efectuado para monitorizar a expressão da proteína V em experiências de expressão transiente. As pistas 1 e 2 são controlos negativos derivados de células transfectadas na ausência de um vector da proteína V (pista 1) ou transfectadas com um vector da proteína V que expressa uma proteína V sem uma etiqueta. O "Western blot" foi sondado com anticorpo anti-HA.

A Figura 4C representa uma análise da repressão do mini-replicação através de haV-1 utilizando quantidades crescentes (100 ng a 1 µg) do vector de expressão.

Figura 5 representa a actividade de ligação ao ARN associada à proteína V do vírus do sarampo. Os extractos citoplasmáticos brutos preparados a partir de células transfectadas através de lise com NP40 foram analisados quanto à actividade de ligação ao ARN utilizando contas de agarose ligadas a homopolímeros de polirribonucleótidos. Um diagrama de fluxo ilustrando o procedimento é mostrado na Figura 5A. A Figura 5B representa "Western blots" utilizados para examinar proteínas capturadas nas resinas de polirribonucleótidos. As células

foram transfectadas utilizando as mesmas condições utilizadas para as experiências de mini-replicação (pistas 1-8), excepto que nalguns transfecções as células foram transfectadas apenas com o vector de expressão de haV (pistas 9-12). As pistas 1-4 representam uma análise da ligação da proteína N às quatro resinas de polinucleótidos diferentes. As pistas 5-12 representam uma análise da fracção ligada para a proteína haV. De forma semelhante, as pistas 9-16 representam uma análise da proteína V que se liga a poli(G) na presença de EGTA (EG), EDTA (ED) ou ARN de levedura (ARN).

A Figura 6 representa a ligação ao ARN por proteínas V de vírus do sarampo mutantes. O ensaio de ligação do homopolímero de polirribonucleótidos descrito na Figura 5 foi utilizado para análise de proteínas V de vírus do sarampo mutantes (haV 1-11, pistas 3-13; ver a descrição para a Figura 3). Nesta experiência, as células foram transfectadas apenas com vectores de expressão de V. O extracto celular examinado na pista 1 foi um controlo negativo que continha proteína V que não continha uma etiqueta de epitopo. Poli(G) foi utilizada para testar todas as proteínas mutantes.

A Figura 7 representa uma comparação das sequências de aminoácidos em CR2 (aminoácidos 100-140) para a proteína V do vírus do sarampo de tipo selvagem, designada haV (SEQ ID NO: 7); um mutante onde a tirosina no aminoácido 113 e o ácido aspártico no aminoácido 114 são

substituídos por alaninas, designado haV-5 (SEQ ID NO: 8); um mutante onde os aminoácidos 112-134 são suprimidos, designado haV-23 (SEQ ID NO: 9); um mutante onde o ácido aspártico no aminoácido 114 e a histidina no aminoácido 115 são substituídos por alaninas, designado haV-24 (SEQ ID NO: 10); e um mutante onde a tirosina no aminoácido 113, o ácido aspártico no aminoácido 114 e a histidina no aminoácido 115 são substituídos por alaninas, designado haV-25 (SEQ ID NO: 11).

A Figura 8 descreve o efeito das mutações de CR2 descritas na Figura 7 num ensaio de CAT que demonstrou o efeito da expressão da proteína V na actividade do mini-replicação num ensaio de expressão transiente. A barra 1 era o controlo positivo obtido a partir de células que foram transfectadas com todos os vectores plasmídicos (N, P e L) necessários para dirigir a expressão do mini-replicação. A barra 2 era idêntica à barra 1, excepto que as células foram também transfectadas com um vector de expressão codificando haV; nas barras 3-6, as células foram transfectadas com vectores de expressão codificando as mutações de CR2 indicadas. A actividade relativa de CAT foi calculada com base na actividade de 100% na barra 1.

A Figura 9 representa uma comparação das sequências de aminoácidos no terminal C (aminoácidos 220-299) para a proteína V do vírus do sarampo de tipo selvagem, designada haV (SEQ ID NO: 12); um mutante onde os aminoácidos 232-299 estão suprimidos, designado haV-1 (SEQ

ID NO: 13); um mutante onde as cisteínas nos aminoácidos 251 e 255 são substituídas por alaninas, designado haV-12 (SEQ ID NO: 14); um mutante onde as cisteínas dos aminoácidos 269 e 272 são substituídas por alaninas, designado haV-13 (SEQ ID NO: 15); um mutante onde os aminoácidos 279-299 são suprimidos, designado haV-14 (SEQ ID NO: 16); um mutante onde os aminoácidos 267-299 são suprimidos, designado haV-15 (SEQ ID NO: 17); um mutante onde os aminoácidos 250-299 são suprimidos, designado haV-16 (SEQ ID NO: 18); um mutante onde os aminoácidos 243-299 são suprimidos, designado haV-17 (SEQ ID NO: 19); um mutante onde os aminoácidos 236-299 são suprimidos, designado haV-18 (SEQ ID NO: 20); um mutante onde os aminoácidos 229-299 são suprimidos, designado haV-19 (SEQ ID NO: 21); um mutante onde as argininas dos aminoácidos 233 e 234 são substituídas por alaninas, designado haV-20 (SEQ ID NO: 22); um mutante onde as argininas dos aminoácidos 233 e 234 são cada uma substituídas por ácido aspártico, designado haV-21 (SEQ ID NO: 23); e um mutante onde os aminoácidos 229-237 são suprimidos, designado haV-22 (SEQ ID NO: 24).

A Figura 10 representa o efeito das mutações C-terminais descritas na Figura 9 num ensaio de CAT que demonstrou o efeito da expressão da proteína V na actividade do mini-replicação num ensaio de expressão transiente. A barra 1 era o controlo positivo obtido a partir de células que foram transfectadas com todos os vectores plasmídicos (N, P e L) necessários para dirigir a

expressão do mini-replicação. A barra 2 era idêntica à barra 1, excepto que as células foram também transfectadas com um vector de expressão codificando haV; nas barras 3-14, as células foram transfectadas com vectores de expressão codificando as mutações C-terminais indicadas. A actividade relativa de CAT foi calculada com base na actividade de 100% na barra 1.

Descrição Detalhada do Invento

Embora exemplificado com o vírus do sarampo, o invento é também aplicável a outros *Morbillivirus*, incluindo mas não se limitado ao vírus da esgana canina e ao vírus da peste bovina.

Uma consideração da potencial ligação entre a atenuação do vírus do sarampo e os mecanismos envolvidos no controlo da expressão génica e da replicação (30, 60) conduziu à análise da proteína V. A expressão da proteína V foi ligada à patogenicidade viral (22, 23, 26-29) e também ao controlo da expressão génica e da replicação (21, 26, 27, 35, 45). O objectivo foi o de analisar melhor o efeito da proteína V na expressão génica do vírus do sarampo.

Antes de construir vectores de expressão de proteínas V mutantes, a semelhança de aminoácidos entre as proteínas V de diversos *Morbillivirus* diferentes foi examinada (Figura 2). As regiões de elevada identidade de aminoácidos podem conter domínios funcionais importantes, e

uma ou mais destas regiões conservadas (CR) podem participar na repressão do mini-replicação. O alinhamento das proteínas V do vírus do sarampo de tipo selvagem de Edmonston, do vírus da peste bovina, do *Morbillivirus* do golfinho e do vírus da esgana canina revelou diversas regiões conservadas de notável identidade de sequência designadas CR1-6 (mostradas na Figura 2), para além de confirmar observações anteriores (46) de que o terminal C continha sete resíduos de cisteína espaçados de forma idêntica entre os *Morbillivirus*. Várias das CRs foram o alvo ao gerar vectores de proteínas V mutantes.

Para além da identificação de regiões contendo elevados níveis de identidade, foi utilizada análise de computador para pesquisar potenciais motivos funcionais e a literatura foi examinada quanto a indícios adicionais a respeito da possível posição dos potenciais domínios funcionais da proteína V do vírus do sarampo. Os resultados destas análises são ilustrados no alinhamento da Figura 2. Diversos estudos encontraram regiões da proteína V e P que influenciam a interacção com a proteína N. A ponta do terminal amino (terminal N) da proteína V e P, situado dentro de CR1, contém sequências que mediam a interacção com a proteína N (34) (Figura 2) num ensaio de dois híbridos. Sequências adicionais envolvidas na interacção proteína-proteína V-N foram localizadas entre os aminoácidos 204 a 230 (27, 64) que abrangem CR4. O domínio de ligação ao zinco da proteína V do vírus do sarampo (51) está no terminal C e requer provavelmente pelo menos vários

dos resíduos de cisteína verificados em CR5 e CR6. Na extremidade do terminal N do domínio rico em cisteína existe uma região bem conservada contendo aminoácidos básicos (229-234) que é parte de CR5. Próximo da mesma região (aminoácido 225) na proteína V do vírus do sarampo está uma substituição de aminoácidos verificada nas estirpes de vacina de Edmonston (ácido glutâmico do tipo selvagem para glicina (30)). Finalmente, na proteína V do vírus do sarampo havia uma repetição de leucina (aminoácidos 93-107) que era remanescente de um motivo fecho de leucina (65, 66). Vários destes domínios e motivos eram candidatos atractivos para mais estudos utilizando o sistema de mini-replicação e os vectores de expressão de proteínas V mutantes.

Para além da preparação de um vector de expressão da proteína V (Figura 1A), foram preparados plasmídeos de expressão de T7 para os três componentes básicos do aparelho de replicação incluindo as proteínas N, P e L de tipo selvagem de Edmonston. Para eliminar qualquer potencial confusão devida à expressão da proteína C a partir do codão de iniciação da tradução a jusante nos vectores da proteína P e V, o enquadramento de leitura aberto da proteína C foi modificado para impedir a tradução da proteína C. O codão ATG da proteína C foi convertido em ACG e o segundo codão no enquadramento de leitura aberto da proteína C foi convertido num codão stop (TCA para TAA). Estas modificações foram silenciosas em relação às proteínas P e V.

Indicações de que a proteína V pode estar envolvida na regulação da transcrição do ARNm do vírus do sarampo e da replicação do genoma (21, 26, 27, 35, 45) sugeriram uma experiência para testar se um sistema de mini-replicação responderia à expressão da proteína V. O sistema de mini-replicação foi preparado com componentes do tipo selvagem de Edmonston de modo a que as mutações do gene V que afectam a função da proteína V de tipo selvagem pudessem ser avaliadas, e para potencialmente aplicar estas descobertas a futuros estudos genéticos de atenuação do vírus utilizando vírus de tipo selvagem recombinante. O mini-replicação do vírus do sarampo de tipo selvagem de Edmonston (Figura 1B, pMVwt107-CAT) foi derivado do mini-replicação de p107MV-CAT (63) através da conversão da sequência líder da vacina em pMV107-CAT na sequência líder do tipo selvagem de Edmonston (60).

Para determinar se os componentes de tipo selvagem eram capazes de dirigir uma expressão detectável do mini-replicação, células HEp2 foram transfectadas com ADN do mini-replicação e os vectores de expressão das proteínas N, P e L infectando simultaneamente com MVA/T7 (62) para proporcionar a ARN-polimerase T7. 48 horas após a transfecção, as células foram colhidas e os extractos celulares foram analisados quanto à actividade de CAT. O sistema de mini-replicação de tipo selvagem de Edmonston produziu prontamente actividade de CAT acima dos níveis de fundo produzidos nos controlos negativos que foram transfectados com todos os DNAs excepto o vector de

expressão da proteína polimerase L (Figura 1C, pistas 1 e 2, e dados não mostrados). Isto indicou que a actividade de CAT produzida durante o ensaio de expressão transiente era específica e dependente de um aparelho de replicação intacto do vírus do sarampo.

O sistema de mini-replicação foi então utilizado para determinar se a expressão da proteína V tinha um efeito detectável na expressão do mini-replicação num ensaio de expressão transiente. As transfecções do ensaio do mini-replicação foram executadas com quantidades crescentes de vector de expressão da proteína V. A massa total de ADN transfectado foi mantida constante através da inclusão da quantidade apropriada de vector de expressão sem qualquer inserção. O efeito do aumento da quantidade de vector de expressão da proteína V de 0 para 400 ng é mostrado na Figura 1C. O controlo positivo na pista 1 mostrou a quantidade de actividade de CAT obtida na ausência de expressão da proteína V (Figura 1C, pista 1). A pista 2 foi um controlo negativo que mostrou que a actividade de CAT era indetectável quando o vector de expressão da proteína L era omitido. As pistas 3-7 ilustram o efeito negativo de quantidades crescentes de expressão da proteína V. A repressão da actividade de CAT foi evidente mesmo nas quantidades mais baixas de vector de expressão da proteína V (pistas 3 e 4) e foi muito forte a quantidades mais elevadas, eliminando virtualmente a expressão detectável do mini-replicação quando foram transfectados 400 ng do plasmídeo de expressão da proteína V (pista 7). Os aumentos

de duas vezes no vector de expressão da proteína V utilizados nas pistas 3-7 também se correlacionaram bem com as diminuições observadas na actividade relativa de CAT. Estes resultados mostram claramente que um aspecto da função da proteína V pode ser observado com um ensaio de mini-replicação. Este efeito negativo facilmente detectável da expressão da proteína V num ensaio de mini-replicação proporcionou um formato conveniente para examinar melhor o fenótipo de repressão do mini-replicação de mutantes da proteína V.

Para começar a analisar mutantes da proteína V, o vector de expressão da proteína V (Figura 1A) foi modificado para incluir uma etiqueta de epitopo no terminal amino da proteína V (pMV-haV-wt; Figura 3). Isto foi feito para facilitar a detecção por "Western blot" da proteína em lisados de células transfectadas e para permitir uma comparação relativa da estabilidade e dos níveis estacionários de proteínas V mutantes. O codão metionina iniciador do vector de expressão da proteína V de tipo selvagem foi substituído pela etiqueta de epitopo de hemaglutinina de *influenza* (HA) (67). Este vector de proteína V modificada (pMV-haV-wt) reteve também as substituições de bases que impedem a expressão da proteína C. O teste de pMV-haV-wt em experiências de mini-replicação revelou que a presença da etiqueta HA N-terminal não teve qualquer efeito detectável na capacidade da proteína V para reprimir a actividade do mini-replicação (Figura 4, pistas 1-4, e dados não mostrados).

A primeira série de mutações introduzidas em pMV-haV-wt foi dirigida a alguns dos motivos da sequência ilustrados na Figura 2. Uma destas mutações resultou numa proteína V truncada que não tinha o terminal C original da proteína V contendo os resíduos de cisteína (os aminoácidos 231-299 foram suprimidos) (Figura 3, pMV-haV-1). O plasmídeo pMV-haV-2 converteu a sequência de codificação de V de tipo selvagem na sequência da vacina de Edmonston (codão do aminoácido 225; ácido glutâmico para glicina). As seis mutações restantes (números 3-8 de pMV-haV) foram substituições de aminoácidos dirigidas a algumas das CRs. Inicialmente, foram introduzidas substituições de aminoácidos numa tentativa de alterar a função de domínios específicos na proteína V sem alterar grandemente a estrutura da proteína. Utilizando uma estratégia sugerida pela abordagem de carga-para-alanina (68, 69, 70), foram introduzidas mutações que tiveram como alvo primeiramente dois codões de aminoácidos consecutivos que especificavam resíduos de aminoácidos carregados ou polares e os converteram em codões codificando alanina.

Embora este invento seja exemplificado por mutantes possuindo alaninas em vez de resíduos de tipo selvagem, outras mutações não conservativas dos resíduos de tipo selvagem estão também dentro âmbito deste invento. Por exemplo, o ácido aspártico é uma molécula ácida (carregada negativamente). Consequentemente, uma mutação não conservativa será uma em que é feita uma substituição para um aminoácido à excepção de ácido glutâmico, que é também

uma molécula ácida. Aminoácidos alternativos adequados incluem os aminoácidos lisina, histidina e arginina que são moléculas básicas (carregadas positivamente). Aminoácidos alternativos adequados incluem ainda os aminoácidos com grupos funcionais apolares tais como alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptofano e valina, e os aminoácidos com grupos funcionais polares não carregados tais como asparagina, cisteína, glutamina, glicina, serina, treonina e tirosina.

De forma semelhante, a tirosina é uma molécula polar não carregada. Consequentemente, uma mutação não conservativa será uma na qual é feita uma substituição num aminoácido excepto asparagina, cisteína, glutamina, glicina, serina e treonina, que são também moléculas polares não carregadas. Aminoácidos alternativos adequados incluem os aminoácidos lisina, histidina e arginina que são moléculas básicas (carregadas positivamente). Aminoácidos alternativos adequados incluem ainda os aminoácidos com grupos funcionais apolares tais como alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptofano e valina, e os aminoácidos com grupos funcionais ácidos (carregados negativamente) tais como ácido aspártico e ácido glutâmico.

A análise dos vectores de proteínas V mutantes 1 a 8 num ensaio de mini-replicação é mostrada na Figura 4A. Os resultados indicam que dois vectores (pMV-haV-1 e pMV-haV-5) diminuíram a capacidade de reprimir a actividade do

mini-replicação. Um mutante (haV-1) era um mutante de deleção que não tinha o terminal C original da proteína V (aminoácidos 231-299); o segundo mutante (haV-5) continha as mutações de substituição nos aminoácidos 113 e 114 (situados em CR2; ver Figura 2). Isto sugeriu que esta função poderia ser parcialmente mediada independentemente por CR2 e pelo terminal C. Tal como o mutante de truncagem C-terminal, o mutante de CR2 manteve também uma actividade residual de repressão.

As pistas 1 e 2 na Figura 4A continham amostras de controlo. A transfecção analisada na Pista 1 não tinha o vector de expressão da proteína L e revelou um nível baixo de actividade de CAT de fundo. O controlo positivo na pista 2 mostrou a actividade máxima observada na ausência de proteína V. A repressão mediada por 200 e 400 ng de vector de proteína V de tipo selvagem contendo a etiqueta HA (pMV-haV-wt) é mostrada nas pistas 3 e 4. Tal como descrito acima, a etiqueta HA N-terminal teve pouco efeito na capacidade da proteína V para reprimir o mini-replicação, e nesta experiência, 200 e 400 ng de vector haV-wt reprimiram a actividade do mini-replicação em cerca de 7 e 16 vezes, respectivamente. A maioria dos mutantes reprimiram a actividade de CAT quase tão eficazmente quanto o vector de haV-wt, reduzindo a actividade de CAT a 20% ou menos (pistas 3, 7, 9, 11, 15, 17, 19) da actividade de controlo (pista 2), quando foram transfectados 200 ng do vector de proteína V. Dois vectores de proteína V (pMV-haV-1, pistas 5 e 6; pMV-haV-5, pistas 13 e 14) eram visivelmente menos

eficazes a reprimir a actividade do mini-replicação nesta e em experiências repetidas. O plasmídeo pMV-haV-1 não possuía o terminal C da proteína V rico em cisteína, enquanto que pMV-haV-5 continha uma dupla substituição de alanina em CR2 (aminoácidos 113-114).

Ambos os domínios implicados na repressão têm características interessantes. O terminal C inclui o domínio de ligação ao zinco e contém também um domínio de ligação ao ARN (Figura 5). A sequência primária de aminoácidos de CR2 é digna de nota porque os modelos computacionais prevêem que um pequeno agrupamento de resíduos carregados pode ser posicionado ao longo de uma face de uma hélice alfa proposta (resíduos 114 D, 118 E, 121 K, 125 D). Assim, CR2 é potencialmente uma hélice alfa anfipática semelhante às sequências que foram observadas nalguns factores de transcrição (71).

A actividade de repressão associada a CR2 é também interessante porque esta sequência de aminoácidos está presente em ambas as proteínas V e P. Os papéis essenciais da proteína P como subunidade de polimerase e factor de montagem da nucleocápside (72) são bastante distintos do papel não essencial da proteína V na repressão. Contudo, estas duas proteínas partilham uma quantidade significativa da sequência de aminoácidos. CR2 pode ser um local de interacção proteína-proteína que funcione diferentemente no contexto de V e P. Sem estar limitado pela teoria, pode também ser possível que o

terminal C único da proteína V confira uma estrutura terciária à proteína V que expõe CR2, permitindo por sua vez que funcione como um domínio repressor, enquanto que na proteína P este domínio é sequestrado.

Para determinar se a redução na repressão causada pelo mutante haV-1 ou haV-5 se correlaciona simplesmente com fraca expressão da proteína, foi efectuado um "Western blot" utilizando anticorpo anti-HA para estimar a abundância relativa de proteína V em células transfectadas (Figura 4B). As células para esta experiência foram transfectadas exactamente como efectuado durante as experiências de mini-replicação, de modo a que as células contivessem as proteínas N, P e L bem como a proteína V. As proteínas V marcadas eram detectáveis em todos os extractos de células transfectadas à excepção de dois controlos negativos. Nenhum vector de proteína V foi transfectado nas células utilizadas para fazer o extracto analisado na pista 1, e na pista 2, as células foram transfectadas com o vector que codifica a proteína V que não inclui uma etiqueta de epitopo. A proteína detectada na pista 3 foi a proteína V de tipo selvagem marcada com HA. A proteína na pista 4 era o mutante de truncagem que não possuía o terminal C e a sua mobilidade foi notavelmente alterada. As restantes proteínas eram mutantes (tal como descrito acima) que continham substituições de aminoácidos (Figura 4B, pistas 5-11). Várias destas proteínas tinham mudanças de mobilidade pequenas mas visíveis neste gel de poliacrilamida a 12% (por exemplo, pistas 10 e 11). No

entanto, isto não era inesperado, uma vez que os resíduos carregados e polares foram substituídos por alaninas nestas proteínas. A abundância relativa de todas as proteínas foi julgada ser bastante semelhante, excepto que haV-1 (pista 4) era mais baixa nesta experiência e isto foi reproduzível em experiências repetidas. Isto sugere que a reduzida actividade de repressão de haV-1 pode resultar de níveis mais baixos das proteínas, enquanto que a reduzida actividade de repressão de haV-5 não foi causada por uma proteína instável.

Para examinar melhor a possibilidade de haV-1 reprimir fracamente simplesmente porque era instável, foi efectuado um ensaio de mini-replicação com quantidades crescentes de vector de proteína V para ajudar a suplementar a quantidade intracelular de proteína haV-1 (Figura 4C). Esta experiência de mini-replicação foi efectuada tal como descrito acima, excepto que a quantidade máxima de vector de proteína V foi aumentada de 400 ng para 1 µg. A massa de ADN foi mantida constante em todas as transfecções através da inclusão da quantidade apropriada de ADN estrutural do vector (sem inserção). A Figura 4C, pista 1, foi o controlo positivo que foi efectuado sem adição de vector de proteína V. As pistas 2 e 3 mostram o efeito da adição de vector ha-V de tipo selvagem a 100 ng (pista 2) e 400 ng (pista 3), que reduziu a actividade nesta experiência para 58% e 26%, respectivamente. A adição de quantidades crescentes de haV-1 teve pouco efeito na actividade de MV-CAT e não foi observada qualquer tendência

óbvia para correlacionar a massa crescente do vector haV-1 com maiores níveis de repressão. Isto sugeriu que a actividade de repressão diminuída de haV-1 não era simplesmente devida a níveis intracelulares reduzidos da proteína e era em vez disso um efeito da perda do terminal C.

Uma região contendo um elevado teor de aminoácidos básicos no terço N-terminal da proteína V de SV5 medeia a ligação do ARN (73). Uma região homóloga não é aparente na proteína V do vírus do sarampo (73), mas foi examinada a possibilidade de que a proteína V do vírus do sarampo possa também ligar-se ao ARN através das sequências semelhantes a dedos de zinco no terminal C (Figura 5).

Para avaliar a actividade de ligação ao ARN da proteína V, foi utilizado um ensaio de ligação de homopolímero de polirribonucleótidos (Figura 5A) que foi utilizado com sucesso para estudar diversas proteínas celulares de ligação ao ARN (74-77). Várias proteínas de ligação ao ARN apresentam uma afinidade característica para homopolímeros de polirribonucleótidos. Por exemplo, a proteína hnRNP U celular liga-se com uma afinidade relativamente elevada a poli(G) e poli(U,) mas liga-se pouco ou nada a poli(A) ou poli(C) (75). Este conceito foi utilizado para determinar se a proteína V em extractos de células transfectadas poderia ser capturada em resinas de homopolímeros. As células foram transfectadas com todos os vectores de expressão (N, P, L, V e mini-replicação) utilizados na transfecção do mini-replicação e foram então

infectadas com MVA/T7. Os lisados celulares citoplasmáticos foram preparados 48 horas depois e incubados durante 30-60 minutos a 4°C com contas de agarose ligadas a um dos quatro homopolímeros de polirribonucleótidos. As contas foram recolhidas através de centrifugação, a seguir ressuspensas e lavadas três vezes em tampão de lise celular. As proteínas ligadas foram eluídas a partir das contas fervendo em tampão de carga de SDS-gel.

Inicialmente, para testar o ensaio, foi examinada a capacidade de capturar uma proteína de ligação a ARN conhecida expressa a partir de um plasmídeo transfectado. Concordantemente, as proteínas eluídas a partir das quatro resinas diferentes foram analisadas através de "Western blot" utilizando o anticorpo monoclonal específico para a proteína N (Figura 5B). A proteína N foi facilmente detectada em amostras ligadas a poli(G) e poli(U) (pistas 2 e 4). A quantidade de proteína N ligada a poli(G) era geralmente superior neste ensaio e em diversas experiências repetidas. Pouca ou nenhuma proteína N foi capturada com poli(A) ou poli(C).

A experiência foi repetida tal como descrito acima para analisar a capacidade da proteína haV para interagir com as resinas de homopolímeros (Figura 5B, pistas 5-8). A análise de um "Western blot" com anticorpo anti-HA revelou resultados que eram semelhantes aos resultados obtidos após a análise da proteína N (Figura 5B, pistas 1-4). As resinas poli(G) e poli(U) mostraram ambas

afinidade para haV (pistas 6 e 8). A proteína V ligou-se melhor a poli(G) e mais fracamente a poli(U), enquanto que se ligou fracamente a poli(A) ou poli(C). Nalgumas experiências, foi observada uma banda muito fraca, indicando uma interacção de baixa afinidade com poli(A); no entanto, esta interacção é geralmente indetectável.

O facto da proteína V se ligar facilmente a poli(G) e poli(U) e mal a poli(A) e poli(C) indicou que o ensaio não media simplesmente a afinidade para resinas polianiónicas, e mostrou também que a proteína V demonstrou uma preferência para dois polinucleótidos. Tanto a proteína V como a proteína N preferiram poli(G) e poli(U) (Figura 5); esta é uma característica mostrada por várias proteínas celulares de ligação ao ARN (74, 76, 77).

O facto do perfil de ligação da proteína haV ser bastante semelhante ao da proteína N levantou a possibilidade da proteína V ser capturada indirectamente em resinas de poli(G) e poli(U) através da interacção com a proteína N, em vez de uma interacção directa com o ARN. Para examinar esta possibilidade, foram transfectadas células apenas com o vector de expressão da proteína haV e foram preparados extractos celulares e tratados tal como descrito acima. A análise através de "Western blot" mostrou que a proteína haV (Figura 5B, pistas 9-12) estava novamente ligada a poli(G) e poli(U). Isto indicou que a interacção da proteína V com resinas de homopolímeros não requeria nenhuma outra proteína viral. De facto, na

ausência de outras proteínas virais, ligavam-se geralmente quantidades maiores de proteína V a poli(G) e poli(U) (comparar as pistas 6 a 10 e 8 a 12). Isto sugeriu que uma das outras proteínas virais pode interferir ligeiramente com a interacção entre a proteína V e os polirribonucleótidos.

Foi também efectuada uma análise limitada das condições que influenciam a ligação de haV a poli(G) (Figura 5B, pistas 13-16). A adição de EGTA ou EDTA 10 mM (pistas 14 e 15) à reacção de ligação reduziu a quantidade de proteína V ligada a poli(G). A adição de ARN competidor de levedura (pista 16) à reacção de ligação (25 µg por ml) teve pouco efeito na ligação. No entanto, isto não foi especialmente surpreendentemente, porque os extractos citoplasmáticos continham já quantidades significativas de ARN celular e a adição de ARN de levedura teve provavelmente pouco impacto. Estes resultados sugerem que a ligação da proteína V a poli(G) é estimulada por catiões bivalentes e é uma interacção relativamente específica, porque a adição de um ARN não específico (ARN de levedura) não pareceu diminuir a quantidade de proteína V ligada à resina.

Para determinar se a ligação ao ARN se podia correlacionar com a capacidade para reprimir a actividade do mini-replicação, foi de seguida utilizado o ensaio de ligação a poli(G) para analisar a actividade de ligação ao ARN de proteínas haV mutantes. Os mutantes da proteína haV

(Figura 3) foram expressas em células sem quaisquer outras proteínas virais. Extractos citoplasmáticos brutos foram preparados e ligados a resinas poli(G) tal como descrito acima, e as proteínas ligadas foram analisadas através de "Western blotting" (Figura 6). Tal como mostrado anteriormente, a haV foi capturada por poli(G) e detectada pelo anticorpo anti-HA num "Western blot" (pista 2), enquanto que uma amostra contendo proteína V sem uma etiqueta HA (pista 1) não gerou qualquer sinal de fundo. A análise das proteínas mutantes revelou níveis semelhantes de actividade de ligação a poli(G) para a maioria das proteínas V (pistas 4-13). A excepção foi o mutante haV-1. Ligaram-se níveis muito baixos desta proteína mutante a poli(G). Isto indicou claramente que a proteína era deficiente para ligação (pista 3). Os níveis baixos mas detectáveis de ligação por haV-1 indicaram que a actividade de ligação ao ARN foi substancialmente reduzida, mas não inteiramente eliminada. Estes resultados demonstraram que a maioria dos mutantes mantiveram uma actividade de ligação ao ARN quase equivalente à da haV de tipo selvagem. Um dos dois mutantes que era deficiente para repressão do mini-replicação (haV-5) ligou-se a poli(G) tão bem como haV de tipo selvagem, enquanto que o outro mutante (haV-1) exibiu uma actividade de ligação a poli(G) significativamente reduzida. Isto sugeriu que pode haver uma correlação entre a repressão do mini-replicação e a actividade de ligação ao ARN mediada pelo terminal C único da proteína V. Por sua vez, isto sugeriu que a actividade de ligação ao ARN da proteína V pode ter um papel regulador na expressão génica e replicação do

vírus do sarampo.

Uma potencial ligação entre a actividade de ligação ao ARN associada à proteína V e a repressão do mini-replicação poderia ser extraída dos resultados que mostraram que uma proteína V mutante sem a região C-terminal rica em cisteína se ligava fracamente ao ARN era também um repressor menos eficaz do mini-replicação.

Numa experiência separada, mostrou-se que a repressão do mini-replicação não se correlaciona com a capacidade da proteína V para se ligar à proteína N. A formação de um complexo de proteínas V-N não era necessária para a repressão do mini-replicação mediada pela proteína V; os mutantes da proteína V, haV-9 e haV-11 (Figura 3) não conseguiram interagir com a proteína N, mas mantiveram intacta a actividade de repressão (dados não mostrados).

A análise dos mutantes da proteína V sugeriu que o terminal C era necessário para uma ligação de elevada afinidade ao ARN. A deleção desta região que inclui o domínio de ligação ao zinco (51) reduziu extremamente a quantidade de proteína que podia ser recolhida nas resinas poli(G), mas não eliminou inteiramente toda a ligação. Isto pode sugerir que há um segundo domínio de ligação ao ARN fraco na proteína V. Sem estar limitado pelo seguinte, uma possibilidade atractiva é que o domínio semelhante a um dedo de zinco no terminal C forme um componente importante de um domínio de ligação ao ácido nucleico, e um segundo

domínio na proteína V coopera com o terminal C para criar um local de ligação de afinidade mais elevada.

Estes estudos de ligação ao ARN mostraram também que a proteína V podia interagir com ARN sem quaisquer proteínas virais adicionais presentes nos extractos celulares brutos. Isto sugere que a proteína V se liga directamente ao ARN. Esta conclusão não é absoluta, porque permanece possível que a proteína V interaja com uma proteína celular que por sua vez seja responsável pela ligação ao ARN. Se este modelo for verdadeiro, os dados indicam que o terminal C pode mediar a interacção proteína-proteína responsável pela interacção com um factor celular. A proteína V recombinante purificada será importante para examinar melhor se a proteína V se liga directamente ao ARN.

Embora a proteína haV-5 mutante seja deficiente para a repressão do mini-replicação (Figura 4), liga-se ao ARN (Figura 6) tão bem como a proteína de tipo selvagem. Assim, a actividade de repressão do mini-replicação associada a CR2 não se correlacionou facilmente com as outras duas actividades analisadas (ligação ao ARN e interacção com a proteína N). Para CR2 funcionar eficazmente como um motivo de repressão, pode requer um domínio de ligação ao ARN intacto no terminal C da proteína V. A proteína V pode ser semelhante a alguns factores de transcrição da ARN-polimerase II e possui uma estrutura modular (78).

Para testar melhor a possibilidade de CR2 estar directamente envolvido na repressão, este domínio (aminoácidos 112-134) foi suprimido para gerar haV-23 (Figura 7; SEQ ID NO: 9). Surpreendentemente, esta deleção não afectou grandemente a actividade de repressão (Figura 8). O facto de CR2 poder ser suprimido sem afectar a repressão apoia que CR2 não contém um domínio que participe activamente na repressão. Em vez disso, parece que o defeito causado pela substituição dos aminoácidos 113 mais 114 verificados em haV-5 (Figuras 7 e 8) gerou um efeito negativo dominante (a análise "Western blot" precedente indicou que o defeito na repressão não foi causado pela instabilidade de haV-5).

Sem estar limitado pela teoria, a substituição de YD por AA em haV-5 gerou uma subtil alteração na estrutura terciária da proteína V que bloqueia parcialmente a actividade de repressão. Alternativamente, pode haver interacção entre a proteína V e outras proteínas virais ou proteínas celulares. A dupla substituição por alanina pode favorecer uma interacção proteína-proteína que iniba a actividade de repressão ou sequestre a proteína V num complexo proteico inactivo.

O conceito de que o fenótipo de repressão fraco foi causado por um efeito negativo dominante criado pela dupla substituição de alanina foi ainda testado através da execução de substituições de aminoácidos adicionais que foram muito semelhantes mas distintas das mutações

verificadas em haV-5 (Figura 7). A substituição de YD por AA original em haV-5 foi efectuada num motivo bem conservado consistindo em VYDH situado no limite amino de CR2 (Figura 2). Este motivo era idêntico em sequências da proteína V do vírus do sarampo, do vírus da esgana canina, do vírus da peste bovina e do *Morbillivirus* do golfinho. No mutante haV-24 (SEQ ID NO: 10), a sequência VYDH foi convertida em VYAA, e no mutante haV-25 (SEQ ID NO: 11), VYDH foi convertida em VAAA. Ambos estes mutantes reprimiram a expressão do gene MV do mini-replicação tão bem como a proteína haV de tipo selvagem (Figura 8). Isto implica que o defeito de haV-5 é muito específico para a substituição de VYDH por VAAH.

A possibilidade de um domínio semelhante a um dedo de zinco C-terminal ter um papel na repressão foi ainda examinada através da introdução de substituições de aminoácidos em pares de resíduos de cisteína no terminal C (Figura 9). A haV-12 mutante (SEQ ID NO: 14) foi gerada com os resíduos de cisteína 1 e 2 (aminoácidos 251 e 255) convertidos em alaninas. De forma semelhante, a haV-13 mutante (SEQ ID NO: 15) foi gerada com os resíduos de cisteína C-terminais 4 e 5 (aminoácidos 269 e 272) substituídos por alaninas. Os resíduos de cisteína foram mutados em pares esperando que isto alterasse significativamente uma estrutura semelhante a um dedo de zinco no terminal C e produzisse uma alteração facilmente detectável na actividade de repressão.

Surpreendentemente, os estudos de expressão da CAT destes mutantes (Figura 10) revelaram que esta era afectada apenas suavemente pelas substituições das cisteínas; tanto haV-12 como haV-13 retiveram uma proporção significativa da actividade de repressão da proteína haV de tipo selvagem (cerca de 65% do tipo selvagem). Este resultado era um tanto inesperado; previa-se que a substituição de resíduos de cisteína coordenando o zinco abolisse a repressão. Possivelmente, a substituição de apenas dois dos sete resíduos de cisteína não destruiu completamente a putativa estrutura de ligação ao ácido nucleico do dedo de zinco. Alternativamente, é possível que o putativo motivo de dedo de zinco tenha um papel menos proeminente na repressão do que o anteriormente previsto. Assim, foram preparadas duas séries adicionais de mutações para examinar melhor o papel do terminal C na repressão.

Num conjunto de mutações, foram feitas pequenas deleções incrementais a começar a partir do terminal C (de haV-14 a haV-19; ID SEQ NOS: 16-21). A deleção mais pequena (haV-14) removeu 21 aminoácidos do terminal C, enquanto que a maior deleção (haV-19) removeu 71 resíduos de aminoácidos. O mutante haV-19 foi construído embora fosse quase idêntico a haV-1 (Figura 9; SEQ ID NO: 13), porque a deleção em haV-19 removeu diversos aminoácidos adicionais que faziam parte do pequeno motivo básico situado entre os aminoácidos 229-234, e o fenótipo de haV-19 podia ser visto como a verificação do fenótipo mutante mostrado por haV-1.

A análise dos mutantes C-terminais no ensaio do mini-replicação revelou que os mutantes de deleções grandes (haV-1 e haV-19) se comportavam de forma semelhante; reprimiram a expressão génica do mini-replicação apenas cerca de duas vezes ou menos em vez das 5-8 vezes de repressão induzidas pela haV de tipo selvagem (Figura 10). De forma interessante, a actividade de repressão diminuída apresentada pelas deleções grandes foi reproduzida por todos os mutantes de truncagem menores. Mesmo a menor deleção do terminal C (haV-14) resultou numa proteína V que reprimia apenas cerca de duas vezes. Este resultado implicou que a integridade da ponta do terminal C é essencial para a actividade intacta de repressão.

Para além de analisar o efeito das mutações de deleção C-terminais, foram geradas diversas mutações adicionais para examinar a possibilidade do motivo básico (KKGHRR; aminoácidos 229-237, SEQ ID NO: 12) no início do terminal C único da proteína V ter tido algum papel na repressão. A conversão dos dois resíduos de arginina em alanina (haV-20; SEQ ID NO: 22) ou ácido aspártico (haV-21; SEQ ID NO: 23) teve um efeito que foi semelhante ao das mutações de deleção C-terminais. Os dois mutantes de substituição reprimiram a expressão do mini-replicação numa média de apenas 1,5 a 3 vezes enquanto que a repressão da proteína V de tipo selvagem variava normalmente de 5-8 vezes (Figura 10). Estes resultados implicaram que a perturbação do motivo básico destruiu também a função de repressão da proteína V normal.

Este resultado foi ainda examinado através da deleção do motivo básico (Figura 9, haV-22; SEQ ID NO: 24), enquanto se deixava o restante terminal C intacto. Surpreendentemente, uma experiência preliminar indicou que a deleção do motivo básico não teve qualquer efeito perceptível na actividade de repressão; haV-22 reprimiu a actividade de CAT em cerca de nove vezes (Figura 10). Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que as substituições de aminoácidos no motivo básico produzem um efeito negativo dominante na actividade de repressão causando possivelmente uma mudança desfavorável na estrutura terciária da proteína. Por outro lado, a deleção do motivo básico produziu pouca mudança na capacidade da proteína V para reprimir a expressão génica do mini-replicação.

O mecanismo de repressão do mini-replicação da proteína V do vírus do sarampo é desconhecido. Os resultados sugerem que o mecanismo não requer interacção com a proteína N, mas envolve interacção com o ARN. A ligação ao ARN podia resultar em níveis reduzidos de CAT num ensaio do mini-replicação através de vários mecanismos diferentes. Por exemplo, a actividade de ligação ao ARN podia reprimir a tradução se a proteína V se ligar a ARNms virais. A proteína V podia também influenciar taxas de encapsidação se se ligar a ARNs virais nascentes e impedir a associação do ARN à proteína N. Inversamente, podia de algum modo estimular a montagem da nucleocápside, forçando desse modo o sistema do mini-replicação a sobreproduzir ARN

de comprimento genómico à custa de ARNm. A proteína V podia também ser considerada como análoga a um factor de transcrição que se ligue ao promotor ou próximo deste e reprima a transcrição. Se a proteína V for análoga a um factor de transcrição, pode ser um regulador do interruptor que equilibra a síntese do genoma e a síntese de ARNm.

A dissecção das funções da proteína V proporciona uma base para a introdução de mutações atenuantes em estirpes de *Morbillivirus* candidatas para utilização em composições imunogénicas. Os estudos publicados mostraram que a eliminação da expressão da proteína V resulta em replicação viral atenuada (19, 22, 23, 26-29). Graus variáveis de atenuação são introduzidos tendo como alvo substituições de aminoácidos em domínios específicos da proteína V, em vez de eliminar a expressão. Por exemplo, a perda parcial da função de repressão da proteína V é alcançada através da mutação de um ou mais resíduos de cisteína no terminal C único. As substituições numa região partilhada por P e V são adequadas, tais como as substituições por alanina em CR2, se tiverem um efeito na função da proteína V sem muito efeito na proteína P. Estas mutações são avaliadas utilizando os sistemas genéticos inversos para "recuperação", tal como descritos na arte (19, 79, 80, 81).

O sistema genético inverso deve ser utilizado para gerar um *Morbillivirus* infeccioso contendo as mutações deste invento, porque o ARN genómico nu não pode servir

como molde para a transcrição e replicação. Em vez disso, estas sequências genómicas são reconhecidas apenas quando são inteiramente encapsidadas pela proteína N na estrutura da nucleocápside. É apenas nesse contexto que se reconhece que as sequências promotoras terminais genómicas e antígenómicas iniciam as vias da transcrição ou da replicação.

A transcrição e replicação de genomas virais de ARN de cadeia simples de sentido negativo são alcançadas através da actividade enzimática de uma proteína multimérica que actua no núcleo da ribonucleoproteína (nucleocápside). Todos os *Morbillivirus* requerem as três proteínas virais, N, P e L, para que estas vias prossigam.

As mutações aqui descritas são introduzidas em estirpes de *Morbillivirus* utilizando mutagénese dirigida ao local. Um ou mais mutações tal como aqui definidas são introduzidas numa estirpe de *Morbillivirus*. Os efeitos cumulativos de diferentes combinações de mutações podem ser avaliados.

Este invento é exemplificado com o sistema de mini-replicação. As mudanças nas sequências nucleotídicas codificando as mutações em CR2 e no terminal C da proteína V de *Morbillivirus* (bem como na região promotora e na proteína L, nas proteínas N, P e/ou C e/ou no sinal de terminação do gene F do vírus do sarampo) podem ser facilmente inseridas em vírus inteiros utilizando técnicas

conhecidas na arte. As mutações são introduzidas através de métodos de ADN recombinante padrão numa cópia do ADN do genoma viral. Este pode ser um fundo de genoma viral de tipo selvagem ou modificado, gerando desse modo um novo vírus. Os clones ou as partículas infecciosas contendo estas mutações são gerados utilizando o sistema de recuperação de ADNc, que foi aplicado a uma variedade de vírus de ARN de sentido negativo, incluindo o vírus de Sendai (82); o vírus do sarampo (83, 88); o vírus sincicial respiratório (84); PIV-3 (85); o vírus da raiva (86); da estomatite vesicular (VSV) (87); e o vírus da peste bovina (89); estas referências são aqui incorporadas por referência.

Resumidamente, todos os sistemas de recuperação de *Morbillivirus* podem ser resumidos como se segue: Cada um requer um DNA clonado equivalente ao genoma viral inteiro colocado entre um promotor de ARN-polimerase dependente de DNA apropriado (por exemplo, o promotor da ARN-polimerase T7) e uma sequência de ribozima auto-clivante (p. ex., a ribozima delta da hepatite) que é introduzida num plasmídeo bacteriano propagável. Este vector de transcrição proporciona o molde de ADN facilmente manipulável a partir do qual a ARN-polimerase (p. ex., a ARN-polimerase T7) pode fielmente transcrever uma cópia de ARN de cadeia simples do antígenoma (ou do genoma) viral com os terminais 3' e 5' exactos, ou quase exactos. A orientação da cópia do ADN genómico viral e das sequências promotora e da ribozima flanqueadoras determinam se os equivalentes do ARN do

antigenoma ou do genoma são transcritos. São também requeridas para a recuperação da descendência do novo vírus as proteínas de acção em *trans* específicas do vírus necessárias para encapsidar os transcritos de ARN nus de cadeia simples do antigenoma ou do genoma viral em moldes funcionais da nucleocápside: a proteína da nucleocápside (N) viral, a fosfoproteína (P) associada à polimerase e a proteína polimerase (L). Estas proteínas compreendem a ARN-polimerase dependente de ARN viral activa que se deve encaixar neste molde de nucleocápside para alcançar a transcrição e replicação.

Tipicamente, estas proteínas virais de acção em *trans* são geradas a partir de um ou mais vectores plasmídicos de expressão que codificam as proteínas requeridas, embora algumas ou todas as proteínas de acção em *trans* requeridas possam ser produzidas dentro de células de mamífero modificadas para conterem e expressarem estes genes e produtos génicos específicos do vírus como transformantes estáveis.

As circunstâncias típicas (embora não necessariamente exclusivas) para a recuperação incluem um meio celular de mamífero apropriado no qual a polimerase T7 está presente para dirigir a transcrição do ARN antigenómico (ou genómico) de cadeia simples do vector de transcrição contendo ADNc genómico viral. Na transcrição ou logo depois desta, este transcrito de ARN do antigenoma (ou genoma) viral é encapsidado em moldes funcionais pela proteína da

nucleocápside e acoplado pelos componentes requeridos da polimerase produzidos simultaneamente a partir de plasmídeos de expressão co-transfectados codificando as proteínas de acção em *trans* específicas do vírus necessárias. Estes acontecimentos e processos conduzem à transcrição pré-requisito de ARNms virais, à replicação e à amplificação de novos genomas e, desse modo, à produção de nova descendência viral, *i.e.*, à recuperação.

Para a recuperação do vírus da raiva não *Morbillivirus*, VSV e de Sendai, a polimerase T7 é proporcionada através do vírus vaccínia recombinante VTF7-3. Este sistema, no entanto, requer que o vírus recuperado seja separado do vírus vaccínia através de meios físicos ou bioquímicos ou através de passagens repetidas em células ou tecidos que não sejam um bom hospedeiro para poxvírus. Para a recuperação do ADNc do vírus do sarampo (e presumivelmente para outros *Morbillivirus*), esta exigência é evitada através da criação de uma linha celular que expresse a polimerase T7, bem como as proteínas N e P virais. A recuperação é alcançada através da transfecção do vector de expressão do genoma e do vector de expressão do gene L na linha celular ajudante. As vantagens do mutante de amplo espectro de hospedeiros do vírus vaccínia, MVA-T7, que expressa a ARN-polimerase T7, mas produz pouca ou nenhuma descendência infecciosa em células de mamífero, são exploradas para recuperar o vírus do sarampo e outros *Morbillivirus*. Após a expressão simultânea das proteínas de encapsidação necessárias, o ARN viral antigenómico inteiro

sintético é encapsidado, replicado e transcrito por proteínas polimerases virais e os genomas replicados são empacotados em viriões infecciosos. Para além de tais antigenomas, foram agora recuperados com sucesso análogos dos genomas para Sendai e PIV-3 (85, 90).

O sistema de recuperação proporciona assim uma composição que compreende um vector de transcrição compreendendo uma molécula de ácido nucleico isolada codificando um genoma ou um antigenoma de um *Morbillivirus*. A molécula de ácido nucleico contém pelo menos uma mutação na região correspondente aos aminoácidos 112-134 da proteína V do vírus do sarampo (e, opcionalmente, outras mutações aqui descritas), juntamente com pelo menos um vector de expressão que compreende pelo menos uma molécula de ácido nucleico isolada codificando as proteínas de acção em *trans* necessárias para a encapsidação, transcrição e replicação (p. ex., N, P e L para um *Morbillivirus*). As células hospedeiras são então transformadas, infectadas ou transfectadas com pelo menos dois vectores de expressão agora descritos. As células hospedeiras são cultivadas sob condições que permitem a co-expressão destes vectores para produzir o vírus infeccioso modificado.

O vírus infeccioso recuperado é testado quanto ao seu fenótipo desejado (repressão reduzida pela proteína V, sensibilidade à temperatura, adaptação ao frio, morfologia das placas fágicas e atenuação da transcrição e da replicação), primeiro por meios *in vitro*. As mutações nos

genes N, P ou C ou no sinal de terminação do gene F do vírus do sarampo são também testadas utilizando o sistema de mini-replicação onde as actividades de encapsidação de acção em *trans* e de polimerase requeridas são proporcionadas por vírus ajudantes de tipo selvagem ou de vacina, ou por plasmídeos que expressam os genes N, P e diferentes L ancorando mutações atenuantes específicas dos gene (63, 83).

Se o fenótipo atenuado do vírus recuperado estiver presente, as experiências de confronto são conduzidas com um modelo animal apropriado. Os primatas não humanos proporcionam o modelo animal preferido para a patogénese da doença humana. Estes primatas são primeiro imunizados com o vírus atenuado, gerado de forma recombinante, depois confrontados com a forma de tipo selvagem do vírus. Os macacos são infectados por várias vias, incluindo mas não se limitando às vias de inoculação intranasal, intratraqueal ou subcutânea (91). Os macacos rhesus e cinomólogos experimentalmente infectados serviram também como modelos animais para estudos de protecção induzida por vacina contra sarampo (92).

A protecção é medida por critérios tais como sinais e sintomas de doença, sobrevivência, derramamento de vírus e títulos de anticorpo. Se os critérios desejados forem verificados, o vírus gerado de forma recombinante é considerado uma vacina candidata ou composição imunogénica viável para testes em seres humanos. O vírus "recuperado" é

considerado como sendo "gerado de forma recombinante", tal como o são a descendência e as gerações posteriores do vírus, que também incorporem as mutações.

Mesmo que um vírus "recuperado" seja subatenuado ou sobre-atenuado relativamente aos níveis óptimos para utilização em vacina, esta é uma informação que é valiosa para desenvolver tais estirpes ideais.

De forma ideal, um codão contendo uma mutação pontual pode ser estabilizado através da introdução de uma segunda ou de uma segunda mais uma terceira mutação no codão sem mudar o aminoácido codificado pelo codão possuindo apenas a mutação pontual. Os clones do vírus infecciosos contendo as mutações estabilizantes são também gerados utilizando o sistema de "recuperação" de ADNc descrito acima.

Foi divulgado anteriormente, no pedido de patente internacional publicado WO 98/13501 (93), que é por este meio incorporado por referência, a criação e o isolamento de vírus de ARN de cadeia simples, de sentido negativo, não segmentados, atenuados, gerados de forma recombinante da Ordem *Mononegavirales* (tal como o vírus do sarampo) possuindo pelo menos uma mutação atenuante na região promotora genómica 3' e possuindo pelo menos uma mutação atenuante no gene da ARN-polimerase.

Especificamente, estas mutações compreenderam:

1) pelo menos uma mutação atenuante na região promotora genômica 3' seleccionada a partir do grupo que consiste no nucleótido 26 (A → T), no nucleótido 42 (A → T ou A → C) e no nucleótido 96 (G → A), onde estes nucleótidos são apresentados na cadeia positiva, antígenômica, no sentido da mensagem; e

2) pelo menos uma mutação atenuante no gene da ARN-polimerase seleccionada a partir do grupo que consiste nas mudanças de nucleótidos que produzem mudanças num aminoácido seleccionado a partir do grupo que consiste nos resíduos 331 (isoleucina → treonina), 1409 (alanina → treonina), 1624 (treonina → alanina), 1649 (arginina → metionina), 1717 (ácido aspártico → alanina), 1936 (histidina → tirosina), 2074 (glutamina → arginina) e 2114 (arginina → lisina).

Para além disso, foi divulgado no pedido de patente internacional publicado WO 99/49017 (94), que é por este meio incorporado por referência, a criação e o isolamento de vírus do sarampo atenuados, gerados de forma recombinante possuindo pelo menos uma mutação atenuante nos genes N, P ou C, ou no sinal de terminação do gene F. Especificamente, estas mutações compreenderam:

1) para o gene N, pelo menos uma mutação atenuante seleccionada a partir do grupo que consiste nas mudanças de nucleótidos que produzem mudanças num aminoácido seleccionado a partir do grupo que consiste nos resíduos 129 (glutamina → lisina), 148 (ácido glutâmico →

glicina) e 479 (serina → treonina);

2) para o gene P, pelo menos uma mutação atenuante seleccionada a partir do grupo que consiste nas mudanças de nucleótidos que produzem mudanças num aminoácido seleccionado a partir do grupo que consiste nos resíduos 225 (ácido glutâmico → glicina), 275 (cisteína → tirosina) e 439 (leucina → prolina);

5) para o gene C, pelo menos uma mutação atenuante seleccionada a partir do grupo que consiste nas mudanças de nucleótidos que produzem mudanças num aminoácido seleccionado a partir do grupo que consiste nos resíduos 73 (alanina → valina), 104 (metionina → treonina) e 134 (serina → tirosina); e

6) para o sinal de terminação do gene F (sinal de terminação da transcrição de acção em *cis*), a mudança no nucleótido 7243 (T → C), onde estes nucleótidos são apresentados na cadeia positiva, antigenómica, isto é, no sentido da mensagem (de codificação).

Mutações atenuantes individuais ou em combinações de qualquer um ou de ambos estes conjuntos de mutações podem ser incorporadas nos *Morbillivirus* deste invento, incluindo especificamente as que têm pelo menos uma mutação na região correspondente aos aminoácidos 112-134 da proteína V, bem como as que contêm uma tal mutação nos aminoácidos 112-134 e uma mutação ou deleção em pelo menos uma porção da região C-terminal que começa no aminoácido 231.

Os vírus deste invento são utilizados para formular uma composição de vacina ou imunogénica. Para o fazer, o vírus é ajustado a uma concentração apropriada e formulado com qualquer adjuvante, diluente ou transportador adequado. Os meios fisiologicamente aceitáveis podem ser utilizados como transportadores e/ou diluentes. Estes incluem, mas não se limitam a: água, um meio isotónico apropriado, glicerol, etanol e outros solventes convencionais, solução salina tamponada com fosfato e semelhantes. Adjuvantes adequados incluem, mas não se limitam a fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio, MPL™ (monofosforil-lípido A 3-0-desacilado; RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT, agora Corixa), análogos sintéticos de lípido A tais como 529 (Corixa), Stimulon™ QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Framingham, MA) e IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, MA).

Numa concretização deste invento, pretende-se que a formulação incluindo o *Morbillivirus* seja para utilização como vacina ou composição imunogénica. O vírus pode ser misturado com aditivos crioprotectores ou estabilizantes tais como proteínas (p. ex., albumina, gelatina), açúcares (p. ex., sacarose, lactose, sorbitol), aminoácidos (p. ex., glutamato de sódio), solução salina ou outros agentes protectores. Esta mistura é mantida num estado líquido, ou então é desidratada ou liofilizada para transporte e armazenamento e misturada com água imediatamente antes da administração.

As formulações compreendendo os *Morbillivirus* deste invento são úteis para imunizar um ser humano ou outro sujeito vertebrado para induzir protecção contra a infecção pelo correspondente vírus de tipo selvagem. Assim, este invento proporciona ainda um método de imunização de um sujeito para induzir protecção contra infecção por um *Morbillivirus* através da administração ao sujeito de uma quantidade imunizante eficaz de uma formulação da vacina ou da composição imunogénica incorporando uma versão desse vírus gerado tal como descrito acima.

Uma quantidade suficiente da vacina ou da composição imunogénica num número apropriado de doses é administrada ao sujeito para provocar uma resposta imunitária. Os peritos na arte serão prontamente capazes de determinar tais quantidades e dosagens. A administração pode ser através de qualquer forma eficaz convencional, tal como aplicada intranasalmente, parentericamente, oralmente ou topicamente a qualquer superfície mucosa tal como a superfície intranasal, oral, do olho, do pulmão, vaginal ou rectal, tal como através de um spray de aerossóis. O meio preferido de administração é através da administração intranasal.

Todas as patentes e publicações aqui citadas são incorporadas por este meio por referência.

Para que este invento possa ser melhor

compreendido, são expostos os seguintes exemplos. Os exemplos têm apenas a finalidade de ilustrar e não devem ser interpretados como limitantes do âmbito do invento.

Exemplos

Exemplo 1

Células e Vírus

Células HEp2 foram criadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com soro fetal bovino a 10%. Fibroblastos de embrião de galinha (CEFs; SPAFAS, Inc.) foram mantidos no mesmo meio. A estirpe atenuada do vírus vaccínia que expressa a ARN-polimerase do fago T7 (MVA/T7; 62) foi criada em CEFs. Os ensaios de placas fágicas foram efectuados também em CEFs.

Exemplo 2

ADN Recombinante

Os clones de expressão das proteínas N, P e L do vírus do sarampo (Figura 1A) foram cada um preparado a partir de ARN total de células infectadas através de transcrição reversa e amplificação por PCR (RT/PCR) com iniciadores específicos do gene, seguido de clonagem num vector de expressão apropriado dependente da ARN-polimerase T7 (61). Células Vero foram infectadas com a estirpe de

tipo selvagem do vírus do sarampo de Edmonston e quando cerca de 70% ou mais das células exibiam um efeito citopático, o ARN foi preparado através do método de extracção de guanidínio-fenol (95). A RT/PCR foi efectuada com o vírus aviário de mioblastose RT e a polimerase Pwo contido no estojo de amplificação Titan de um só tubo (Roche Molecular Biology). O passo de RT foi efectuado durante 30-60 minutos a 47°C, seguido de 30-35 ciclos de amplificação por PCR. Os fragmentos de ADN amplificados foram clonados num plasmídeo de expressão T7 (Figura 1; (61, 83)) com o codão de iniciação da tradução colocado no local *NcoI* do vector. Os ADNs clonados foram verificados através de sequenciação por ciclos (96) e os erros de substituição de nucleótidos foram corrigidos através de mutagénese por oligonucleótidos utilizando o estojo Morph (5prime-3prime, Inc.) ou através da substituição de subfragmentos por fragmentos de ADN amplificados de novo tal como descrito anteriormente (96).

O clone de expressão da proteína V inicial foi preparado através de amplificação por PCR a partir de um clone do ADNc inteiro de tipo selvagem de Edmonston utilizando iniciadores que flanqueiam a região de codificação da proteína V. O ADN amplificado foi clonado no vector de expressão T7 e o resíduo nucleotídico G adicional necessário para gerar a mudança de enquadramento do gene V foi adicionado no local de edição (18) através de mutagénese dirigida por oligonucleótidos. Os vectores de expressão da proteína V de tipo selvagem e mutante foram

também preparados com uma etiqueta de epitopo de hemaglutinina do vírus da gripe (etiqueta HA; (67)) no terminal amino. O vector plasmídico T7 foi modificado para incluir uma sequência que inclui um codão de iniciação e codifica a etiqueta de epitopo HA (CC ATG GCT TAT CCT TAT GAC GTG CCT GAC TAT GCC (SEQ ID NO: 5), seguida de um poliligador (plasmídeo pT7/HA). A região de codificação da proteína V foi clonada com a etiqueta HA no terminal amino. Isto serviu para substituir o codão iniciador de metionina da proteína V, resultando na criação de um plasmídeo designado pMV-haV-wt. Os mutantes da proteína V foram preparados na estrutura de pMV-haV-wt através de mutagênese dirigida por oligonucleótidos ou deleções.

O iniciador desenhado para amplificar a extremidade 5' das regiões de codificação de P e V (CGGCCATGGCAGAAGAGACAGGCACGCCACGTAAAAACGGAC) (SEQ ID NO: 6) continha duas mudanças de bases (sublinhadas) para destruir o enquadramento de leitura aberto da proteína C a jusante. Estas mudanças eram silenciosas em relação aos enquadramentos de leitura abertos de P e V. As mesmas mudanças de nucleótidos foram realizadas nas construções pT7MV-haV.

Para todas as construções de expressão de proteína, a inserção de ADNc foi clonada a 3' de um local interno de entrada no ribossoma (IRES) para facilitar a tradução do transcrito da ARN-polimerase T7. Um trecho de 50 resíduos de adenosina estava situado na extremidade 3',

seguido de um terminador da ARN-polimerase T7. Ambos os vectores de expressão de P e V continham substituições de bases desenhadas para destruir a iniciação da tradução do enquadramento de leitura aberto da proteína C a jusante.

O mini-replicação do vírus do sarampo (pMVwt107-CAT, Figura 1B) era um derivado de pMV107-CAT (63). O plasmídeo pMV107-CAT continha a sequência líder verificada em estirpes de vacina do vírus do sarampo (60) e foi convertido no plasmídeo pMV107wt-CAT (que continha o líder de tipo selvagem) utilizando mutagénese dirigida por oligonucleótidos.

Exemplo 3

Experiências de Expressão Transiente

A análise de expressão transiente do mini-replicação foi efectuada essencialmente tal como descrito anteriormente (96) utilizando quantidades variáveis de vectores virais de expressão da proteína (Figura 1B) e um mini-replicação do vírus do sarampo contendo o gene repórter CAT (Figura 1B). O mini-replicação do vírus do sarampo era um derivado de pMV107-CAT (63) contendo o gene repórter CAT e a sequência líder do sarampo da estirpe de tipo selvagem de Edmonston do vírus do sarampo (60). Células HEp2 em placas de seis poços foram utilizadas para transfecção quando as células eram aproximadamente 70-90% confluentes. As misturas de transfecção foram preparadas através da

combinação de ADN do mini-replicação (50-200 ng de pMVwt107-CAT) e plasmídeos de expressão (400 ng de pMVwt-N, 300 ng de pMVwt-P[C⁻], 100 ng de pMVwt-L) em 200 µl de OptiMEM isento de soro. Os plasmídeos de expressão da proteína V foram incluídos nesta mistura de acordo com quantidades que variaram de 25-400 ng, tal como especificado na Figura 1C. Foi adicionado Lipofectace (12-15 µl; Invitrogen/Life Technologies) à mistura ADN-meio e incubou-se durante 20 a 30 minutos à temperatura ambiente. Uma mistura MVA/T7 separada foi preparada em quantidade suficiente para proporcionar 0,8 ml de OptiMEM isento de soro contendo suficiente MVA/T7 para infectar cada poço de células a transfectar com cerca de 2 pfu por célula. Antes de iniciar a transfecção, a mistura de transfecção ADN-meio-Lipofectace foi combinada com 800 µl da mistura MVA/T7-meio e misturou-se suavemente através de pipetagem. Em seguida, os meios de cultura foram removidos das monocamadas celulares e foi adicionado às células 1 ml da mistura de transfecção combinada.

Após incubação de um dia para o outro, a mistura de transfecção e os meios foram substituídos por DMEM suplementado com FBS a 10% e as células foram incubadas mais um dia. Cerca de 48 horas após o início da transfecção, as células foram colhidas e os extractos preparados para análise da actividade de CAT tal como descrito anteriormente (96). A expressão de CAT é mostrada na Figura 1C. Nalgumas experiências, as proteínas nos extractos celulares brutos foram analisadas através de

"Western blotting" para monitorizar a expressão da proteína (97). As células transfectadas foram lisadas utilizando tampão TN (Tris [pH 7,4] 50 mM, NaCl 150 mM) suplementado com NP40 a 0,2%. Os extractos celulares foram clarificados através de centrifugação para remover os núcleos e foi adicionado ao extracto citoplasmático um volume igual de tampão de amostra de Laemmli (Tris [pH 6,8] 62,5 mM, glicerol a 25%, SDS a 2%, azul de bromofenol a 0,01%). As amostras foram ajustadas para conterem aproximadamente 2,5% de β -mercaptoetanol e depois fervidas. A electroforese em gel de SDS-poliacrilamida e a electrotransferência foram efectuadas utilizando protocolos padrão (97). A proteína V etiquetada com epitopo foi detectada utilizando o anticorpo monoclonal de ratinho 12CA5 (Roche Molecular Biology) ou o anticorpo monoclonal de rato 3F10 (Roche Molecular Biology). A detecção foi efectuada com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Sigma) e reagentes de quimioluminescência (Roche Molecular Biology ou New England Biolabs).

Exemplo 4

Repressão da Expressão do Mini-replicação através de Proteínas V Mutantes do Vírus do Sarampo

O ensaio de CAT de expressão transiente do mini-replicação descrito no Exemplo 3 foi repetido utilizando quantidades variáveis dos mutantes das proteínas V do vírus do sarampo haV-1 a haV-8, que têm as seguintes diferenças

da sequência de tipo selvagem (haV-wt) (ver Figura 3):

- haV-1 Deleção dos aminoácidos 231-299
- haV-2 Mutação do ácido glutâmico no aminoácido 225 para glicina
- haV-3 Mutações das lisinas nos aminoácidos 229 e 230 para alaninas
- haV-4 Mutações da lisina e treonina nos aminoácidos 204 e 209 para alaninas
- haV-5 Mutações da tirosina e do ácido aspártico nos aminoácidos 113 e 114 para alaninas
- haV-6 Mutações da leucina e glutamina nos aminoácidos 100 e 101 para alaninas
- haV-7 Mutações do ácido glutâmico e da cisteína nos aminoácidos 14 e 15 para alaninas
- haV-8 Mutações do ácido glutâmico nos aminoácidos 3 e 4 para alaninas

Foram utilizados 200 ou 400 ng de cada plasmídeo de V (codificando proteína V de tipo selvagem ou haV-1 a haV-8 V) e a actividade relativa de CAT foi medida como percentagem da actividade resultante de uma transfecção efectuada sem qualquer vector de expressão da proteína V (pista 2). Os resultados estão representados na Figura 4A. Uma percentagem mais baixa correlaciona-se com um grau mais elevado de repressão da expressão de CAT. A expressão da proteína V foi monitorizada através de um "Western blot" que foi analisado com um anticorpo anti-HA (Figura 4B).

O ensaio de CAT foi repetido utilizando

quantidades crescentes (100 ng a 1 µg) do plasmídeo de V codificando haV-1 e as actividades relativas estão representadas na Figura 4C.

Exemplo 5

Ensaio de Ligação ao ARN

Foram efectuados ensaios de ligação ao ARN (74, 76, 77) para avaliar a ligação da proteína V do vírus do sarampo ao ARN, utilizando resinas de agarose ligadas a polirribonucleótidos (Sigma). As células transfectadas foram lisadas tal como descrito acima utilizando tampão TN suplementado com NP40 a 0,5%, glicerol a 5%, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 1 mM e uma mistura de inibidores de proteases (Roche Molecular Biology). As resinas de agarose contendo polirribonucleótidos (aproximadamente 25-50 µl do volume estabelecido de contas) foram adicionadas ao lisado celular clarificado e incubadas 30-60 minutos a 4°C com agitação. Após a incubação, as resinas foram lavadas três vezes para remover as proteínas não ligadas. As proteínas foram eluídas das resinas através da fervura em tampão de Laemmli suplementado com β-mercaptoetanol a 2,5%. O procedimento é resumido pelo fluxograma da Figura 5A. As proteínas capturadas pelas resinas de polinucleótidos foram analisadas através de "Western blotting" tal como descrito acima. O ensaio foi realizado primeiro com proteína V de tipo selvagem, e depois com haV-1 até haV-11. Os mutantes haV-1 a haV-8 são tal como descritos acima; os mutantes

haV-9 a haV-11 possuem as seguintes diferenças da sequência de tipo selvagem (haV-wt) (ver Figura 3):

haV-9	Deleção dos aminoácidos 1-20
haV-10	Deleção dos aminoácidos 208-230
haV-11	Deleção dos aminoácidos 1-20 e 208-230

Os resultados estão representados nas Figuras 5B (tipo selvagem) e 6 (mutantes).

Exemplo 6

Repressão da Expressão do Mini-replicação através de Proteínas V Adicionais do Vírus do Sarampo Mutantes em CR2

O ensaio de CAT de expressão transiente do mini-replicação descrito nos Exemplos 3 e 4 foi repetido utilizando os mutantes de CR2 da proteína V do vírus do sarampo haV-5 e haV-23 até haV-25, que possuem as seguintes diferenças da sequência de tipo selvagem (haV) (SEQ ID NO: 7) em CR2 (aminoácidos 100-140; ver Figura 7):

haV-5 Mutações da tirosina e do ácido aspártico nos aminoácidos 113 e 114 para alaninas (SEQ ID NO: 8)

haV-23 Deleção dos aminoácidos 112 a 134 (SEQ ID NO: 9)

haV-24 Mutações do ácido aspártico e da histidina nos aminoácidos 114 e 115 para alaninas (SEQ ID NO: 10)

haV-25 Mutações da tirosina, do ácido

aspártico e da histidina nos aminoácidos 113 a 155 (SEQ ID NO: 11)

Foram utilizados 400 nanogramas de cada plasmídeo de V (codificando proteína V de tipo selvagem, haV-5 ou haV-23 até haV-25) e a actividade relativa de CAT foi medida como uma percentagem da actividade resultante de uma transfecção efectuada sem qualquer vector de expressão de proteína V (barra 1). Os resultados estão representados na Figura 8. Uma percentagem mais baixa correlaciona-se com um grau mais elevado de repressão da expressão de CAT.

Exemplo 7

Repressão da Expressão do Mini-replicação através de Proteínas V Adicionais do Vírus do Sarampo Mutantes no Terminal C

O ensaio de CAT de expressão transiente do mini-replicação descrito nos Exemplos 3 e 4 foi repetido utilizando os mutantes da proteína V do vírus do sarampo haV-1 e haV-12 até haV-22, que possuem as seguintes diferenças da sequência de tipo selvagem (haV) (SEQ ID NO: 7) no terminal C (aminoácidos 220-299; ver Figura 9):

haV-1 Deleção dos aminoácidos 232 a 299 (SEQ ID NO: 13)

haV-12 Mutações das cisteínas nos aminoácidos 251 e 255 para alaninas (SEQ ID NO: 14)

haV-13 Mutações das cisteínas nos aminoácidos

269 e 272 para alaninas (SEQ ID NO: 15)

haV-14 Deleção dos aminoácidos 279 a 299 (SEQ ID NO: 16)

haV-15 Deleção dos aminoácidos 267 a 299 (SEQ ID NO: 17)

haV-16 Deleção dos aminoácidos 250 a 299 (SEQ ID NO: 18)

haV-17 Deleção dos aminoácidos 243 a 299 (SEQ ID NO: 19)

haV-18 Deleção dos aminoácidos 236 a 299 (SEQ ID NO: 20)

haV-19 Deleção dos aminoácidos 229 a 299 (SEQ ID NO: 21)

haV-20 Mutações das argininas nos aminoácidos 233 e 234 para alaninas (SEQ ID NO: 22)

haV-21 Mutações das argininas nos aminoácidos 233 e 234 para ácido aspártico (SEQ ID NO: 23)

haV-22 Deleção dos aminoácidos 229 a 237 (SEQ ID NO: 24)

Foram utilizados 400 nanogramas de cada plasmídeo de V (codificando a proteína V de tipo selvagem, haV-1 ou haV-12 até haV-22) e a actividade relativa de CAT foi medida como uma percentagem da actividade resultante de uma transfecção efectuada sem qualquer vector de expressão de proteína V (barra 1). Os resultados estão representados na Figura 10. Uma percentagem mais baixa correlaciona-se com um grau mais elevado de repressão da expressão de CAT.

BIBLIOGRAFIA

1. Black, F.L., et al., *Am. J. Epidemiol.* 124: 442-452 (1986).
2. Lennon, J.L. e Black, F.L., *J. Pediatrics* 108: 671-676 (1986).
3. Pabst, H.F., et al., *Pediatr. Infect. Dis. J.* 11: 525-529 (1992).
4. Centers for Disease Control, *MMWR* 40: 369-372 (1991).
5. Centers for Disease Control, *MMWR* 41: S6, 1-12 (1992).
6. King, G.E., et al., *Pediatr. Infect. Dis. J.* 10: 883-887 (1991).
7. Rota, J.S., et al., *Virology* 188: 135-142 (1992).
8. Griffin, D.E. e Bellini, W.J., págs. 1267-1312 do Volume 1, *Fields Virology*, B.N. Fields, et al., Eds. (3^a ed., Raven Press, 1996).
9. Lamb, R.A. e Kolakosky, D., págs. 1177-1204 do Volume 1, *Fields Virology*, B.N. Fields, et al., Eds. (3^a ed., Raven Press, 1996).

10. Birrer, M.J., et al., *Virology* 108: 381-390 (1981).
11. Birrer, M.J., et al., *Nature* 293: 67-69 (1981).
12. Norby, E., et al., págs. 481-507, em "The Paramyxoviruses", D. Kingsbury, Ed. (Plenum Press, 1991).
13. Peebles, M.E., págs. 427-456, em "The Paramyxoviruses", D. Kingsbury, Ed. (Plenum Press, 1991).
14. Egelman, E.H., et al., *J. Virol.* 63: 2233-2243 (1989).
15. Udem, S.A., et al., *J. Virol. Methods* 8: 123-136 (1984).
16. Udem, S.A. e Cook, K.A., *J. Virol.* 49: 57-65 (1984).
17. Moyer, S.A. e Horikami, S.M., págs. 249-274, em "The Paramyxoviruses", D. Kingsbury, Ed. (Plenum Press, 1991).
18. Cattaneo, R., et al., *Cell* 56: 759-764 (1989).

19. Nagai, Y., *Rev. Med. Virol.* 9: 83-99 (1999).
20. Bellini, W.J., *et al.*, *J. Virol.* 53: 908-919 (1985).
21. Baron, M.D. e Barrett, T., *J. Virol.* 74: 2603-2611 (2000).
22. Delenda, C., *et al.*, *Virology* 242: 327-337 (1998).
23. Durbin, A.P., *et al.*, *Virology* 261: 319-330 (1999).
24. Kato, A., *et al.*, *J. Virol.* 71: 7266-7272 (1997).
25. Schneider, H., *et al.*, *Virology* 227: 314-322 (1997).
26. Kato, A., *et al.*, *EMBO J.* 16: 578-587 (1997).
27. Tober, C., *et al.*, *J. Virol.* 72: 8124-8132 (1998).
28. Valsamakis, A., *et al.*, *J. Virol.* 72: 7754-7761 (1998).

29. Patterson, J.B., et al., *Virology* 267: 80-89 (2000).
30. Parks, C.L., et al., *J. Virol.* 75: 910-920 (2001).
31. Takeda, M., et al., *J. Virol.* 72: 8690-8696 (1998).
32. Bankamp, B., et al., *Virology* 216: 272-277 (1996).
33. Curran, J., et al., *J. Virol.* 69: 849-855 (1995).
34. Harty, R.N. e Palese, P., *J. Gen Virol.* 76: 2863-2867 (1995).
35. Horikami, S.M., et al., *Virology* 222: 383-390 (1996).
36. Nishio, M., et al., *J. Gen. Virol.* 77: 2457-2463 (1996).
37. Randall, R.E. e Bermingham, A., *Virology* 224: 121-129 (1996).
38. Shaji, D. e Shaila, M.S., *Virology* 258: 415-424 (1999).

39. Watanabe, N., et al., *Medical Microbiology & Immunology* 185: 89-94 (1996).
40. Precious, B., et al., *J. Virol.* 69: 8001-8010 (1995).
41. Watanabe, N., et al., *J. Gen. Virol.* 77: 327-328 (1996).
42. Lin, G.Y., et al., *Virology* 249: 189-200 (1998).
43. Liston, P., et al., *Virus Res.* 38: 241-259 (1995).
44. Didcock, L., et al., *J. Virol.* 73: 9928-9933 (1999).
45. Curran, J., et al., *EMBO J.* 10: 3079-3085 (1991).
46. Baron, M.D., et al., *J. Gen. Virol.* 74: 299-304 (1993).
47. Thomas, S.M., et al., *Cell* 54: 891-902 (1988).
48. Borden, K.L.B. e Freemont, P.S., *Curr. Opinion Stuctural Biol.* 6: 395-401 (1996).

49. Choo, Y. e Klug, A., *Curr. Opinion Structural Biol.* 7: 117-125 (1997).
50. O'Halloran, T.V., *Science* 261: 715-725 (1993).
51. Liston, P. e Briedis, D.J., *Virology* 198: 399-404 (1994).
52. Paterson, R.G., et al., *Virology* 208: 121-131 (1995).
53. Steward, M., et al., *Archives Virol.* 140: 1321-1328 (1995).
54. Blumberg, B., et al., págs. 235-247, em "The Paramyxoviruses", D. Kingsbury, Ed. (Plenum Press, 1991).
55. Berrett, T., et al., págs. 83-102, em "The Paramyxoviruses", D. Kingsbury, Ed. (Plenum Press, 1991).
56. Tordo, N., et al., *Sem. in Virology* 3: 341-357 (1992).
57. Cattaneo, R., et al., *EMBO J.* 6: 681-688 (1987).
58. Castaneda, S.J. e Wong, T.C., *J. Virol.* 63: 2977-2986 (1989).

59. Castaneda, S.J. e Wong, T.C., *J. Virol.* 64: 222-230 (1990).
60. Parks, C.L., et al., *J. Virol.* 75: 921-933 (2001).
61. Moss, B., et al., *Nature* 348: 91-92 (1990).
62. Wyatt, L.S., et al., *Virology* 210: 202-205 (1995).
63. Sidhu, M.S., et al., *Virology* 208: 800-807 (1995).
64. Huber, M., et al., *Virology* 185: 299-308 (1991).
65. Alber, T., *Curr. Opin. Genetics Dev.* 2: 205-210 (1992).
66. Baxevanis, A.D. e Vinson, C.R., *Curr. Opin. Genetics Dev.* 3: 278-285 (1993).
67. Kolodziej, P.A. e Young, R.A., *Methods Enzymology* 194: 508-519 (1991).
68. Bass, S.H., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4498-4502 (1991).

69. Diamond, S.E. e Kirkegaard, K., *J. Virol.* 68: 863-876 (1994).
70. Gibbs, C.S. e Zoller, M.J., *J. Biol. Chem.* 266: 8923-8931 (1991).
71. Giniger, E. e Ptashne, M., *Nature* 330: 670-672 (1987).
72. Sedlmeirer, R. e Neubert, W.J., *Adv. Virus Res.* 50: 101-139 (1998).
73. Lin, G.Y., et al., *Virology* 238: 460-469 (1997).
74. Elenbaas, B., et al., *Molecular Medicine* 2: 439-451 (1996).
75. Kiledjian, M. e Dreyfuss, G., *EMBO J.* 11: 2655-2664 (1992).
76. Siomi, H., et al., *Cell* 74: 291-298 (1993).
77. Swanson, M. e Dreyfuss, G., *Mol. Cell. Biol.* 8: 2237-2241 (1988).
78. Mitchell, P. e Tjian, R., *Science* 245: 371-378 (1989).

79. Conzelmann, K.K., *Annual Review of Genetics* 32: 123-162 (1998).

80. Radecke, F. e Billeter, M.A., *Rev. Med. Virology* 7: 49-63 (1997).

81. Roberts, A. e Rose, J.K., *Virology* 247: 1-6 (1998).

82. Garcin, D., et al., *EMBO J.* 14: 6087-6094 (1995).

83. Radecke, F., et al., *EMBO J.* 14: 5773-5784 (1995).

84. Collins, P.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11563-11567 (1995).

85. Pedido de Patente Internacional Publicado N° WO 98/53078.

86. Pedido de Patente Europeia Publicado N° 702085.

87. Rota, J.S., et al., *Virus Res.* 31: 317-330 (1994).

88. Pedido de Patente Internacional Publicado N° WO 97/06270.

89. Baron, M.D. e Barrett, T., *J. Virology* 71: 1265-1271 (1997).
90. Kato, A., et al., *Genes to Cells* 1: 569-579 (1996).
91. Shaffer, M.F., et al., *J. Immunol.* 41: 241-256 (1941).
92. Enders, J.F., et al., *N. Engl. J. Med.* 263, 153-159 (1960).
93. Pedido de Patente Internacional Publicado N° WO 98/13501.
94. Pedido de Patente Internacional Publicado N° WO 99/49017.
95. Chomczynski, P. e Sacchi, N., *Analytical Biochem.* 162: 156-159 (1987).
96. Parks, C.L., et al., *J. Virol.* 73: 3560-3566 (1999).
97. Ausubel, F.M., et al., eds., "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, NY 1987.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> American Cyanamid Company

<120> Proteínas V Modificadas de *Morbillivirus*

<130> AM100239PCT

<140>

<141>

<150> US60/213655

<151> 2000-06-23

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 299

<212> PRT

<213> Vírus do sarampo

<400> 1

```

Met Ala Glu Glu Gln Ala Arg His Val Lys Asn Gly Leu Glu Cys Ile
  1              5              10              15

Arg Ala Leu Lys Ala Glu Pro Ile Gly Ser Leu Ala Ile Glu Glu Ala
      20              25              30

Met Ala Ala Trp Ser Glu Ile Ser Asp Asn Pro Gly Gln Glu Arg Ala
      35              40              45

Thr Cys Arg Glu Glu Lys Ala Gly Ser Ser Gly Leu Ser Lys Pro Cys
      50              55              60

Leu Ser Ala Ile Gly Ser Thr Glu Gly Gly Ala Pro Arg Ile Arg Gly
      65              70              75              80

Gln Gly Pro Gly Glu Ser Asp Asp Asp Ala Glu Thr Leu Gly Ile Pro
      85              90              95

Pro Arg Asn Leu Gln Ala Ser Ser Thr Gly Leu Gln Cys Tyr Tyr Val
      100             105             110

Tyr Asp His Ser Gly Glu Ala Val Lys Gly Ile Gln Asp Ala Asp Ser
      115             120             125

Ile Met Val Gln Ser Gly Leu Asp Gly Asp Ser Thr Leu Ser Gly Gly
      130             135             140

```


Asp	Asn	Glu	Ser	Glu	Asn	Ser	Asp	Val	Asp	Ile	Gly	Glu	Pro	Asp	Thr	145	150	155	160
Glu	Gly	Tyr	Ala	Ile	Thr	Asp	Arg	Gly	Ser	Ala	Pro	Ile	Ser	Met	Gly	165	170	175	
Phe	Arg	Ala	Ser	Asp	Val	Glu	Thr	Ala	Glu	Gly	Gly	Glu	Ile	His	Glu	180	185	190	
Leu	Leu	Arg	Leu	Gln	Ser	Arg	Gly	Asn	Asn	Phe	Pro	Lys	Leu	Glu	Lys	195	200	205	
Thr	Leu	Asn	Val	Pro	Pro	Pro	Pro	Asp	Pro	Gly	Arg	Ala	Ser	Thr	Ser	210	215	220	
Glu	Thr	Pro	Ile	Lys	Lys	Gly	His	Arg	Arg	Glu	Ile	Ser	Leu	Ile	Trp	225	230	235	240
Asn	Gly	Asp	Arg	Val	Phe	Ile	Asp	Arg	Trp	Cys	Asn	Pro	Met	Cys	Ser	245	250	255	
Lys	Val	Thr	Leu	Gly	Thr	Ile	Arg	Ala	Arg	Cys	Thr	Cys	Gly	Glu	Cys	260	265	270	
Pro	Arg	Val	Cys	Glu	Gln	Cys	Arg	Thr	Asp	Thr	Gly	Val	Asp	Thr	Arg	275	280	285	
Ile	Trp	Tyr	His	Asn	Leu	Pro	Glu	Ile	Pro	Glu						290	295		

<210> 2

<211> 299

<212> PRT

<213> Virus da peste bovina

<400> 2

Met	Ala	Glu	Glu	Gln	Ala	Tyr	His	Val	Asn	Lys	Gly	Leu	Glu	Cys	Ile
1				5					10					15	
Lys	Ala	Leu	Arg	Ala	Arg	Pro	Leu	Asp	Pro	Leu	Val	Val	Glu	Glu	Ala
			20					25					30		
Leu	Ala	Ala	Trp	Val	Glu	Thr	Ser	Glu	Gly	Gln	Thr	Leu	Asp	Arg	Met
		35					40					45			
Ser	Ser	Asp	Glu	Ala	Glu	Ala	Asp	His	Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Pro	Cys
	50					55					60				
Phe	Pro	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Lys	Ser	Ser	Met	Ser	Arg	Cys	His	Asp
65					70					75					80
Gln	Gly	Leu	Arg	Gly	Ser	Asn	Ser	Cys	Asp	Glu	Glu	Leu	Gly	Ala	Phe
				85					90					95	
Ile	Gly	Asp	Ser	Ser	Met	His	Ser	Thr	Glu	Val	Gln	His	Tyr	His	Val
			100					105					110		
Tyr	Asp	His	Ser	Gly	Glu	Lys	Val	Glu	Gly	Val	Glu	Asp	Ala	Asp	Ser
		115					120					125			
Ile	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Asp	Asp	Gly	Val	Glu	Val	Trp	Gly	Gly
	130					135					140				
Asp	Glu	Glu	Ser	Glu	Asn	Ser	Asp	Val	Asp	Ser	Gly	Glu	Pro	Asp	Pro
145					150					155					160
Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Ala	Asp	Trp	Gly	Ser	Ser	Pro	Ile	Ser	Pro	Ala
				165					170					175	
Thr	Arg	Ala	Ser	Asp	Val	Glu	Thr	Val	Glu	Gly	Asp	Glu	Ile	Gln	Lys

- 89 -

```
<210> 3
<211> 303
<212> PRT
<213> Morbillivirus do golfinho
<400> 3
```

Met Ala Glu Glu Gln Ala Tyr His Ile Asn Lys Gly Leu Glu Cys Le
 1 5 10 15
 Lys Ser Leu Arg Glu Asn Pro Pro Asp Ala Val Glu Ile Lys Glu Al
 20 25 30
 Gln Ile Ile Arg Ser Lys Ala Ala Cys Glu Glu Ser Ser Glu Ser Hi
 35 40 45
 His Gln Asp Asn Ser Glu Lys Asp Thr Leu Asp Phe Asp Glu Ser Cy
 50 55 60
 Ser Ser Ala Ile Arg Pro Glu Thr Tyr Arg Met Leu Leu Gly Asp As
 65 70 75 80
 Thr Gly Phe Arg Ala Pro Gly Tyr Ile Pro Asn Glu Gly Glu Pro Gl
 85 90 95
 Pro Gly Asp Ile Gly Lys Glu Glu Pro Ala Val Arg Cys Tyr His Va
 100 105 110
 Tyr Asp His Gly Gly Gln Ala Val Glu Gly Val Lys Asp Ala Asp Le
 115 120 125
 Leu Val Val Pro Thr Gly Ser Asp Asp Asp Ala Glu Phe Arg Asp Gl
 130 135 140
 Asp Glu Ser Ser Leu Glu Ser Asp Gly Glu Ser Gly Thr Val Asp Th
 145 150 155 160
 Arg Gly Asn Ser Ser Ser Asn Arg Gly Ser Ala Pro Arg Ile Lys Va
 165 170 175
 Glu Arg Ser Ser Asp Val Glu Thr Ile Ser Ser Glu Glu Leu Gln Gly
 180 185 190
 Leu Ile Arg Ser Gln Ser Gln Lys His Asn Gly Phe Gly Val Asp Arg
 195 200 205
 Phe Leu Lys Val Pro Pro Ile Pro Thr Ser Val Pro Leu Asp Pro Ala
 210 215 220
 Pro Lys Ser Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu Ile Ser Leu Ile Trp
 225 230 235 240
 Asp Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys Asn Pro Thr Cys Ser
 245 250 255

Arg Ile Lys Met Gly Ile Val Arg Val Lys Cys Thr Cys Gly Glu Cys
 260 265 270

Pro Pro Val Cys Asp Glu Cys Arg Glu Asp Pro Glu Thr Pro Thr Arg
 275 280 285

Ile Trp Tyr His Ser Leu Pro Glu Ile Pro Glu Gln Trp Pro Phe
 290 295 300

<210> 4

<211> 299

<212> PRT

<213> vírus da esgana canina

<400> 4

Met Ala Glu Glu Gln Ala Tyr His Val Ser Lys Gly Leu Glu Cys Leu
 1 5 10 15

Lys Ala Leu Arg Glu Asn Pro Pro Asp Ile Glu Glu Ile Gln Glu Val
 20 25 30

Ser Ser Leu Arg Asp Gln Thr Cys Asn Pro Gly Gln Glu Asn Gly Thr
 35 40 45

Thr Gly Met Gln Glu Glu Glu Asp Ser Gln Asn Leu Asp Glu Ser His
 50 55 60

Glu Pro Thr Lys Gly Ser Asn Tyr Val Gly His Val Pro Gln Asn Asn
 65 70 75 80

Pro Gly Cys Gly Glu Arg Asn Thr Ala Leu Val Glu Ala Glu Arg Pro
 85 90 95

Pro Arg Glu Asp Ile Gln Pro Gly Pro Gly Ile Arg Cys Asp His Val
 100 105 110

Tyr Asp His Ser Gly Glu Glu Val Lys Gly Ile Glu Asp Ala Asp Ser
 115 120 125

Leu Val Val Pro Ala Gly Thr Val Gly Asn Arg Gly Phe Glu Arg Gly
 130 135 140

Glu Gly Ser Leu Asp Asp Ser Thr Glu Asp Ser Gly Glu Asp Tyr Ser

145		150		155		160
Glu Gly Asn Ala Ser Ser Asn Trp Gly Tyr Ser Phe Gly Leu Lys Pro						
		165		170		175
Asp Arg Ala Ala Asp Val Ser Met Leu Met Glu Glu Glu Leu Ser Ala						
		180		185		190
Leu Leu Arg Thr Ser Arg Asn Val Gly Ile Gln Lys Arg Asp Gly Lys						
		195		200		205
Thr Leu Gln Phe Pro His Asn Pro Glu Gly Lys Thr Arg Asp Pro Glu						
		210		215		220
Cys Gly Ser Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu Val Ser Leu Thr Trp						
		225		230		235
Asn Gly Asp Ser Cys Trp Ile Asp Lys Trp Cys Asn Pro Ile Cys Thr						
		245		250		255
Gln Val Asn Trp Gly Ile Ile Arg Ala Lys Cys Phe Cys Gly Glu Cys						
		260		265		270
Pro Pro Thr Cys Asn Glu Cys Lys Asp Asp Pro Glu Met Gln Thr Arg						
		275		280		285
Val Trp His Ala Thr Pro Ser Gln Asp Leu Lys						
		290		295		

<210> 5
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: etiqueta de epitopo

<400> 5

ccatggctta tccttatgac gtgcctgact atgcc

35

<210> 6
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador

<400> 6

cggccatggc agaagagaca ggcacgccac gtaaaaaacg gac

43

<210> 7
<211> 41
<212> PRT
<213> Vírus do Sarampo

<400> 7

Leu	Gln	Ala	Ser	Ser	Thr	Gly	Leu	Gln	Cys	Tyr	Tyr	Val	Tyr	Asp	His
1				5					10					15	
Ser	Gly	Glu	Ala	Val	Lys	Gly	Ile	Gln	Asp	Ala	Asp	Ser	Ile	Met	Val
			20					25					30		
Gln	Ser	Gly	Leu	Asp	Gly	Asp	Ser	Thr							
		35					40								

<210> 8
<211> 41
<212> PRT
<213> Vírus do sarampo

<400> 8

Leu	Gln	Ala	Ser	Ser	Thr	Gly	Leu	Gln	Cys	Tyr	Tyr	Val	Ala	Ala	His
1				5					10					15	
Ser	Gly	Glu	Ala	Val	Lys	Gly	Ile	Gln	Asp	Ala	Asp	Ser	Ile	Met	Val
			20					25					30		
Gln	Ser	Gly	Leu	Asp	Gly	Asp	Ser	Thr							
		35					40								

<210> 9
<211> 18
<212> PRT
<213> Vírus do sarampo

<400> 9

Leu	Gln	Ala	Ser	Ser	Thr	Gly	Leu	Gln	Cys	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Gly	Asp
1				5					10					15	
Ser	Thr														

<210> 10
<211> 41
<212> PRT
<213> Vírus do sarampo

<400> 10

<210> 11
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Vírus do sarampo

<400> 11

Leu	Gln	Ala	Ser	Ser	Thr	Gly	Leu	Gln	Cys	Tyr	Tyr	Val	Ala	Ala	Ala
1				5					10					15	
Ser	Gly	Glu	Ala	Val	Lys	Gly	Ile	Gln	Asp	Ala	Asp	Ser	Ile	Met	Val
			20					25					30		
Gln	Ser	Gly	Leu	Asp	Gly	Asp	Ser	Thr							
		35					40								

<210> 12
 <211> 80
 <212> PRT
 213> Vírus do sarampo

<400> 12

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

<210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Vírus do sarampo

<400> 13

Arg	Ala	Ser	Thr	Ser	Glu	Thr	Pro	Ile	Lys	Lys	Gly
1				5					10		

<210> 14
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Vírus do sarampo

- 95 -

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

<400> 15

```

Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu
 1             5             10             15

Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys
          20             25             30

Asn Pro Met Cys Ser Lys Val Thr Leu Gly Thr Ile Arg Ala Arg Cys
          35             40             45

Thr Ala Gly Glu Ala Pro Arg Val Cys Glu Gln Cys Arg Thr Asp Thr
          50             55             60

Gly Val Asp Thr Arg Ile Trp Tyr His Asn Leu Pro Glu Ile Pro Glu
 65             70             75             80

```

<400> 16

```

Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu
 1          5          10          15
Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys
          20          25          30
Asn Pro Met Cys Ser Lys Val Thr Leu Gly Thr Ile Arg Ala Arg Cys
          35          40          45
Thr Cys Gly Glu Cys Pro Arg Val Cys Glu Gln
          50          55

```

<210> 17
<211> 47
<212> PRT
<213> Vírus do sarampo

<400> 17

Arg	Ala	Ser	Thr	Ser	Glu	Thr	Pro	Ile	Lys	Lys	Gly	His	Arg	Arg	Glu
1				5					10					15	
Ile	Ser	Leu	Ile	Trp	Asn	Gly	Asp	Arg	Val	Phe	Ile	Asp	Arg	Trp	Cys
			20					25					30		
Asn	Pro	Met	Cys	Ser	Lys	Val	Thr	Leu	Gly	Thr	Ile	Arg	Ala	Arg	
		35					40					45			

<210> 18
<211> 30
<212> PRT
<213> Vírus do sarampo

<400> 18

Arg	Ala	Ser	Thr	Ser	Glu	Thr	Pro	Ile	Lys	Lys	Gly	His	Arg	Arg	Glu
1				5					10					15	
Ile	Ser	Leu	Ile	Trp	Asn	Gly	Asp	Arg	Val	Phe	Ile	Asp	Arg		
			20					25					30		

<210> 19
<211> 23
<212> PRT
<213> Vírus do sarampo

<400> 19

Arg	Ala	Ser	Thr	Ser	Glu	Thr	Pro	Ile	Lys	Lys	Gly	His	Arg	Arg	Glu
1				5					10					15	
Ile	Ser	Leu	Ile	Trp	Asn	Gly									
			20												

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> Vírus do sarampo

<400> 20

Arg	Ala	Ser	Thr	Ser	Glu	Thr	Pro	Ile	Lys	Lys	Gly	His	Arg	Arg	Glu
1				5					10					15	

<210> 21

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Vírus do sarampo

<400> 21

Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile
 1 5

<210> 22
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Vírus do sarampo

<400> 22

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

<210> 23
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Vírus do sarampo

<400> 23

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

<210> 24
<211> 71
<212> PRT
<213> Vírus do sarampo

<400> 24
Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg
1 5 10 15
Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys Asn Pro Met Cys Ser Lys Val Thr Leu
20 25 30
Gly Thr Ile Arg Ala Arg Cys Thr Cys Gly Glu Cys Pro Arg Val Cys
35 40 45
Glu Gln Cys Arg Thr Asp Thr Gly Val Asp Thr Arg Ile Trp Tyr His
50 55 60
Asn Leu Pro Glu Ile Pro Glu

Lisboa, 29 de Dezembro de 2006

REIVINDICAÇÕES

1. Vírus de ARN de cadeia simples, de sentido negativo, não segmentado, gerado de forma recombinante e isolado do género *Morbillivirus*, em que o referido vírus compreende pelo menos uma mutação na sua proteína V de *Morbillivirus* **caracterizada por** pelo menos uma mutação ser seleccionada a partir do grupo que consiste nos aminoácidos 113 e 114 da proteína V do vírus do sarampo ou nos aminoácidos de uma proteína V de *Morbillivirus* correspondente a estes.

2. *Morbillivirus* da reivindicação 1, em que o vírus é seleccionado a partir do grupo que consiste em vírus do sarampo, vírus da esgana canina, vírus da peste bovina, vírus da peste dos pequenos ruminantes, *Morbillivirus* do golfinho e vírus da esgana das focas.

3. *Morbillivirus* da reivindicação 1, em que a mutação é no aminoácido 113 da proteína V do vírus do sarampo ou nos aminoácidos correspondentes a este.

4. *Morbillivirus* da reivindicação 3, em que a mutação no aminoácido 113 da proteína V do vírus do sarampo ou no aminoácido correspondente a este é de tirosina para alanina.

5. *Morbillivirus* da reivindicação 1, em que a

mutação é no aminoácido 114 da proteína V do vírus do sarampo ou no aminoácido correspondente a este.

6. *Morbillivirus* da reivindicação 5, em que a mutação no aminoácido 114 da proteína V do vírus do sarampo ou no aminoácido correspondente a este é de ácido aspártico para alanina.

7. *Morbillivirus* da reivindicação 1, em que existe uma mutação em ambos os aminoácidos 113 e 114 da proteína V do vírus do sarampo ou em ambos os aminoácidos correspondentes a estes.

8. *Morbillivirus* da reivindicação 7, em que a mutação no aminoácido 113 da proteína V do vírus do sarampo ou no aminoácido correspondente a este é de tirosina para alanina e a mutação no aminoácido 114 da proteína V do vírus do sarampo ou no aminoácido correspondente a este é de ácido aspártico para alanina.

9. *Morbillivirus* da reivindicação 2, em que o vírus é o vírus do sarampo.

10. Vírus do sarampo da reivindicação 9, que compreende ainda uma mutação ou uma deleção de pelo menos uma porção da região carboxi-terminal (C-terminal) compreendendo ou correspondendo aos aminoácidos 231-299 da proteína V do vírus do sarampo.

11. Vírus do sarampo da reivindicação 10, em que a mutação na região C-terminal é em cada um dos aminoácidos 233 e 234.

12. Vírus do sarampo da reivindicação 11, em que a mutação em cada um dos aminoácidos 233 e 234 é de arginina para alanina.

13. Vírus do sarampo da reivindicação 11, em que a mutação em cada um dos aminoácidos 233 e 234 é de arginina para ácido aspártico.

14. Vírus do sarampo da reivindicação 10, em que a deleção é seleccionada a partir do grupo que consiste na deleção dos aminoácidos 232 a 299, 279 a 299, 267 a 299, 250 a 299, 243 a 299 e 236 a 299.

15. Vírus do sarampo da reivindicação 14, em que a deleção é dos aminoácidos 232 a 299.

16. Vírus do sarampo da reivindicação 15, em que a deleção se prolonga para montante da região C-terminal e é dos aminoácidos 229 a 299.

17. Vírus do sarampo da reivindicação 9, que compreende ainda:

a) pelo menos uma mutação atenuante na região promotora genómica 3' seleccionada a partir do grupo que consiste no nucleótido 26 (A → T), no nucleótido 42 (A → T

ou A → C) e no nucleótido 96 (G → A), onde estes nucleótidos são apresentados na cadeia positiva, antigenómica, no sentido da mensagem; e

b) pelo menos uma mutação atenuante no gene da ARN-polimerase seleccionada a partir do grupo que consiste nas mudanças de nucleótidos que produzem mudanças num aminoácido seleccionado a partir do grupo que consiste nos resíduos 331 (isoleucina → treonina), 1409 (alanina → treonina), 1624 (treonina → alanina), 1649 (arginina → metionina), 1717 (ácido aspártico → alanina), 1936 (histidina → tirosina), 2074 (glutamina → arginina) e 2114 (arginina → lisina).

18. Vírus do sarampo da reivindicação 9, que compreende ainda pelo menos uma mutação atenuante seleccionada a partir do grupo que consiste em:

a) para o gene N, mudanças de nucleótidos que produzem mudanças num aminoácido seleccionado a partir do grupo que consiste nos resíduos 129 (glutamina → lisina), 148 (ácido glutâmico → glicina) e 479 (serina → treonina);

b) para o gene P, mudanças de nucleótidos que produzem mudanças num aminoácido seleccionado a partir do grupo que consiste nos resíduos 225 (ácido glutâmico → glicina), 275 (cisteína → tirosina) e 439 (leucina → prolina);

c) para o gene C, mudanças de nucleótidos que produzem mudanças num aminoácido seleccionado a partir do grupo que consiste nos resíduos 73 (alanina → valina), 104 (metionina → treonina) e 134 (serina → tirosina); e

d) para o sinal de terminação do gene F, a mudança no nucleótido 7243 (T → C), onde estes nucleótidos são apresentados na cadeia positiva, antigenómica, no sentido da mensagem.

19. Vírus do sarampo da reivindicação 10, que compreende ainda:

a) pelo menos uma mutação atenuante na região promotora genómica 3' seleccionada a partir do grupo que consiste no nucleótido 26 (A → T), no nucleótido 42 (A → T ou A → C) e no nucleótido 96 (G → A), onde estes nucleótidos são apresentados na cadeia positiva, antigenómica, no sentido da mensagem; e

b) pelo menos uma mutação atenuante no gene da ARN-polimerase seleccionada a partir do grupo que consiste nas mudanças de nucleótidos que produzem mudanças num aminoácido seleccionado a partir do grupo que consiste nos resíduos 331 (isoleucina → treonina), 1409 (alanina → treonina), 1624 (treonina → alanina), 1649 (arginina → metionina), 1717 (ácido aspártico → alanina), 1936 (histidina → tirosina), 2074 (glutamina → arginina) e 2114 (arginina → lisina).

20. Vírus do sarampo da reivindicação 10, que compreende ainda pelo menos uma mutação atenuante seleccionada a partir do grupo que consiste em:

a) para o gene N, mudanças de nucleótidos que produzem mudanças num aminoácido seleccionado a partir do grupo que consiste nos resíduos 129 (glutamina → lisina), 148 (ácido glutâmico → glicina) e 479 (serina → treonina);

b) para o gene P, mudanças de nucleótidos que produzem mudanças num aminoácido seleccionado a partir do grupo que consiste nos resíduos 225 (ácido glutâmico → glicina), 275 (cisteína → tirosina) e 439 (leucina → prolina);

c) para o gene C, mudanças de nucleótidos que produzem mudanças num aminoácido seleccionado a partir do grupo que consiste nos resíduos 73 (alanina → valina), 104 (metionina → treonina) e 134 (serina → tirosina); e

d) para o sinal de terminação do gene F, a mudança no nucleótido 7243 (T → C), onde estes nucleótidos são apresentados na cadeia positiva, antigenómica, no sentido da mensagem.

21. *Morbillivirus* da reivindicação 2, em que o vírus é o vírus da esgana canina.

22. Vírus da esgana canina da reivindicação 21, que compreende ainda uma mutação ou uma deleção de pelo menos uma porção da região C-terminal correspondente aos aminoácidos 231-299 da proteína V do vírus da esgana canina.

23. *Morbillivirus* da reivindicação 2, em que o vírus é o vírus da peste bovina.

24. Vírus da peste bovina da reivindicação 23 que compreende ainda uma mutação ou uma deleção de pelo menos uma porção da região C-terminal correspondente aos aminoácidos 231-299 da proteína V do vírus da peste bovina.

25. *Morbillivirus* da reivindicação 2, em que o vírus é o *Morbillivirus* do golfinho.

26. *Morbillivirus* do golfinho da reivindicação 25 que compreende ainda uma mutação ou uma deleção de pelo menos uma porção da região C-terminal correspondente aos aminoácidos 231-299 da proteína V do *Morbillivirus* do golfinho.

27. Composição imunogénica compreendendo um vírus isolado de acordo com a reivindicação 1.

28. Utilização de uma composição de acordo com a reivindicação 27 na preparação de uma composição para imunização de um indivíduo contra um vírus de ARN de cadeia simples, de sentido negativo, não segmentado, do género *Morbillivirus*.

29. Composição imunogénica da reivindicação 27 que compreende ainda um adjuvante.

30. Utilização de uma composição de acordo com a reivindicação 29 na preparação de uma composição para imunização de um indivíduo contra um vírus de ARN de cadeia simples, de sentido negativo, não segmentado, do género *Morbillivirus*.

31. Método para redução da repressão causada por uma proteína V do género *Morbillivirus* que compreende a inserção de pelo menos uma mutação na proteína V de *Morbillivirus*, em que a referida mutação é seleccionada a partir do grupo que consiste na mutação dos aminoácidos 113 e 114 da proteína V do vírus do sarampo ou dos aminoácidos de uma proteína V de *Morbillivirus* correspondentes a estes.

32. Sequência nucleotídica isolada codificando uma proteína V de *Morbillivirus* que foi modificada através da inserção de pelo menos uma mutação na proteína V de *Morbillivirus*, em que a referida mutação é seleccionada a partir do grupo que consiste na mutação dos aminoácidos 113 e 114 da proteína V do vírus do sarampo ou dos aminoácidos de uma proteína V de *Morbillivirus* correspondentes a estes.

33. Composição que compreende:

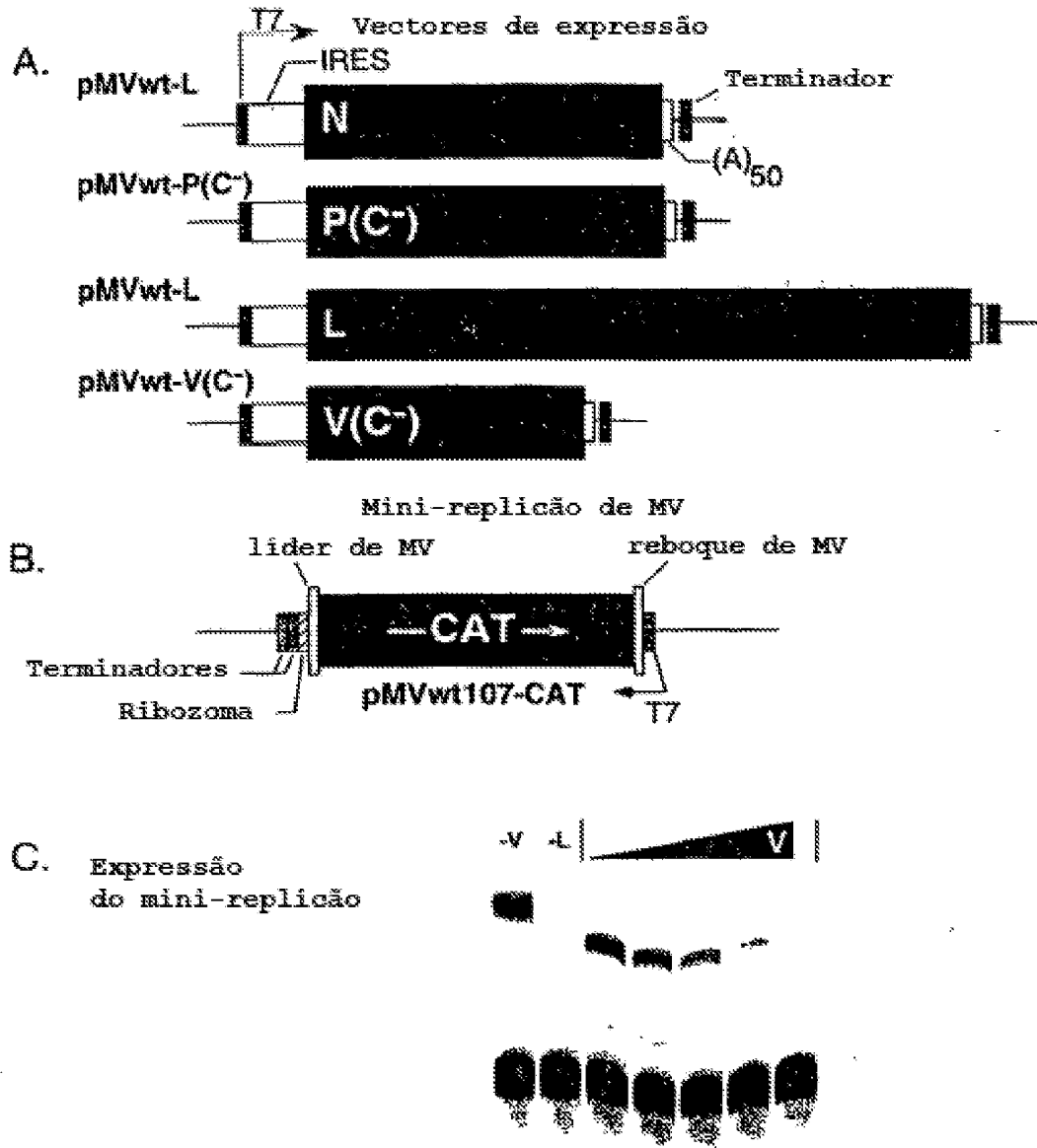
i) um vector de transcrição compreendendo uma molécula de ácido nucleico isolada codificando um genoma ou antígenoma de um *Morbillivirus*, em que a porção da molécula de ácido nucleico isolada que codifica a proteína V é a sequência nucleotídica da reivindicação 32, e

ii) pelo menos um vector de expressão que compreende pelo menos uma molécula de ácido nucleico isolada codificando as proteínas de acção em *trans* N, P e L necessárias para encapsidação, transcrição e replicação, através da qual após expressão é produzido um *Morbillivirus* infeccioso.

34. Método para produção de um *Morbillivirus* infeccioso que compreende a transformação, infecção ou transfecção de células hospedeiras com pelo menos os dois vectores da reivindicação 33 e cultura das células hospedeiras sob condições que permitam a co-expressão destes vectores de forma produzir o *Morbillivirus* infeccioso.

Lisboa, 29 de Dezembro de 2006

FIGURA 1



Pista	1	2	3	4	5	6	7
Atividade relativa	100	3.0	77	45	21	9.0	6.0
Vec. de exp. de V (ng)	-	-	25	50	100	200	400
Vec. de expressão de L	+	-	+	+	+	+	+

FIGURA 2

PROTEÍNA V DE MV, CDV, RPV E DMV

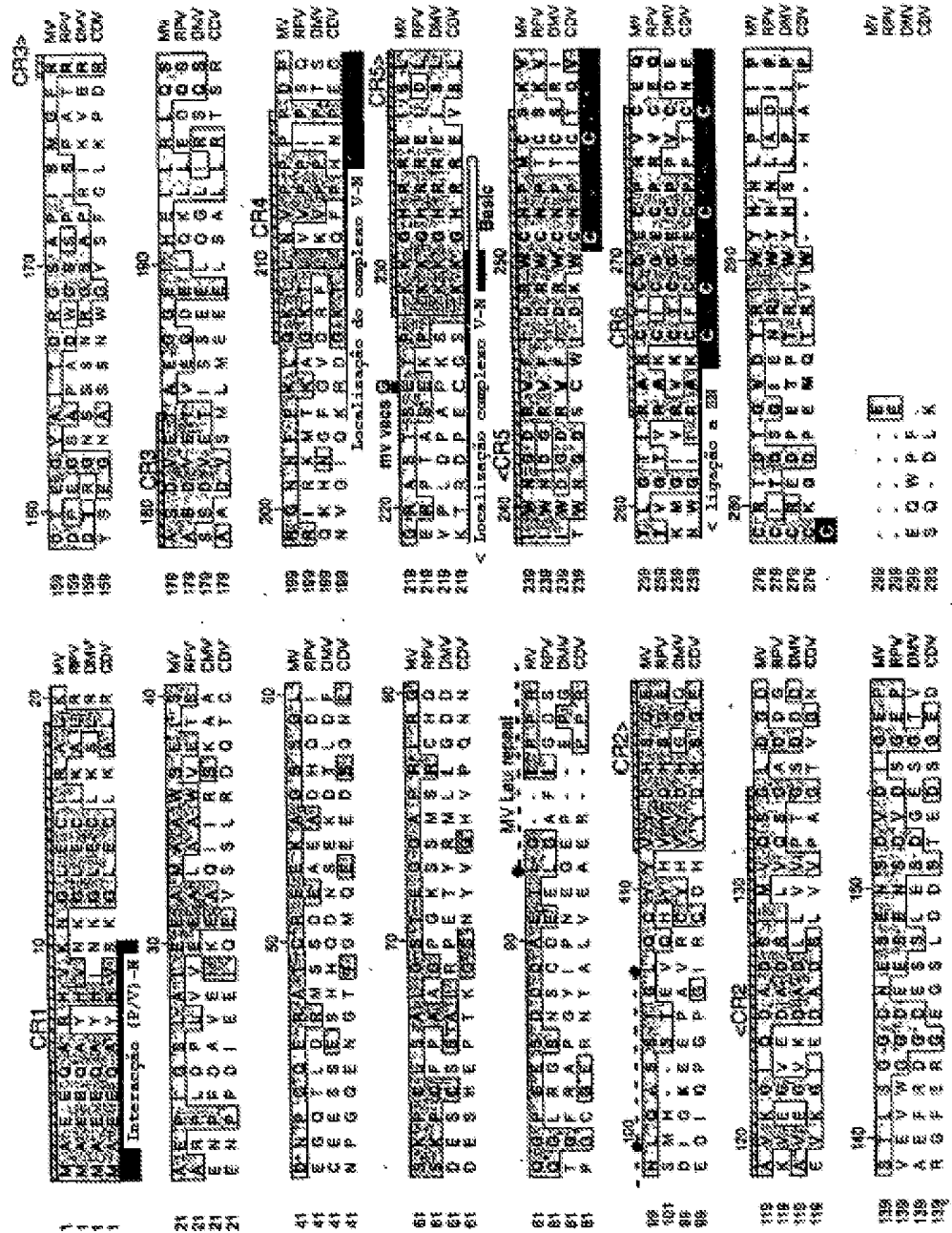


FIGURA 3

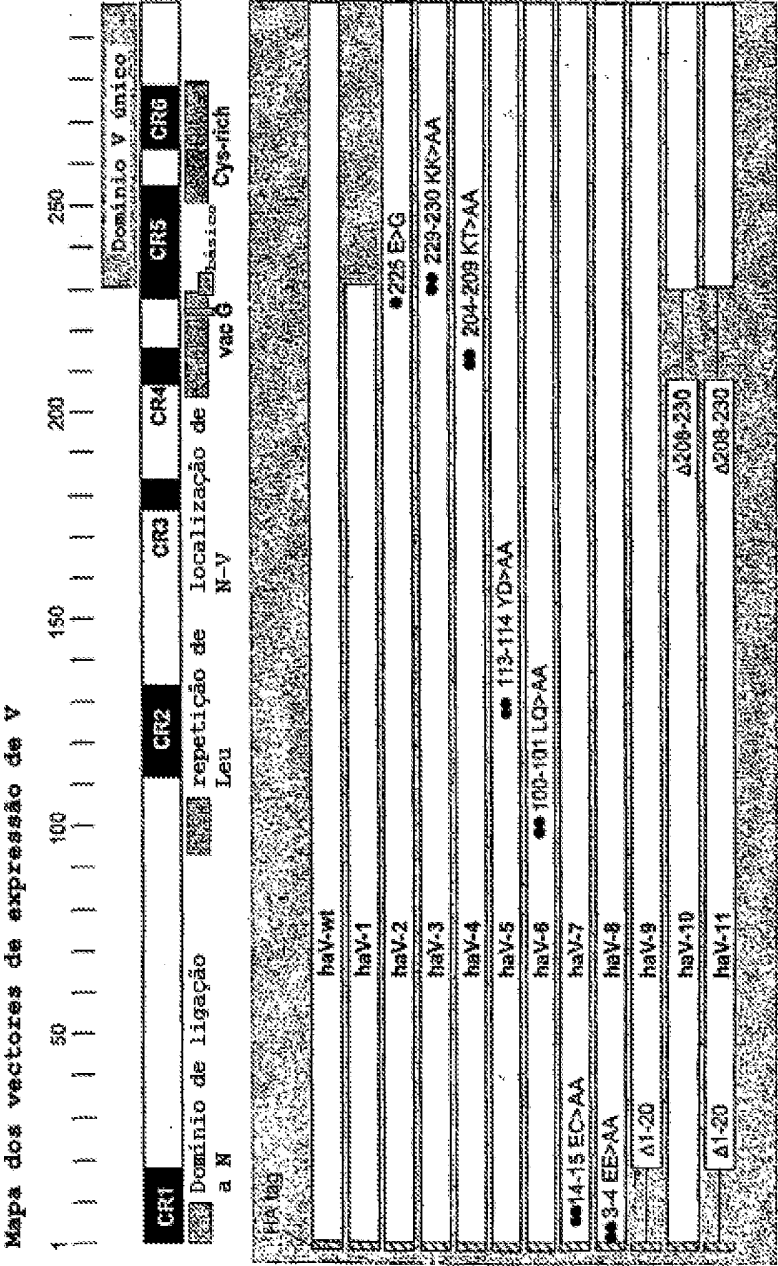


FIGURA 4

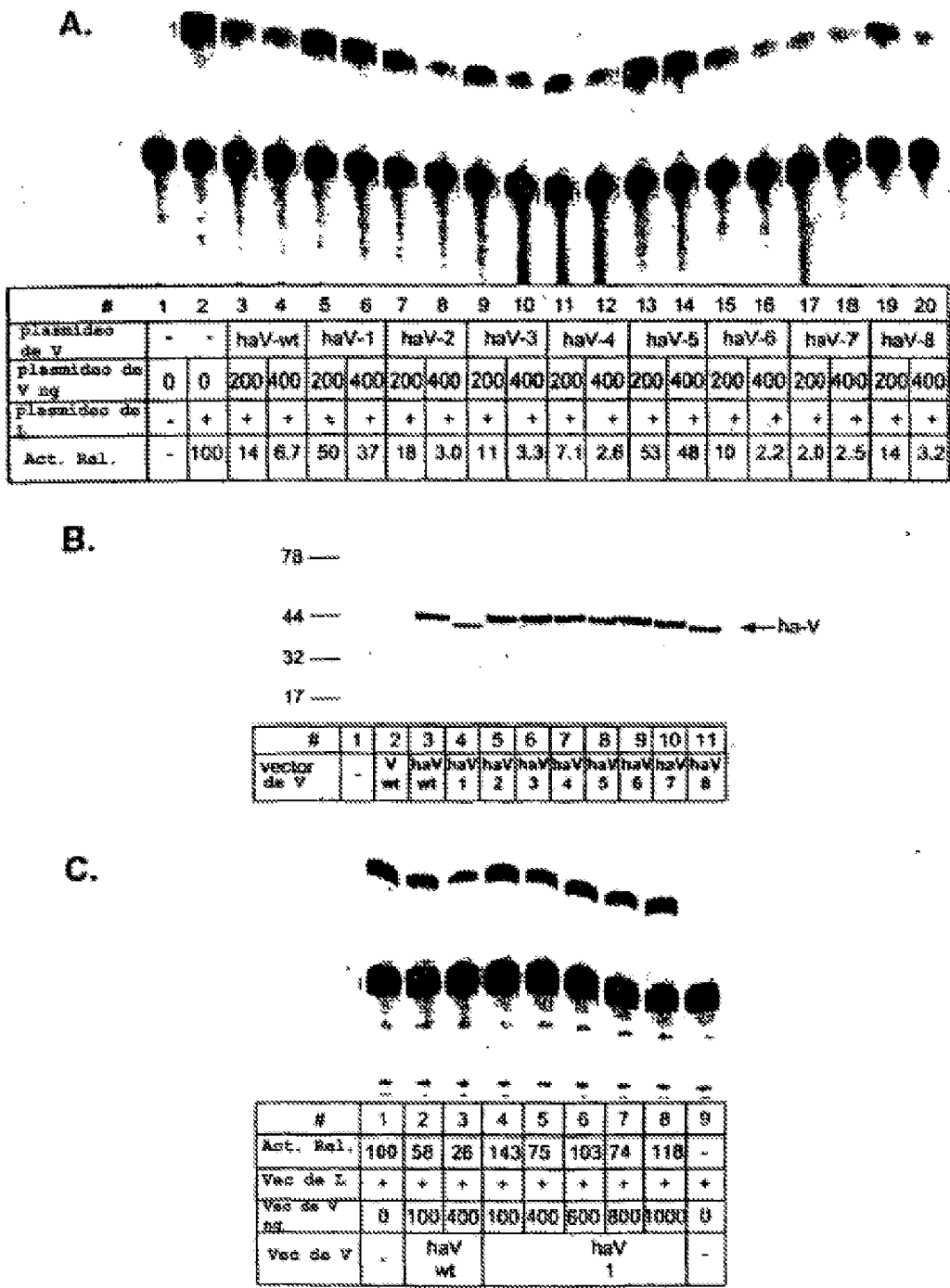


FIGURA 5

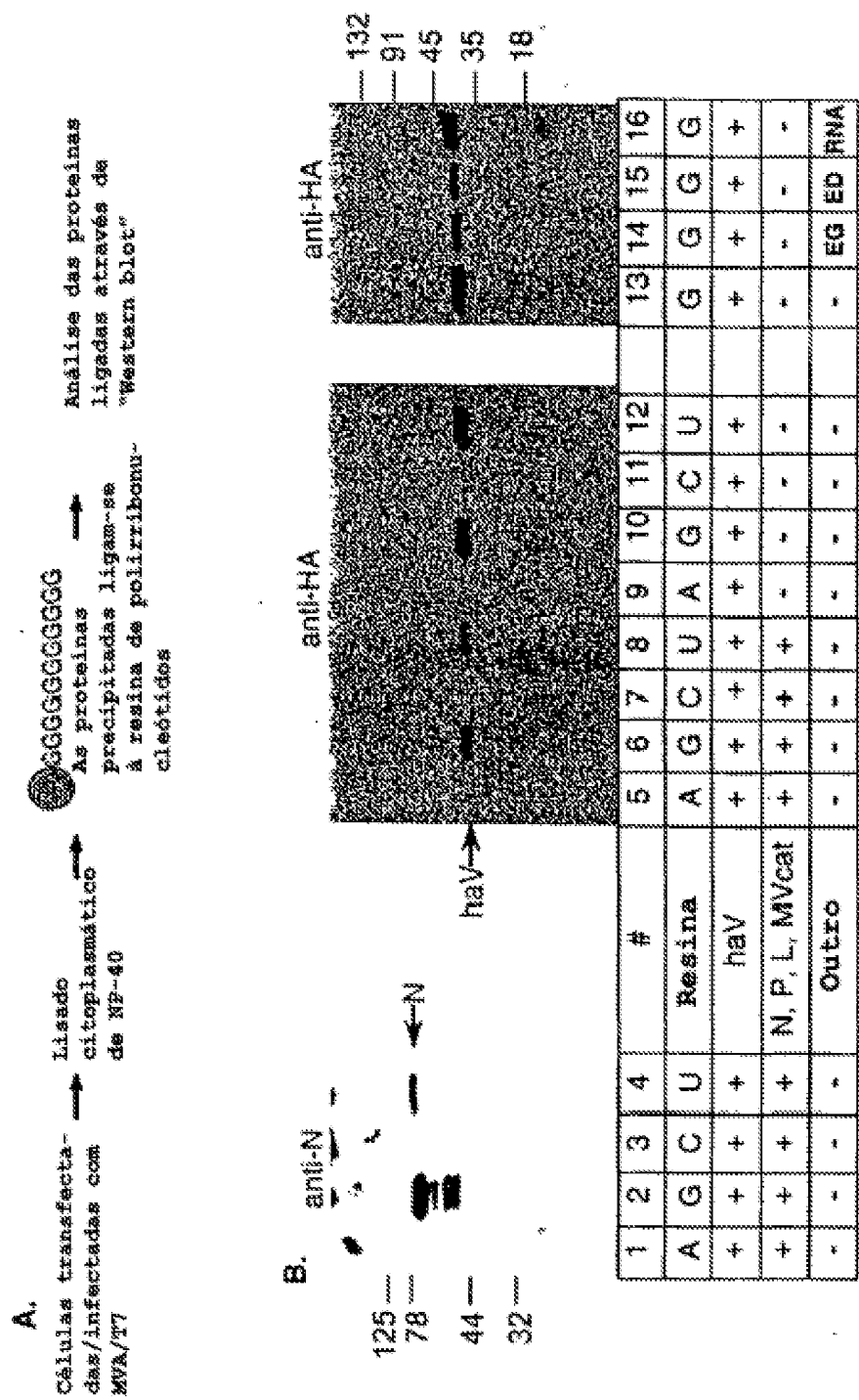


FIGURA 6

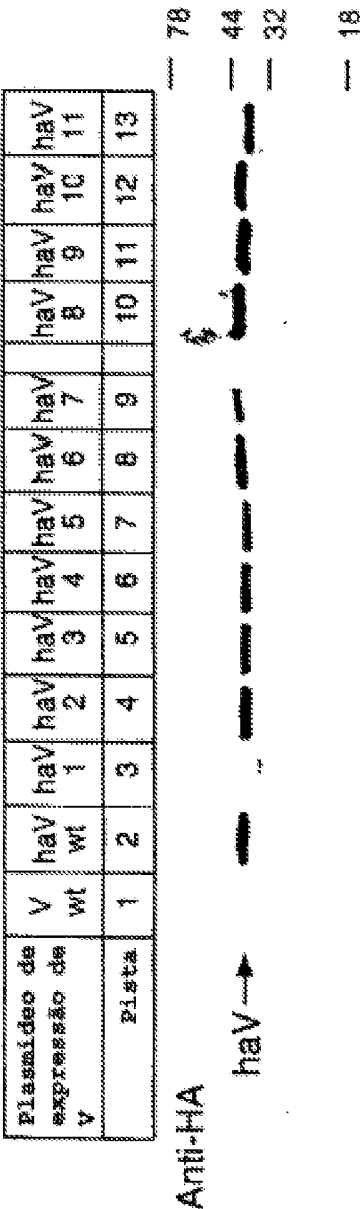


FIGURA 7

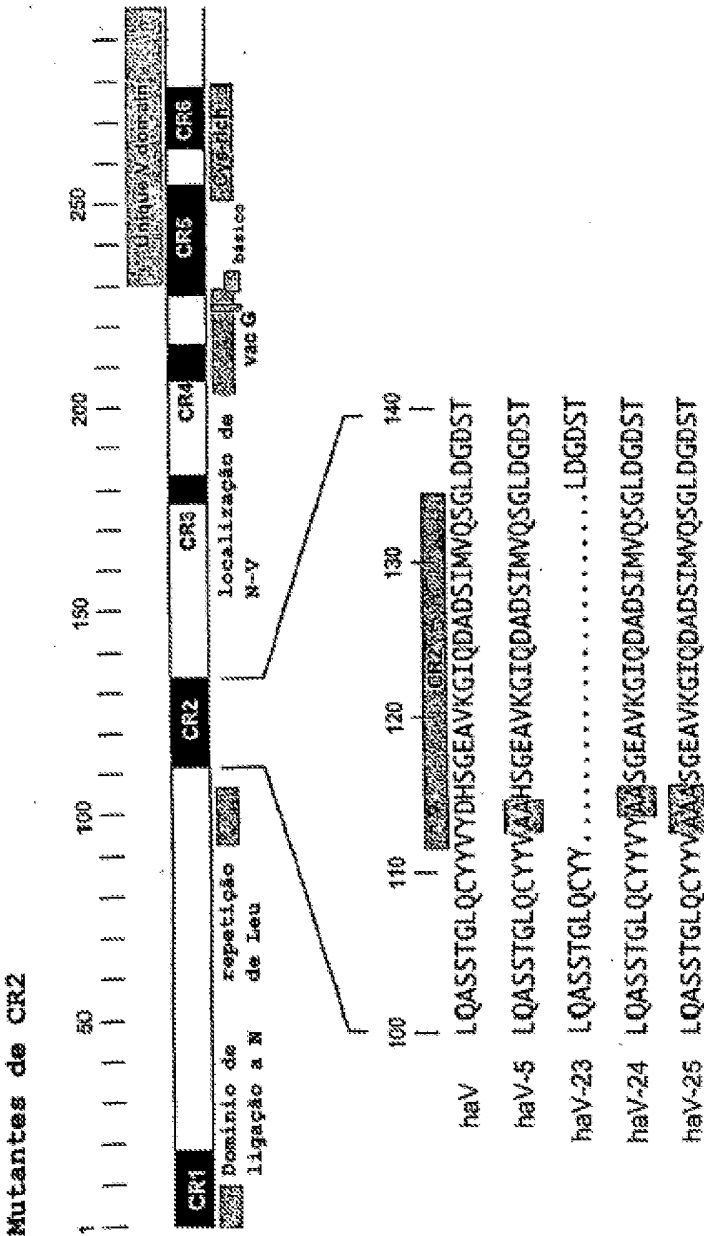


FIGURA 8

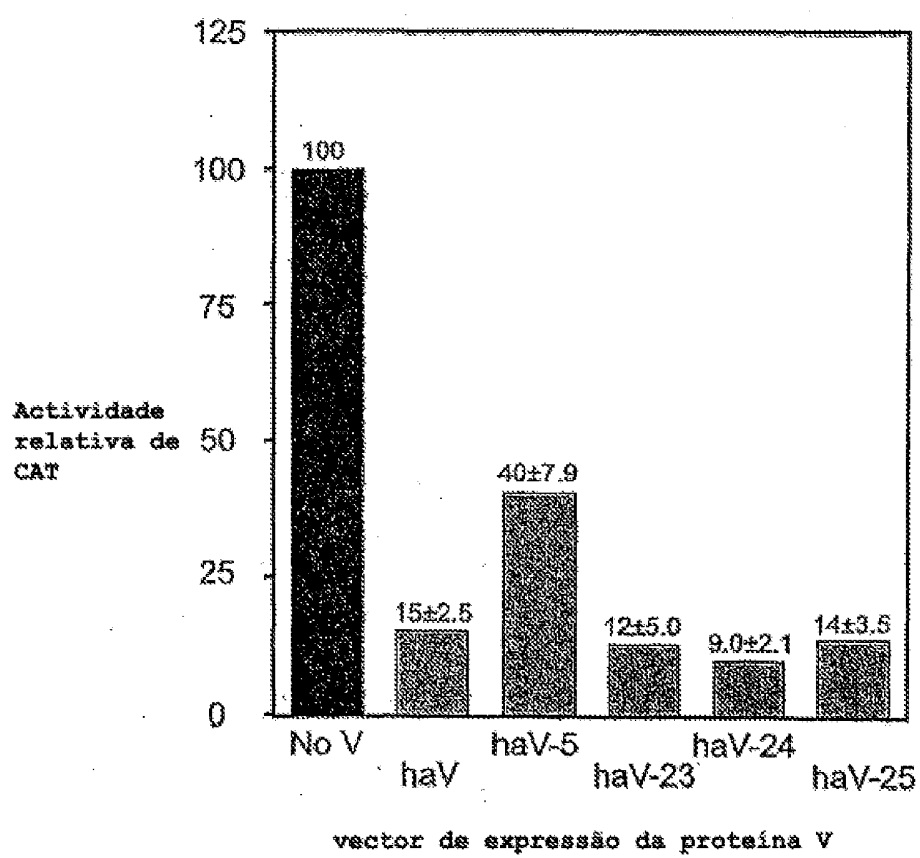


FIGURA 9

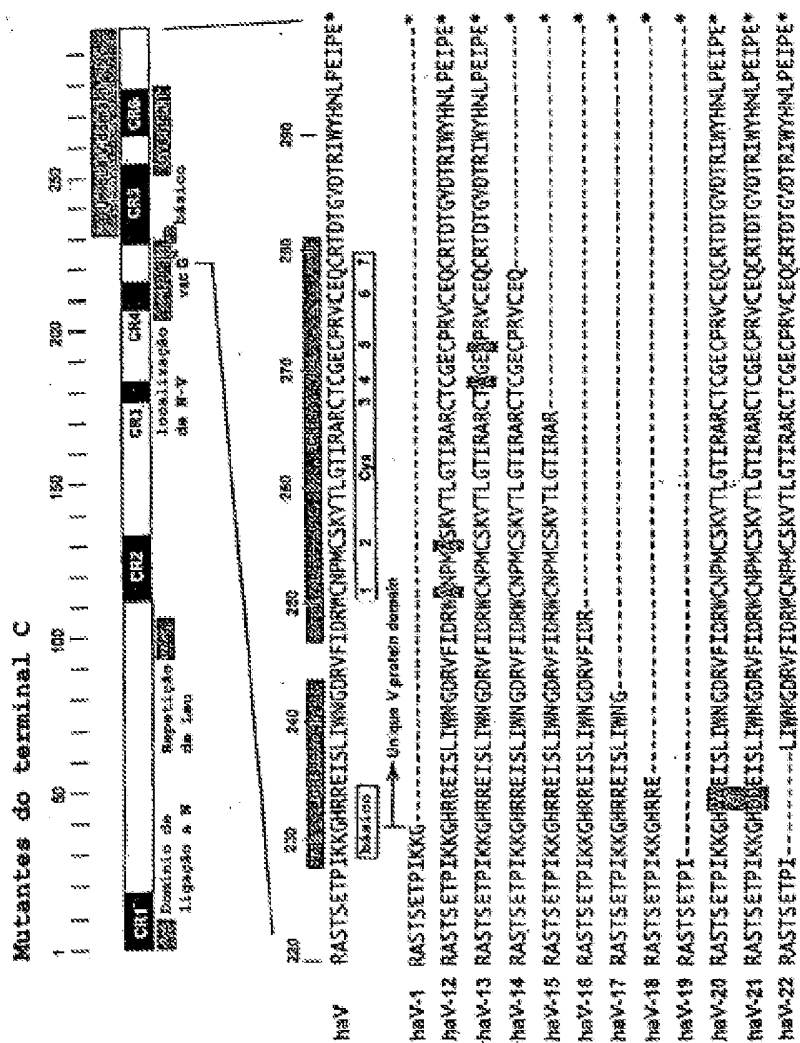


FIGURA 10

