

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2004.02.27	(73) Titular(es): INSTITUT PASTEUR 25-28, RUE DU DOCTEUR ROUX F-75015 PARIS FR
(30) Prioridade(s): 2003.02.28 CA 2421086	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.11.23	UNIVERSITE PARIS 7 - DENIS DIDEROT FR CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) FR
(45) Data e BPI da concessão: 2007.12.19 023/2008	(72) Inventor(es): NADIA NAFFAKH FR PASCALE MASSIN FR SYLVIE VAN DER WERF FR
	(74) Mandatário: MANUEL GOMES MONIZ PEREIRA RUA ARCO DA CONCEIÇÃO, N.º 3, 1º ANDAR 1100-028 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PROMOTOR DA ARN POLIMERASE I DE GALINHA E SUA UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:
PROMOTOR DA ARN POLIMERASE I DE GALINHA E SUA UTILIZAÇÃO

DESCRIÇÃO

PROMOTOR DA ARN POLIMERASE I DE GALINHA E SUA UTILIZAÇÃO

A presente invenção refere-se a um novo polinucleótido possuindo uma actividade promotora da transcrição, vectores contendo este polinucleótido e a sua utilização para a transcrição de sequências de interesse, tais como para a produção de vírus de ARN sem "capping". A presente invenção refere-se igualmente às células hospedeiras, preferivelmente de origem aviária, contendo um polinucleótido ou um vector da invenção.

A prevenção da gripe assenta essencialmente na vacinação, a qual é fortemente recomendada. Por exemplo, em França é comparticipada em 100% pela Caixa Nacional de Seguros de Doença, nos indivíduos pertencentes a grupos de risco: essencialmente as pessoas com 65 ou mais anos de idade e ainda, os indivíduos afectados por infecções crónicas (respiratórias, cardiovasculares, renais, ou metabólicas). A imunidade após a vacinação é conferida pela produção de anticorpos dirigidos contra as glicoproteínas de superfície, especialmente contra a hemaglutinina (HA) mas também contra a neuraminidase (NA).

I- Os métodos actuais: produção em ovos de galinha embrionados, e inactivação

As vacinas anti-gripais são compostas por três estirpes diferentes de vírus, uma do tipo A(H3N2), uma do tipo A(H1N1) e a terceira do tipo B. A escolha das estirpes vacinais é reconsiderada todos os anos em função dos dados da vigilância

das variantes em circulação, e é objecto de uma recomendação emanada pela OMS a cerca de meados de Fevereiro para o hemisfério Norte. As vacinas correntemente utilizadas desde cerca de trinta anos são compostas por vírus multiplicados em ovos de galinha embrionados e inactivados (Manuguerra, 2001, *Repères sur les infections bronchopulmonaires*, pp. 328-342. Editados por P. Léophonte & Y. Mouton: PIL).

Para os vírus de tipo A, são preparados vírus quimeras de elevado poder de multiplicação em ovo embrionado e possuindo os HA e os NA das variantes indicadas pela OMS e fornecidos aos produtores industriais de vacinas. Deve contar-se um a dois ovos embrionados para fabricar uma dose de vacina trivalente. A purificação é realizada de maneira diferente consoante a sociedade de fabrico, mas seguindo o mesmo princípio: o líquido alantóico é recolhido e os vírus são inactivados por tratamento com formaldeído ou com β -propiolactona, antes de serem purificados por ultracentrifugação. Podem igualmente ser fragmentados com auxílio de solventes de lípidos e/ou de detergentes tais como o Tween 80. Os vírus inteiros ou fragmentados são de seguida ajustados à dose habitual de 15 μ g de HA por dose de vacina, para cada uma das estirpes. Uma etapa de purificação na presença de detergente dialisável permite produzir uma vacina sub-unitária, que não contém apenas essencialmente glicoproteínas do envelope (HA e NA) do vírus. Apesar da maior reactogenicidade da vacina à base do vírus inteiro, são sobretudo vacinas fragmentadas e sub-unitárias que são comercializadas. O detalhe necessário relativamente à produção e ao controlo da qualidade da vacina antes da sua comercialização em conformidade com as normas europeias é da ordem dos 6 meses.

Compostas por vírus inactivados, as vacinas anti-gripais são geralmente bem toleradas, e apenas provocam efeitos indesejáveis muito fracos: reacções locais no local da injeção, reacções febris e cefaleias nos dois dias posteriores à injeção. As contra-indicações da vacinação anti-gripal limitam-se às alergias às proteínas do ovo, principalmente à ovalbumina, e às alergias aos resíduos de fabrico ou ao tiomersal. Na ausência de informação sobre o efeito que pode ter sobre o desenvolvimento fetal, a vacinação anti-gripal é desaconselhada às mulheres grávidas durante o primeiro trimestre de gravidez.

A eficácia com a qual as vacinas compostas por vírus inactivados protegem contra uma infecção gripal subsequente é difícil de avaliar, uma vez que pode variar enormemente de uma estação para outra, em particular em função do grau de parentesco antigénico entre os vírus que circulam e aqueles incluídos na vacina, e depende igualmente do estado imunitário do vacinado. Em França, a melhoria da cobertura de vacinação entre 1979 e 1999 foi acompanhada por uma diminuição da mortalidade ligada à gripe (cerca de 20 000 mortos por ano em 1979, 2 500 mortos por ano desde 1985), o que sugere, sem no entanto o demonstrar, um impacto positivo da política de vacinação. Por outro lado, a compilação de numerosos estudos permitiu estimar que a vacinação em pessoas idosas permite diminuir na ordem de 50% o número de pneumonias virais e de hospitalizações, e na ordem de 70% o número de casos de gripe mortal (Gross et al., 1995, *Annals of Internal Medicine*, 123, 518-527).

II- As perspectivas de evolução das vacinas anti-gripais

São actualmente exploradas várias vias de investigação com o objectivo 1) de melhorar a intensidade, a qualidade, e a duração das respostas induzidas pela vacina anti-gripal, e alargar a sua especificidade; e 2) permitir uma resposta rápida em caso de emergência de um vírus de um novo subtipo potencialmente pandémico. Os trabalhos respeitantes à produção de vacinas vivas, por um lado, e a produção de vírus vacinais em cultura de células, por outro lado, são aqui abaixo resumidos. Entre as outras vias de investigação exploradas, pode-se citar igualmente a utilização de adjuvantes, de vacinas sub-unitárias recombinantes ou de vacinas polinucleotídicas.

- Produção de vacinas vivas

Uma vacina anti-gripal viva é susceptível de induzir uma imunidade mais alargada e mais durável, em particular devido à estimulação da imunidade por mediação celular, e de ser melhor aceite pela população em geral, dado que é administrada por via nasal e não por via parentérica. Podem ser actualmente considerados dois tipos de vacinas vivas: as vacinas vivas atenuadas e as vacinas vivas recombinantes.

Vacinas vivas atenuadas

As estirpes atenuadas são obtidas por quimerismo das estirpes selvagens circulantes com uma estirpe dadora atenuada por adaptação ao frio, cujo genotipo é bem caracterizado, sem no entanto que as relações entre as mutações e o fenotipo (de atenuação, de adaptação ao frio, de termossensibilidade) não

sejam perfeitamente estabelecidas (Keitel *et al.*, 1998, *Textbook of Influenza*, pp. 373-390. Editado por K. G. Nicholson, R. G. Webster & A. J. Hay. Oxford, Inglaterra: Blackwell Science, Ltd.).

O processo de produção das vacinas atenuadas em ovos de galinha embrionado é análogo àquele descrito acima, sendo naturalmente suprimida a etapa de inactivação do vírus. Os resultados de ensaios clínicos conduzidos recentemente por laboratórios americanos indicam que vacinas trivalentes compostas por estirpes atenuadas administradas por via intranasal são inofensivas em adultos, em pessoas idosas e em crianças, apresentando como únicos efeitos secundários a irritação da garganta e um escorrimento nasal durante os dois dias posteriores à vacinação. Poderiam ter uma eficácia protectora superior à das vacinas inactivas, em particular pelo facto da indução de uma resposta mucosal em anticorpos do tipo IgA, mas o seu potencial de transmissão e de reversão ainda está pró documentar. A vacinação com auxílio de vírus vivos atenuados é praticada em larga escala na Rússia desde várias dezenas de anos, mas é difícil retirar resultados globais convincentes devido a uma muito grande dispersão das condições utilizadas.

Vacinas vivas recombinadas

A recente optimização de sistemas de genética reversa para os vírus gripais (Neumann *et al.*, 2001, *Virology* 287, 243-50) permite antever a produção de vírus recombinantes no genoma daqueles com introdução de modificações genéticas introduzidas especificamente com o objectivo de lhes conferir propriedades de atenuação e de imunogenicidade adequadas.

Esta abordagem apresentaria uma segurança acrescida (devido à ausência de agentes contaminantes do tipo daqueles que podem estar presentes nas recolhas à origem das estirpes virais, e à possibilidade de minimizar e controlar mais facilmente os riscos de reversão do vírus vacinal) e permitiria responder de modo mais específico a situações epidémicas variadas. Os sistemas de genética inversa que existem actualmente baseiam-se na utilização do sistema de transcrição da ARN polimerase I humana. Devido a uma estreita especificidade de espécie da ARN polimerase I, a sua utilização está restrita a células de origem humana ou de primatas. Poder-se-iam aplicar à produção de vírus vacinais recombinantes em cultura de células, mas não em ovo embrionado de galinha.

- Produção de vírus vacinais em cultura de células

As principais vantagens dos ovos embrionados de galinha como suporte para a produção de vírus gripais vacinais são: i) um rendimento de vírus muito elevado; e ii) minimizar o risco de contaminação por agentes patogénicos para o Homem, o que é particularmente importante ter em conta na perspectiva da produção de vacinas não inactivadas. A possibilidade de produzir vírus vacinais em células cultivadas em meio desprovido de soro é também explorada. As indústrias Baxter e Solvay recentemente homologaram bancos de células derivadas, respectivamente, das linhagens Vero e MDCK, para a produção de vírus vacinais. Uma vacina produzida em MDCK e inactivada obteve a autorização de comercialização em 2001, mas deixou de ser comercializada.

O futuro verá provavelmente a co-existência no mercado de vários tipos de vacinas anti-gripais, inactivados ou vivos,

produzidos em ovo embrionado de galinha ou em células em cultura, entre as quais algumas se revelarão possivelmente particularmente indicadas para a vacinação de uma certa categoria de indivíduos, e menos indicadas para uma outra. Em caso de pandemia, deverão ser mobilizados todos os métodos de produção disponíveis, em ovos embrionados e em células em cultura.

A presente invenção responde a estas necessidades e a outras necessidades como ficará evidente a uma pessoa competente na técnica através da leitura da presente descrição da invenção.

A presente invenção refere-se a um polinucleótido, ADN recombinantes contendo este polinucleótido e a sua utilização, preferivelmente para a produção de um vírus de ARN sem "capping" para efeitos de vacinação.

Mais especificamente, a presente invenção tem como objectivo um polinucleótido isolado ou purificado que consiste na sequência SEQ ID NO: 1, apresentada na figura 1, ou um fragmento desta, e que possui uma actividade promotora da transcrição.

A presente invenção refere-se igualmente a um polinucleótido isolado ou purificado que consiste na sequência SEQ ID NO: 2, apresentada na figura 2, ou um fragmento desta, e que possui uma actividade promotora da transcrição.

A invenção refere-se entre outros a um ADN recombinante compreendendo um dos polinucleótidos da invenção ou um seu fragmento; um vector compreendendo um dos polinucleótidos da invenção ou um ADN recombinante ou um fragmento destes; uma

célula hospedeira e um ovo embrionado de origem aviária contendo o referido vector.

A invenção incide igualmente sobre a utilização de pelo menos um dos seguintes elementos para a produção de uma sequência de interesse tal como por exemplo um vírus de ARN sem "capping" recombinante:

- um polinucleótido segundo a invenção;
- um ADN recombinante segundo a invenção;
- um vector segundo a invenção;
- uma célula hospedeira segundo a invenção; e
- um ovo embrionado de origem aviária segundo a invenção.

Numa realização particular, a invenção refere-se a um método de produção de vírus sem "capping" recombinantes por genética reversa, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a) introdução numa célula ou num ovo embrionado de origem aviária de um ou vários vectores, compreendendo o ou os referidos vectores um ADN recombinante segundo a invenção e os ADN expressando as proteínas necessárias à transcrição/replicação do ARN viral;
- b) aplicação à célula ou ao ovo obtido em a) de condições que permitam a expressão de vírus recombinantes; e
- c) recuperação dos vírus recombinantes obtidos em b).

Numa utilização preferida, a presente invenção propõe um método de produção de vírus gripais recombinantes por genética reversa, caracterizada por compreender as seguintes etapas:

a) introdução numa célula aviária ou num ovo embrionado de galinha de pelo menos um vector compreendendo um ADN recombinante segundo um modo preferido da invenção e vectores expressando as proteínas Pa, PB1, PB2 e NP de um vírus gripal;

b) aplicação à célula ou ao ovo obtido em a) de condições que permitam a expressão de vírus gripais recombinantes; e

c) recuperação dos vírus recombinantes obtidos em b).

A clonagem do promotor da ARN polimerase I de galinha permite com vantagem otimizar um sistema de genética reversa adaptada à produção de vírus vacinais recombinantes em ovo embrionado de galinha, que poderia revelar-se particularmente adaptado à produção de vacinas vivas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra uma sequência (SEQ ID NO: 1) correspondente ao fragmento AgeI-SacI do ADN genómico de galinha contendo o promotor da ARN polimerase I de galinha.

A Figura 2 mostra um segundo fragmento de ADN genómico de galinha (BsaI-SacI) a sequência SEQ ID NO: 2 contendo o promotor da ARN polimerase I de galinha.

A Figura 3 mostra o protocolo utilizado para analisar a eficácia da transcrição da sequência CAT a partir das sequências derivadas do cosmídeo C13-C18.

A Figura 4 mostra os resultados da análise iterativa de fragmentos de restrição do fragmento PacI/NotI derivado do cosmídeo C13-C18.

A Figura 5 mostra o resultado de reacções de sequenciação e de extensão do iniciador levadas em paralelo, que evidenciam, no seio do fragmento AgeI/SacI, descrito na figura 1, o principal local de iniciação da transcrição pela ARN polimerase I da galinha.

A Figura 6 é um esquema que mostra os níveis de CAT medidos nos extractos citoplasmáticos das células transfectadas com plasmídeos que codificam para pseudo ARN gripais sob controlo dos promotores Poli humano ou da galinha (em $\text{ng}/10^6$ células transfectadas e a 24 h pós-transfecção).

A originalidade da presente invenção assenta numa sequência polinucleotídica que possui preferentemente uma actividade promotora da transcrição, principalmente as células aviárias. Os inventores identificaram esta sequência promotora como sendo o promotor da ARN polimerase I de galinha.

A invenção refere-se ainda à implicação deste polinucleótido na produção de sequências de interesse, tais como por exemplo vírus gripais recombinantes segundo o sistema de genética reversa.

1. Polinucleótido e ADN recombinante

Segundo um primeiro aspecto, a invenção visa um polinucleótido isolado ou purificado que consiste na sequência SEQ ID NO: 1 apresentada na figura 1 ou na

sequência SEQ ID NO: 2 apresentada na figura 2, ou um fragmento destas. Este polinucleótido, ou um dos seus fragmentos, possui uma actividade promotora da transcrição.

Por fragmentos, preferem-se os fragmentos cuja sequência compreende pelo menos 10, 12, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 75 ou 100 nucleótidos consecutivos da sequência SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2 e possuindo uma actividade promotora de transcrição.

Apesar do polinucleótido ou o promotor da invenção se caracterizar preferentemente pelo facto de possuir uma actividade promotora de transcrição em células aviárias, este promotor possui particularmente a capacidade de promover a transcrição nas células de aves, e ainda mais particularmente nas células de galinha.

Por sequência nucleotídica, ácido nucleico, sequência nucleica ou ácido nucleico, polinucleótido, sequência polinucleotídica, termos que serão empregues indiferentemente no presente pedido, entende-se designar uma encadeamento preciso de nucleótidos, modificados ou não, permitindo definir um fragmento ou uma região de um polinucleótido, compreendendo ou não nucleótidos não naturais, e podendo corresponder ainda a um cadeia dupla de ADN ou uma cadeia simples de ADN. Inclui igualmente moléculas de ADN, moléculas de ARN, ADNc, sequências artificiais e todos os fragmentos destes. Naturalmente, as definições "derivado", "variante" e "mutado" aplicam-se igualmente aos polinucleótidos segundo a presente invenção. Qualquer polinucleótido que tenha sido modificado quimicamente, enzimaticamente ou metabolicamente mas que conservou as propriedades do polinucleótido de

origem, ou seja, a actividade promotora de transcrição nas células aviárias, está incluído no âmbito da presente invenção.

Deve ser entendido que a presente invenção não se refere às sequências nucleotídicas no seu ambiente cromossómico natural, ou seja, o estado natural. Trata-se de sequências que foram isoladas e/ou purificadas, ou seja que foram recolhidas directamente ou indirectamente, por exemplo por clonagem, amplificação e/ou síntese química, tendo o seu ambiente pelo menos parcialmente modificado. Deve ser entendido que um polinucleótido que é introduzido num organismo por transformações, manipulação genética ou por qualquer outro método de recombinação é "isolado" mesmo se está presente no referido organismo.

As sequências promotoras segundo a invenção possuem preferentemente uma sequência de ADN que apresenta uma percentagem de identidade superior a 70 % com uma ou outra das sequências SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2 descritas nas figuras 1 e 2. Mais particularmente, as sequências promotoras da invenção apresentam uma percentagem de identidade de mais de 80 %, e ainda mais preferentemente de 90 % com uma ou outra das sequências SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2 descritas nas figuras 1 e 2, ou um fragmento destas. Por «percentagem de identidade», entende-se uma percentagem que indica o grau de identidade entre duas sequências de ácidos nucleicos ao longo das sequências na sua totalidade. Se as sequências consideradas forem de tamanhos diferentes, a percentagem de identidade é expressa em função do comprimento total da sequência mais curta. Para calcular a percentagem de identidade, as duas sequências são sobrepostas de modo a

maximizar o número de bases idênticas permitindo intervalos, dividindo-se depois o número de bases idênticas pelo número total de bases da sequência mais curta.

Um outro aspecto da invenção refere-se a um ADN recombinante compreendendo um polinucleótido tal como definido acima.

Este ADN recombinante pode conter, por exemplo, a sequência promotora SEQ ID NO: 1 apresentada na figura 1 ou SEQ ID NO: 2 apresentada na figura 2, ou um derivado destas, na qual é inserido um local de clonagem, facilitando assim a utilização desta sequência como promotor «portátil». Segundo um modo preferido, o ADN recombinante da presente invenção contém entre outros uma sequência a transcrever. Por «sequência a transcrever» ou «sequência de interesse», entende-se uma sequência que pode servir de matriz para sintetizar moléculas de ARN sem "capping", ou seja cujas extremidades do produto de transcrição não contenham nucleótidos suplementares. Mais preferentemente, a sequência a transcrever é um ADNc de vírus de ARN com polaridade negativa, tal como um ortomixovírus ou um paramixovirus. A título de exemplo, o ortomixovírus é um Influenza, preferivelmente do tipo A, enquanto que o paramixovirus é preferentemente escolhido entre o género Rubulavirus (preferivelmente o vírus da papeira ou o vírus da doença de Newcastle), o género dos Morbilivirus (preferencialmente o vírus da rubéola), o género dos Pneumovirus (preferentemente o vírus respiratório sincicial) ou o género dos Metapneumovirus. Segundo um modo preferido da invenção, o ADN recombinante é caracterizado por expressar um ARNv de um ortomixovírus, tal como um vírus gripal e preferentemente um ARNv escolhido entre os segmentos do ARNv 1 a 8 do vírus Influenza. A «sequência a transcrever» ou a

«sequência de interesse» pode igualmente servir para a produção de ARN anti-senso, ou seja, cuja estrutura assegura, por hibridação com a sequência alvo (por exemplo um vírus de ARN com polaridade negativa) uma inibição da replicação ou transcrição de um ARN viral ou uma inibição da expressão do produto proteico correspondente.

A presente invenção refere-se igualmente a vectores contendo ADN recombinantes como descritos anteriormente. Estes vectores permitem a introdução e eventualmente a expressão da sequência a transcrever numa célula hospedeira. Como exemplo de vectores, pode citar-se os vectores de expressão plasmídicos, os vectores virais, os vectores integrativos e os vectores autossómicos. Mais particularmente, um vector segundo a presente invenção é o plasmídeo pGEM-ChPolI-C15. Este plasmídeo está contido na estirpe pGEM-ChPolI-C15-E.coli 1305 depositada segundo o tratado de Budapeste na Colecção Nacional de Culturas de Microrganismos (CNCM) Institut Pasteur 28, rua do Dr. Roux, 75724 PARIS (França) a 24 de Fevereiro de 2003 com o número I-2976. O plasmídeo pGEM-ChPolI-C15 é derivado do plasmídeo pGEM52F+ (Promega). Um fragmento de restrição EaeI de 524 pb derivado da sequência que codifica para a cloramfenicol acetil transferase bacteriana (CAT) foi clonado no local NotI de pGEM52F+. Um fragmento de restrição AgeI-SacI derivado do cosmídeo C13-C18 foi clonado ao nível do local EcoRI de pGEM52F+, a montante da inserção CAT. Este fragmento de 1260 pb contém o promotor mínimo da ARN polimerase I de galinha da presente invenção.

A invenção refere-se também à produção de aves transgénicas que expressam sob o controlo do promotor PolI dos ARN que

conferem uma resistência contra infecções por microrganismos patogénicos, em particular contra os vírus gripais aviários.

2. Célula e ovo embrionado de origem aviária

Segundo um outro aspecto, a invenção refere-se a células transformadas com um vector tal como descrito anteriormente. Preferivelmente, a célula hospedeira assim transformada é de origem aviária. Segundo uma variante preferida da invenção, a célula hospedeira é uma célula de ave, e ainda mais preferentemente uma célula de galinha. Entende-se que no sentido da presente invenção as células hospedeiras transformadas o são preferentemente de modo estável. No entanto, é concebível fornecer células transformadas de modo transitório.

Segundo um aspecto conexo, a presente invenção refere-se igualmente a ovos embrionados «transfectados» de origem aviária (preferentemente de galinha). Mais particularmente, os ovos embrionados da presente invenção compreendem um vector tal como descrito anteriormente.

Os processos utilizados para introduzir um vector tal como descrito anteriormente numa célula hospedeira ou num ovo embrionado segundo a presente invenção assentam nos conhecimentos gerais de alguém perito na técnica em matéria de transfecção celular e de incubação de ovos, e não serão então descritos em mais detalhe.

3. Métodos e procedimento de utilização

Segundo um outro aspecto, a invenção refere-se à produção de sequências de interesse tais como por exemplo de vírus vacinais recombinantes, e mais particularmente a produção de um vírus de ARN sem "capping" recombinante. Num aspecto suplementar, a invenção visa a utilização de pelo menos um dos seguintes elementos para a produção de uma sequência de interesse, por exemplo de um vírus de ARN sem "capping" recombinante:

- um polinucleótido segundo a invenção;
- um ADN recombinante segundo a invenção;
- um vector segundo a invenção;
- uma célula hospedeira segundo a invenção; e
- um ovo embrionado de origem aviária segundo a invenção.

Num aspecto conexo, a presente invenção propõe um método de produção de vírus sem "capping" recombinantes. Tal produção baseia-se no sistema de produção de vírus recombinantes por genética reversa tal como descrito anteriormente. Mais particularmente, o método segundo a presente invenção compreende as seguintes etapas:

- a) introdução numa célula ou num ovo embrionado de origem aviária de um ou vários vectores, compreendendo o ou os referidos vectores um ADN recombinante segundo a invenção e os ADN expressando as proteínas necessárias à transcrição/replicação do ARN viral (como por exemplo as proteínas PA, PB1, PB2 e NP de um vírus gripal);
- b) aplicação à célula ou ao ovo obtido em a) de condições que permitam a expressão de vírus recombinantes; e

c) recuperação dos vírus recombinantes obtidos em b).

Compreende-se que na etapa a), todos os ADN (ADN recombinante segundo a invenção e os ADN que expressam as proteínas necessárias à transcrição/replacação do ARN viral) podem ser transportados por um único vector ou por dois vectores ou mais.

Segundo uma utilização preferida, a presente invenção propõe igualmente um método de produção de vírus gripais recombinantes, caracterizada por compreender as seguintes etapas:

- a) introdução numa célula aviária ou num ovo embrionado de galinha de pelo menos um vector compreendendo um ADN recombinante expressando um ARNv de um vírus gripal e vectores expressando as proteínas PA, PB1, PB2 e NP de um vírus gripal tal como Influenza, preferivelmente do tipo A;
- b) aplicação à célula ou ao ovo obtido em a) de condições que permitam a expressão de vírus gripais recombinantes; e
- c) recuperação dos vírus recombinantes obtidos em b).

Compreende-se que a etapa c) dos métodos da invenção, ou seja, a recuperação dos vírus recombinantes, pode ter lugar directamente em células, após lise celular, ou então a partir do sobrenadante. No caso em que são utilizados ovos embrionados, um perito na técnica saberá quais os métodos a utilizar para recuperar os vírus recombinantes assim produzidos.

Os exemplos que se seguem servem para ilustrar a extensão da utilização da presente invenção e não a limitar o seu

alcance. Apesar de se poderem utilizar outros métodos ou produtos equivalentes àqueles que se encontram abaixo para testar ou realizar a presente invenção, são descritos o material e os métodos preferidos.

Os exemplos seguintes permitirão evidenciar outras características e vantagens da presente invenção.

EXEMPLOS

Os exemplos que se seguem servem para ilustrar a extensão da utilização da presente invenção e não a limitar o seu alcance. Apesar de se poderem utilizar outros métodos ou produtos equivalentes àqueles que se encontram abaixo para testar ou realizar a presente invenção, são descritos o material e os métodos preferidos.

Os sistemas de genética reversa utilizados de modo a obter os vírus gripais recombinantes a partir de ADNc clonados assentam todos na transfecção de plasmídeos que codificam para os ARN virais (ARNv) sob o controlo do promotor da ARN polimerase I humana (Neumann *et al.*, PNAS 96: 9345-50, 1999 ; Fodor *et al.*, J. Virol. 73:9679-82, 1999; Hoffman *et al.*, PNAS 97:6108-13, 2000). A utilização deste promotor justifica-se pelo facto das extremidades do produto de transcrição não deverem conter nucleótidos suplementares (se tal não for o caso, os sinais de transcrição/replicação localizados ao nível das extremidades 5' e 3' não codificantes dos ARNv deixam de ser funcionais).

A utilização do promotor da ARN polimerase I humana assegura a iniciação da transcrição num local muito preciso, e assim a

exactidão da extremidade 5' dos ARNv sintetizados nas células transfectadas. Mas este tipo de sistema apenas pode ser aplicado em células de origem humana ou símia, devido à muito estreita especificidade de espécie dos promotores das ARN polimerase I (Heix e Grummt, Curr. Op. Gent. Dev. 5:652-56, 1995).

Ou, dispor de um sistema de genética reversa aplicável às células aviárias que poderiam abrir a via à produção de vacinas gripais recombinantes em ovos de galinha embrionados, único suporte actualmente autorizado para a produção de uma vacina gripal nos Estados Unidos. A vacinação constitui actualmente o único método de prevenção contra a gripe e é fortemente recomendada para indivíduos de certas categorias de grupos de risco. O fabrico da vacina assenta na multiplicação de estirpes vacinais em ovos embrionados, e necessita, a cada reactualização da composição vacinal, de seleccionar vírus quimeras possuindo os segmentos HA e NA representativos das estirpes circulantes, derivando os outros segmentos de uma estirpe dadora adaptada ao crescimento em ovo. Poderia ser vantajoso substituir o processo longo e aleatório pela produção de vírus quimeras por genética reversa em ovo embrionado.

Assim, na perspectiva de otimizar um sistema de produção de vírus gripais recombinantes por genética reversa em células aviárias, os inventores empreenderam a clonagem do promotor da ARN polimerase I de galinha. Actualmente não era realizável uma clonagem por PCR com base nas homologias entre as sequências nucleotídicas dos promotores PolI clonados, dados que os sistemas de transcrição PolI são extremamente divergentes de uma espécie para outra. Procederam a um

processo de triagem da totalidade ou de parte do genoma de galinha.

1) Obtenção do cosmídeo C13-18

A cartografia do genoma de galinha indicava que os genes que codificam para os ARN ribossomais (local NOR) se situavam no cromossoma 16, na proximidade do local de genes do complexo de histocompatibilidade (Schmid *et al.*, Cytogenet. Cell Genet., 90:169-218, 2000). O laboratório do Pr. H. Auffray, cujo trabalho no Instituto Gustave Roussy de Villejuif tem uma parte que incide sobre o complexo maior de histocompatibilidade, publicou em 1988 dados relativos a um cosmídeo recombinante (c13-18) que contém 30 kb de ADN genómico de galinha, entre os quais os genes do complexo maior de histocompatibilidade, mas também várias unidades de transcrição do local NOR, e por consequência pelo menos um exemplar do promotor PolI (Guillemot *et al.*, EMBO J., 7:2775-85, 1988). Este cosmídeo foi gentilmente fornecido por R. Zoorob.

2) Análise do cosmídeo C13-18 por "Southern blot"

O cosmídeo C13-18 foi analisado pró "Southern blot" após digestão pelos enzimas de restrição NotI, PacI, e SfiI, isoladamente ou em combinação, e utilizando como sonda oligonucleótidos escolhidos em bases de dados de sequenciação parcial dos ARN ribossomais de galinha disponíveis nos bancos de dados:

oligonucleótido 28S/+/2 : 5'-GAGTCAGCCCTCGACACAAGCTTTTG-3'
(SEQ ID NO: 3);

oligonucleótido 18S/-/1.5 : 5'-CTACTGGCAGGATCAACCAGGT-3' (SEQ ID NO: 4); e
oligonucleótido 18S/-/4 : 5'-TAGAGGAGAACGCGACCTCGAGAC-3' (SEQ ID NO: 5).

Esta análise permitiu reconstituir o mapa de restrição grosseiro do cosmídeo C13-18, e posicionar os ARN ribossomais 18S e 28S em relação aos diversos locais de restrição localizados no cosmídeo. Resultou na identificação de um fragmento PacI-NotI de cerca de 16 kb correspondente à maior parte de uma região intergénica, e por consequência muito susceptível de conter uma cópia da sequência do promotor PolI.

3) Clonagem do fragmento de restrição PacI-NotI num vector "repórter", e evidenciação da presença de um promotor de transcrição no seio do fragmento PacI-NotI

A fim de se testar a presença da sequência do promotor PolI no seio do fragmento de restrição PacI-NotI, os inventores procuraram clonar este último a montante de uma sequência repórter.

Com este objectivo, foi modificado o cosmídeo pTCF (Grosveld *et al.*, 1982, *Nucleic Acids Res.*, 10, 6715-32), que possui um único local de clonagem SalI, por inserção de uma sequência sintética que contém múltiplos locais de clonagem (StuI-PacI-NotI-PmeI) ao nível do local SalI.

O fragmento PacI-NotI de 16 kb derivado de C13-18 foi clonado no cosmídeo pTCF modificado, ao nível dos locais PacI e NotI introduzidos de novo. Foram seleccionados dois clones de

cosmídeos recombinantes pTCF-(PacI-NotI) (n° 2.5 e 2.7). Depois, foi clonado um fragmento de restrição EaeI de 500pb, derivado do gene bacteriano da cloramfenicol acetil transferase (CAT) e foi clonado ao nível do local NotI dos cosmídeos pTCF-(PacI-NotI), numa e noutra orientação. Foram seleccionados quatro cosmídeos recombinantes: n° 2.5.3 e n° 2.7.13 (CAT em orientação +), n° 2.5.4 e n° 2.7.16 (CAT em orientação -).

De modo a se testar a presença da sequência do promotor Poli no seio do fragmento de restrição PacI-NotI, transfectaram-se células de linha QT6 (fibrossarcoma de codorniz) com os cosmídeos pTCF-(PacI-NotI)-CAT(+) e pTCF-(PacI-NotI)-CAT(-). Os ARN foram extraídos das células 24 horas após a transfecção com auxílio do reagente "TriZol" (Gibco-BRL) e tratados com DNase (RNase-free DNase, Ambion) de modo a eliminar as moléculas de cosmídeo contaminante das preparações de ARN. Os ARN foram colocados sobre uma membrana de nylon (Hybond N+, Amersham) à razão de 5 µg por ponto, e hibridados com uma ribossonda marcada com ³²P, correspondente à sequência CAT(+). Foram obtidos sinais positivos com os ARN preparados a partir de células transfectadas com os cosmídeos pTCF-(PacI-NotI)-CAT(-) n° 2.5.4 e 2.7.16, sugerindo a presença de um promotor de transcrição no fragmento de restrição PacI-NotI. Nestas primeiras experiências, a razão sinal/ruído de fundo era no entanto bastante fraca. Foi melhorada nas experiências seguintes após optimização das condições de tratamento dos ARN com DNase (durante 2 vezes 1 hora a 37°C na presença de 8 unidades de enzima) e das condições de hibridação e de lavagem das membranas (hibridação durante a noite a 65°C num tampão formamida 50 %, SSC 5x, Denhart 5x, SDS 0,5 %; 2 lavagens de 10 min à

temperatura ambiente num tampão SSC 2x, SDS 0,1 %, seguidas de 2 lavagens de 10 min a 65°C num tampão SSC 0,2x, SDS 0,1 %). A metodologia, que foi aplicada de seguida de modo interactivo para examinar a presença de um promotor de transcrição nos fragmentos de restrição derivados do fragmento PacI-NotI, é recapitulada na figura 3. Os resultados obtidos são detalhados abaixo, e recapitulados na figura 4.

4) Criação de deleções parciais no interior do fragmento de restrição PacI-NotI clonado no vector repórter, e evidenciação da presença de um promotor de transcrição num fragmento SfiI-NotI de cerca de 6 kb

De modo a identificar mais precisamente a região do fragmento PacI-NotI contendo o promotor, foram obtidas deleções parciais do fragmento PacI-NotI por digestão dos cosmídeos pTCF-(PacI-NotI)-CAT(-) n° 2.7.16 e pTCF-(PacI-NotI)-CAT(+) n° 2.7.13 com as combinações de enzimas PacI-SfiI ou SfiI-NotI (estando o local SfiI situado no seio do frgmento PacI-NotI), enchimento das extremidades com auxílio da sub-unidade de Kleenow do ADN PolI de E.coli, e religação das moléculas obtidas a elas mesmas. A presença de um promotor da transcrição no seio dos cosmídeos deletados foi testada utilizando uma metodologia descrita aqui acima (transfecção das células QT6 e análise dos ARN extraídos das células transfectadas por hibridação com uma sonda CAT). Os resultados obtidos sugeriram que um promotor de transcrição estava presente nos cosmídeos tendo retido a porção SfiI-NotI (de cerca de 6 kb) do fragmento PacI-NotI.

5) Análise iterativa de fragmentos de restrição derivados do fragmento SfiI-NotI, e evidenciação da presença de um promotor da transcrição num fragmento AgeI-SacI de 1200 pb

Nesta etapa, de modo a prosseguir com a análise de fragmentos de restrição derivados do fragmento SfiI-NotI segundo a mesma metodologia, foi construído um novo vector repórter. Com efeito, os fragmentos de restrição analisados tinham a partir daqui uma dimensão suficientemente reduzida para poderem ser clonados num plasmídeo.

Este novo vector repórter foi construído a partir do plasmídeo pGEM-S-zf⁺ (Promega), no qual foi clonado o fragmento EaeI de 500 pb derivado do gene bacteriano CAT na orientação (+) ao nível do local único NotI. Foi apenas utilizada esta orientação da sequência CAT no vector repórter, uma vez que as experiências anteriores tinham indicado que o par sequência repórter CAT (+) / ribossonda CAT (-) originavam resultados mais específicos e reprodutíveis do que o par sequência repórter CAT (-) / ribossonda CAT (+).

Os fragmentos de restrição SfiI-SacI (na prática, um fragmento StuI-SacI incluindo o fragmento SfiI-SacI) e SacINotI derivados do framgneot SfiI-NotI foram sub-clonados ao nível da posição EcoRV do vector pGEM-CAT(+) (clone n° 9), situado a montante da sequência repórter CAT. Através da metodologia descrita acima, a presença de um promotor de transcrição foi evidenciada no fragmento StuI-SacI, clonado no plasmídeo pGEM-(StuI-SacI)-CAT(+) (clone n° 12).

Foi estabelecido um mapa de restrição do fragmento StuI-SacI, baseado nas digestões do plasmídeo pGEM-(StuI-SacI)-CAT(+) n° 12 com os enzimas de restrição SmaI e AgeI. Dois fragmentos de restrição SmaI-SmaI, um fragmento de restrição AgeI-AgeI, e o fragmento StuI-SacI deletado deste fragmento de restrição AgeI-AgeI, foram sub-clonados no vector pGEM-CAT(+) n° 9 ao nível do local EcoRV. A presença de um promotor de transcrição foi evidenciada no fragmento StuI-SacI deletado do fragmento AgeI-AgeI, clonado no plasmídeo denominado por comodidade V12-AgeI (clone n° 29).

O fragmento StuI-SacI deletado foi recortado em dois fragmentos StuI-AgeI e AgeI-SacI, obtidos por digestão do plasmídeo V12-AgeI n° 29 pelos enzimas de restrição NcoI + AgeI por um lado (para o fragmento StuI-AgeI), e AgeI + NotI por outro lado (para o fragmento AgeI-SacI). Cada um dos dois fragmentos foi sub-clonado no vector pGEM-CAT(+) ao nível do local EcoRV. A presença de um promotor de transcrição foi evidenciada no fragmento AgeI-SacI de 1200 pb, clonado no plasmídeo pGEM-(AgeI-SacI)-CAT(+) (clone n° 15).

6) Sequenciação do fragmento AgeI-SacI, e determinação do ponto de iniciação da transcrição pela técnica de extensão de iniciador

O fragmento AgeI-SacI clonado no plasmídeo pGEM-(AgeI-SacI)-CAT(+) n° 15 foi sequenciado. A sequência é representada na figura 1 (SEQ ID NO: 1).

Os 800 pb distais desta sequência contêm 8 repetições de uma sequência de cerca de 90 nucleótidos, o que é característico dos promotores Poli: com efeito, a presença das sequências

activadoras repetidas a montante do local de iniciação da transcrição foi descrita para vários promotores Poli derivados de outras espécies (Paule M., 1998, Promoter Structure of Class I Genes. Em Transcription of Ribosomal RNA Genes by Eukaryotic RNA Polymerase I. Editado por M. R. Paule: Springer-Verlag e R.G. Landes Company).

O local preciso da iniciação da transcrição do promotor Poli de galinha foi então procurado nos 400 pb próximos do fragmento AgeI-SacI, pela técnica de extensão de iniciador. Um oligonucleótido complementar da sequência CAT transcrita a partir do plasmídeo pGEM-(AgeI-SacI)-CAT(+) (sequência SEQ ID NO: 6 : 5'-ATGTTCTTTACGATGCGATTGGG-3') foi marcado com ³²P na sua extremidade 5' com auxílio da polinucleótido cinase do fago T4 (Biolabs) e utilizado em duas reacções em paralelo: 1) como iniciador para a extensão de um ADN complementar dos ARN CAT extraídos de células QT6 transfectadas com o plasmídeo pGEM-(AgeI-SacI)-CAT(+) n° 15, na presença de transcriptase reversa (SuperScript II, Invitrogen), e 2) como iniciador para a sequenciação do plasmídeo pGEM-(AgeI-SacI)-CAT(+) n° 15 com auxílio do kit «T7 Sequencing Kit» (Pharmacia Biotech). Foi detectado um único produto de transcrição na reacção de extensão do iniciador, confirmando a existência de um local de iniciação da transcrição preciso. Este último foi localizado numa região rica em A e T, em concordância com os dados disponíveis para os promotores Poli derivados de outras espécies, situado a cerca de 200 pb do oligonucleótido utilizado como iniciador.

Em paralelo, a análise de fragmentos de restrição derivados do fragmento AgeI-SacI foi prosseguida a fim de delimitar o promotor mínimo (que corresponde a uma região da ordem dos

250 pb para os promotores Poli de outras espécies) (ver figura 5). O fragmento AgeI-SacI foi recortado em três fragmentos AgeI-BsaI, BsaI-BsaI e BsaI-SacI, obtidos por digestão do plasmídeo pGEM-(AgeI-SacI)-CAT(+) n° 15 pelos enzimas de restrição NcoI + BsaI por um lado (para os fragmentos AgeI-BsaI e BsaI-BsaI), e BsaI + NotI por outro lado (para o fragmento BsaI-SacI). Cada um dos dois fragmentos foi sub-clonado no vector pGEM-CAT(+) ao nível do local EcoRV. Apenas o fragmento BsaI-SacI de cerca de 600 pb (figura 2), clonado no plasmídeo pGEM-(BsaI-SacI)-CAT(+) (clone n° 16), permite a transcrição da sequência repórter CAT, o que é perfeitamente coerente com o facto de se tratar do fragmento proximal no qual está localizado o local de iniciação da transcrição.

O nucleótido +1 no local de iniciação da transcrição foi determinado pela técnica de extensão do iniciador, utilizando um oligonucleótido situada a cerca de cinquenta pares de bases a jusante da região de iniciação (ver figura 5). Este oligonucleótido de sequência SEQ ID NO: 7 (5'-GGCCGGTCAACCCTGCTC-3') foi marcado com ³²P na sua extremidade 5' com auxílio da polinucleótido cinase do fago T4 (Biolabs) e utilizado em duas reacções em paralelo: 1) como iniciador para a extensão de um ADN complementar dos ARN CAT extraídos de células QT6 transfectadas com o plasmídeo pGEM-(AgeI-SacI)-CAT(+) n° 15, na presença de transcriptase reversa (SuperScript II, Invitrogen), e 2) como iniciador para a sequenciação do plasmídeo pGEM-(AgeI-SacI)-CAT(+) n° 15 com auxílio do kit «T7 Sequencing Kit» (Pharmacia Biotech). Foi detectado um produto de transcrição maioritário, correspondente a um local de iniciação que possui um ambiente nucleotídico característico (nucleótidos sublinhados abaixo)

da sequência consenso estabelecida após as sequências de promotores PolI de outras espécies:

TTATATGTTTCGTC_I G T* A G G A G C G A G T G A G* G* ACTICGGCT (SEQ
ID NO: 8).

Deve notar-se que foram no entanto detectados três outros tipos de produtos de transcrição, minoritários, nesta experiência de extensão de iniciador, correspondendo a uma iniciação nos nucleótidos -1, +13 e +14 (nucleótidos marcados por um asterisco acima).

Foram construídos plasmídeos destinados a expressar um ARN pseudo-gripal portador da sequência do gene repórter CAT sob o controlo do promotor PolI de galinha com base no modelo do plasmídeo pPolI-CAT-Rz concebido por Pleschka *et al.* Com auxílio do promotor PolI humano (1996, *J. Virol.*, 70:4188-92): estes plasmídeos (pPR7-C16-CAT-Rz e pPR7- Δ C16-CAT-Rz) contêm as sequências que codificam para o gene CAT, clonados em anti-senso, e flanqueados pelas sequências 5' e 3' não codificantes derivadas do segmento genómico NS de um vírus gripal humano do tipo A; o posicionamento da extremidade 5' não codificante exactamente a montante do nucleótido -1 do promotor PolI de galinha, por um lado, e a inserção da sequência ribozima do vírus da hepatite δ na extremidade 3' não codificante, por outro lado, são destinados a assegurar a exactidão das extremidades do produto de transcrição. O plasmídeo pPR7-C16-CAT-Rz contém os nt-1 a -425 do promotor PolI de galinha, enquanto que o plasmídeo pPR7- Δ C16-CAT-Rz apenas contém os nt -1 a -246 (para outras espécies, a dimensão do promotor PolI mínimo foi estimada a cerca de 250 nt).

Os plasmídeos pPolI-CAT-Rz (promotor PolI humano), pPR7-C16-CAT-Rz ou pPR7- Δ C16-CAT-Rz (promotor PolI) aviário foram transfectados em células aviárias QT6 ou em células de primata COS-1, em simultâneo com plasmídeos que codificam para as proteínas PB1, PB2, PA e NP de um vírus gripal. Se as células transfectadas expressam ARN pseudo-gripais correctos ao nível das extremidades 5' e 3' não codificantes, e simultaneamente as proteínas PB1, PB2, PA e NP, os ARN pseudo-gripais podem ser transcritos e replicados, e a eficácia do processo de transcrição/replicação pode ser estimado através da medição do nível de proteína CAT nas células transfectadas. Os níveis de proteína CAT foram então medidos por ELISA nos extractos citoplasmáticos transfectados, preparados 24 horas após a transfecção.

Os níveis de CAT medidos na presença do plasmídeo pPolI-CAT-Rz eram da ordem de 200ng/10⁶ células transfectadas quando se tratavam de células COS-1, enquanto que eram muito baixos (<0,06ng/10⁶ células transfectadas) quando se tratam de células QT6 (figura 6).

Pelo contrário, os níveis de CAT medidos na presença dos plasmídeos pPolI-C16-CAT-Rz e pPolI- Δ C16-CAT-Rz eram muito baixos (<0,06ng/10⁶ células transfectadas) em células COS-1, mas eram da ordem de, respectivamente, 200 e 100ng/10⁶ células nas células QT6 (figura 6).

Estes resultados estabelecem que as sequências do promotor PolI de galinha clonadas nos plasmídeos pPolI-C16-CAT-Rz e pPolI- Δ C16-CAT-Rz permitem, após transfecção em células de origem aviária, a transcrição *in vivo* de mini-réplicas comportando os sinais de replicação de um vírus gripal de

tipo A. Abrem então via ao desenvolvimento de sistemas de genética reversa que permitem obter vírus gripais recombinantes em células aviárias em cultura, ou directamente em ovos embrionados de galinha.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> INSTITUT PASTEUR

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)

UNIVERSIDADE DE PARIS 7

<120> PROMOTEUR DA ARN POLIMERASE I DE GALINHA E SUA UTILIZAÇÃO

<130> D21975

<150> CA 2 421 086

<151> 2003-02-28

<160> 8

<170> PatentIn versão 3.2

<210> 1

<211> 1261

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<220>

<223> Sequência promotora da ARN polimerase I de galinha

<400> 1

cgggtgggtcc	cgcccccgtc	cgactcgggtc	gcttcgcgga	ggtggetgga	ggtcgctgcc	60
gtggcggttg	gggcacggcg	gaacgggtcta	accggctcog	gcgggccccg	tcogcctcgg	120
togctgctcg	gcggtcgcta	ggggtcgctg	ccggggtggc	tggggcacgg	cggaacggtc	180
taccgggttc	cgggggggcg	cgtcoggttc	ggtcgctccg	cggaggaggc	taggggtcgc	240
tggcgggggc	tctcggaaac	ggcggaaocg	tctaccocgg	tcoggcgggc	cccgctccgcc	300
tgggtcgctc	cgcgcggggc	ggggctagag	gtcgctgocg	tgtcggctcg	gaaacggcgg	360
aaoggtctac	ccggctccga	cgggcgcccg	ccggctcggg	agctccgcgg	cggcggttag	420
aggctcgctg	cgtgtcggct	cggaaacggc	ggaacgggtc	accggctcc	ggcggggcgc	480
gtcggctcgg	gtctctccgc	ggcggggcgt	agaggtcgg	gcogtgtcgg	ctcggaaacg	540
ggggaacggg	ctaccocggg	ccgacggggc	ccgtccggct	cggctctccc	gcggcggcgg	600
ctagaggtcg	ctgcctgctc	ggctcggaaa	cggcggaaag	gtctaccocg	ctccgcaggg	660
ccccgtccgg	ctcggctcgt	cgcggggcgc	ggctaggggt	cgtgcocggg	gcgtctcggc	720
aaoggcggaa	cggctctacc	gggtgctacc	gactcogcgt	ctccggggcg	gcggctagag	780
gtcgtcggcg	ggggcgcttg	cgatccgcgt	ccaggctctac	ccggtttcgg	attgtcttgg	840
ccgctctggc	tgtggggggg	ggcgtacag	ctccggagct	gccagaggcg	tcgctgtaat	900
tttgtacctc	cagttacgtc	gaggtaaacc	tcggctgocg	tcggagccgc	tgccggtagt	960
cggcgcctat	ggggctagaa	cgtttttttc	ggatgcctta	tatgttcgtc	tgtaggagcg	1020
agtgaggact	gggctccggg	agtggcggtg	agcgggcgct	cgcgagcagg	gttgaccggc	1080
cggccgccta	gagaggggat	cggcggggcg	ggcggcggct	ttctcgggca	toggttcgtt	1140
cgatcgggtc	ggctcgttcg	gtttgtccgt	cgtctctcat	ccgcagctc	tgtctcgggc	1200
taaggcgggt	ttgcaggcga	gcagcgaaaa	aaagcgggag	aaggcgatca	ctagtgcggc	1260
c						1261

<210> 2

<211> 674

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<220>

<223> Sequência promotora da ARN polimerase I de galinha

<400> 2

.tcogcggcgg	cggctagagg	tcgctgcccgt	gtcggctcgg	aaacggcggg	acggctctacc	60
cggctccgac	ggcccccgtc	cggctcggtc	gctccgcggc	ggcggctagg	ggtcgctgcc	120
ggggcgctctc	ggaaacggcg	gaacgggtcta	cccgggtgct	accgactcgc	gctctccgcg	180
gcccgggcta	gaggtcgctg	ccggggcggc	ttgcgatccg	cgtccaggtc	tacccggttt	240
cggattgtct	tggccgctct	ggctgtgggg	gggggcgcta	cagctccgga	gctgccagag	300
gcgtcgctgt	aattttgtac	ctccagttac	gtcgaggtaa	acctcggctg	ccgtcggagc	360
cgtgcocggg	agtccggccc	tatggggcta	gaaagttttt	ttcggatgcc	ttatatgttc	420
gtctgtagga	gcgagtgagg	actcggctcc	ggtagtggcg	gtgagcgggc	gctcgcgagc	480
agggttgacc	ggccggccgc	ctagagaggg	gatcggcggc	ggcggcggcg	gctttctcgg	540
gcatcgggtc	gttcgatcgg	tcgggtcgtc	tcggtttgtc	cgtcgtcctc	catccgcag	600
ctctgtcctg	ggctaaggcg	gttttgcagg	cgagcagcga	aaaaaagccg	gagaagggca	660
tcactagtgc	ggcc					674

<210> 3

<211> 26

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido derivado do ARN ribossômico de galinha

<400> 3

gagtcagccc tcgacacaag cttttg 26

<210> 4

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido derivado do ARN ribossômico de galinha

<400> 4

ctactggcag gatcaaccag gt 22

<210> 5

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido derivado do ARN ribossômico de galinha

<400> 5

tagaggagaa cgcgacctcg agac 24

<210> 6

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido complementar da sequência CAT transcrita a partir do plasmídeo pGEM-(AgeI-SacI)-CAT(+)

<400> 6

atggttcttta cgatgctgatt ggg 23

<210> 7

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador derivado do promotor da ARN polimerase I de galinha

<400> 7

ggccggtcaa ccctgctc 18

<210> 8

<211> 38

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido derivado de um produto de transcrição correspondente a um local de iniciação do promotor da ARN polimerase I de galinha

<400> 8

ttatatgttc gtctgtagga gcgagtgagg actcggct 38

23-01-2008

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleótido isolado ou purificado consistindo na sequência SEQ ID NO: 1 ou de um fragmento deste constituído por pelo menos 10 nucleótidos consecutivos da sequência SEQ ID NO: 1 e possuindo uma actividade promotora da transcrição.
2. Polinucleótido isolado ou purificado consistindo na sequência SEQ ID NO: 2 ou de um fragmento deste constituído por pelo menos 10 nucleótidos consecutivos da sequência SEQ ID NO: 2 e possuindo uma actividade promotora da transcrição.
3. Polinucleótido segundo a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por possuir uma actividade promotora da transcrição nas células aviárias, preferencialmente em células de aves de criação, e mais particularmente em células de galinha.
4. ADN recombinante compreendendo um dos polinucleótidos definidos nas reivindicações 1 a 3.
5. ADN recombinante segundo a reivindicação 4, caracterizado por compreender entre outros uma sequência para transcrição.
6. ADN recombinante segundo a reivindicação 5, caracterizado pela sequência para transcrição ser um ADNc de vírus de ARN sem "capping".
7. ADN recombinante segundo a reivindicação 6, caracterizado pela sequência para transcrição ser um ADNc de vírus de ARN de polaridade negativa.

8. ADN recombinante segundo a reivindicação 7, caracterizado pelo vírus de ARN de polaridade negativa ser um ortomixovírus ou um paramixovirus.

9. ADN recombinante segundo a reivindicação 8, caracterizado pelo ortomixovírus ser um vírus de Influenza, preferivelmente de tipo A.

10. ADN recombinante segundo a reivindicação 9, caracterizado por expressar um ARNv de um ortomixovírus, tal como vírus gripal e preferivelmente um ARNv escolhido entre os segmentos de ARNv 1 a 8 do vírus de Influenza.

11. ADN recombinante segundo a reivindicação 8, caracterizado pelo paramixovirus ser escolhido entre o género dos Rubulavirus tal como o vírus da papeira e o vírus da doença de Newcastle, o género dos Morbilivirus tal como o vírus da rubéola, o género dos Pneumovirus tal como o vírus respiratório sincicial e o género dos Metapneumovirus.

12. Vector compreendendo um polinucleótido segundo qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e/ou um ADN recombinante segundo qualquer uma das reivindicações 4 a 11.

13. Células hospedeiras compreendendo um vector segundo a reivindicação 12.

14. Célula hospedeira segundo a reivindicação 13, caracterizada por ser de origem aviária.

15. Célula hospedeira segundo a reivindicação 14, caracterizada por ser uma célula aves de criação, e mais particularmente de galinha.

16. Ovo embrionado de origem aviária compreendendo um vector segundo a reivindicação 12.

17. Utilização de pelo menos um dos elementos seguintes para a produção de um vírus de ARN com polaridade negativa recombinante:

- um polinucleótido segundo qualquer uma das reivindicações 1 a 3;
- um ADN recombinante segundo qualquer uma das reivindicações 4 a 11;
- um vector segundo a reivindicação 12;
- uma célula hospedeira segundo qualquer uma das reivindicações 13 a 15; e
- um ovo embrionado segundo a reivindicação 16.

18. Método de preparação de vírus gripais recombinantes por genética reversa, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a) introdução numa célula aviária ou num ovo embrionado de origem aviária de pelo menos um vector compreendendo um ADN recombinante tal como definido na reivindicação 9 e vectores expressando as proteínas PA, PB1, PB2 e NP de um vírus gripal;
- b) aplicação à célula ou ao ovo obtido em a) de condições que permitam a expressão de vírus gripais recombinantes; e
- c) recuperação dos vírus gripais recombinantes obtidos em b).

19. Método segundo a reivindicação 18, caracterizado pela célula ser uma célula de ave de criação, e mais particularmente de galinha.

20. Método segundo a reivindicação 18, caracterizado pelo vírus gripal ser o Influenza, preferivelmente do tipo A.

21. Método de preparação de vírus sem "capping" recombinantes por genética reversa, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a) introdução numa célula aviária ou num ovo embrionado de origem aviária de um ou de vários vectores, compreendendo o referido ou os referidos vectores um ADN recombinante segundo qualquer uma das reivindicações 4 a 11 e os ADN que expressam as proteínas necessárias à transcrição/replicação do ARN viral;

b) aplicação à célula ou ao ovo obtido em a) de condições que permitam a expressão de vírus gripais recombinantes; e

c) recuperação dos vírus gripais recombinantes obtidos em b).

22. Polinucleótido segundo a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por estar contido na estirpe pGEM-ChPolI-C15-E.coli 1305 depositada na CNCM a 24 de Fevereiro de 2003 com o número I-2976.

23-01-2008

CCGGTGGTCCCAGCCCGCTCCGACTCGGTTCGCTTCGCGGAGGTGGCTGGAGGTCCSCTGCC
 GTGGCGGCTGGGGCACGGCCGGAACGGTCTAACCGGCTCCGGCGGGSCCCCGTCCGCTCGG
 TCGCTGCTCCGCGGCTGCTAGGGGTTCGCTGCCGGGGTGGCTGGGGACAGCCGGAADGGT
 TACCCGGGTCCGGCGGGCCCGCTCCGGCTTCGGTCCCTCCGGCGAGGAGGCTAGGGGTCCG
 TGCCGGGGCCCTCTCGGAAACGGCCGGAACGGTCTACCCGGCTCCGGCGGGCCCCGTCGGC
 TCGGTTCGCTCCGGCGCCGGCGGGGGCTAGAGGTTCGCTGCCGTTCGGCTCGGAAACGGCGG
 AACGGTCTACCCGGCTCCGACGGGCGCCGTCGGCTTCGGTAGCTCCGGCGCCGGCGGCTAG
 AGGTTCGCTGCCGTTCGGCTTCGGAAACGGCCGGAACGGTCTACCCGGCTCCGGCGGGCGCC
 GTCCGGCTTCGGTCTCTCCGGCGGGCGGGCTAGAGGTTCGCTGCCGTTCGGCTTCGGAAACG
 GCGGAACGGTCTACCCGGGTCCGACGGGCGCCGTCGGCTTCGGCTTCGGCTTCGGCGGGCGG
 CTAGAGGTTCGCTCCGTTCGGCTTCGGAAACGGCGGAACGGTCTACCCGGCTCCGACGGG
 CCCCCTCCGGCTTCGGTTCGGCTTCGGCGGGCGGGCTAGGGGTTCGCTGCCGGGGCGTTCGGA
 AACGGCGGAACGGTCTACCCGGGTTCGACTCCGACTTCGGCTTCGGCGGGCGGGCTAGAG
 GTCGCTGCCGGGGCGGGCTTCGGATCCGGCTCCAGGTCTACCCGGTTTCGGATTGCTTGG
 CCGCTTCGGCTTCGGGGGGGGGGCGCTACAGCTTCGGAGCTGCCAGAGGGCTTCGCTGTAAT
 TTTGTACCTCCAGTTACGTCCAGGTAACCTTCGGCTTCGGCTTCGGAGCCGCTTCGGGTAGT
 CGGCGCCATAGGGGCTAGAACGTTTTTTTTTCGGATGCCTPATATGTTTCGCTTCGTAGGAGCG
 AGTGAGGACTTCGGCTCCGGTATTCGGCTTCGGCTTCGGCTTCGGCTTCGGCTTCGGCTTCGGCT
 CGGCCGCTTAGAGAGGGGATCCGGCGGGCGGGCGGGCGGCTTTCTCGGGCATCGGTTCCGTT
 CGATCCGGTCCGGTTCGGTTTCGGTTTCGGTTCGGTTCGGTTCGGTTCGGTTCGGTTCGGTTCGGT
 TAAGGCGGTTTTGCAGGGGAGCAGCGAAAAAAGCCGGAGAGGGGATCACTAGTGCGGC
 C

FIGURA 1

TCCGCGGGCGGGCTAGAGGTCGCTGCCGTGTGCGSCTCGGAAACGGCGGAACGGTCTACC
CGGCTCCGACGGGGCCCCGTCCGGCTCGGTGCTCCGCGGCGGGCTAGGGGTGCTGCC
GGGGCGTCTCGGAAACGGCGGAACGGTCTACCCGGGTGCTACCGACTCGCGCTCTCCGG
GCGGCGGCTAGAGGTCGCTGCCGGGGCGGCTTGCATCCGCTCCAGGTCTACCCGGTTF
CGGATTGCTTTGGCCGCTCTGGCTGTGGGGGGGGCGCTACAGCTCCGGAGCTGCCAGAG
GCGTCGCTGTAAATTTGTACCTCCAGTTACGTCGAGGTAAACCTCGGCTGCCGTCCGAGC
CGCTGCCGGTAGTCGGCGCCTATGGGGCTAGAACGTTTTTTTCGGATGCCTTATAATGTC
GTCTGTAGGAGCGAGTGAGGACTCGGCTCCGGTAGTGGCGGTGAGCGGGCGCTCGCGAGC
AGGGTTEACCAGCCGGCCGCTTAGAGAGGGGATCGGCGGGCGGGCGGGCGCTTTCTCGG
GCATCGGTTGTTGATCGGTCCGGTCGCTTCGGTTFGTCCGTGCTCCTCATCCCGCAG
CTCTGTCTGGGCTAAGGCGGTTTTGCAGGCGAGCAGCGAAAAAAGCCGGAGAAGGGGA
TCACTAGTCCGGCC

FIGURA 2

3/6

pTCF-CAT

pTCF (PacI.NotI)-CAT



Dia 1 • Transfecção de células QT6 com Eugene (Roche)

Dia 2 • Extracção dos ARN das células transfectadas com Trizol (GibcoBRL)

- Tratamento dos ARN com DNase RNase free (Ambion) 2 vezes 1 h a 37°C com 8U de enzima

- Extracção fenol-CHCl₃, precipitação dos ARNs com etanol, retoma dos sedimentos de ARN com água p.p.t.

- Medição da concentração por Abs 260 nm

Dia 3 • Deposição de 5 µg de ARN sobre uma membrana Hybond N+ com auxílio de um equipamento de Slot-Blot (Hoefer Scientific Instrument)

- Hibridação com uma ribossonda CAT complementar a uma cadeia CAT susceptível de ser transcrita, sintetizada pela polimerase do fago T7 ou SP6 (Promega) na presença de $\alpha^{32}\text{P}$.rUTP (Amersham), purificada em colunas QIAGEN (PCR Purification Kit)

Tampão de hibridação:

Condições de hibridação: durante a noite a 65°C num forno e hibridação (Amrsham Life Sciences)

Dia 4 • Lavagens

- Exposição contra um ecrã de PhosphoImager (Molecular Dynamics), varrimento no PosphorImager

- Quantificação dos sinais com auxílio do programa informático Dmage Quart (Molecular Dynamics)

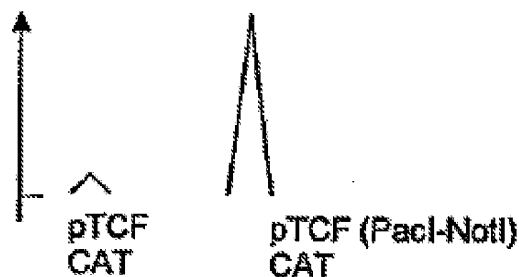
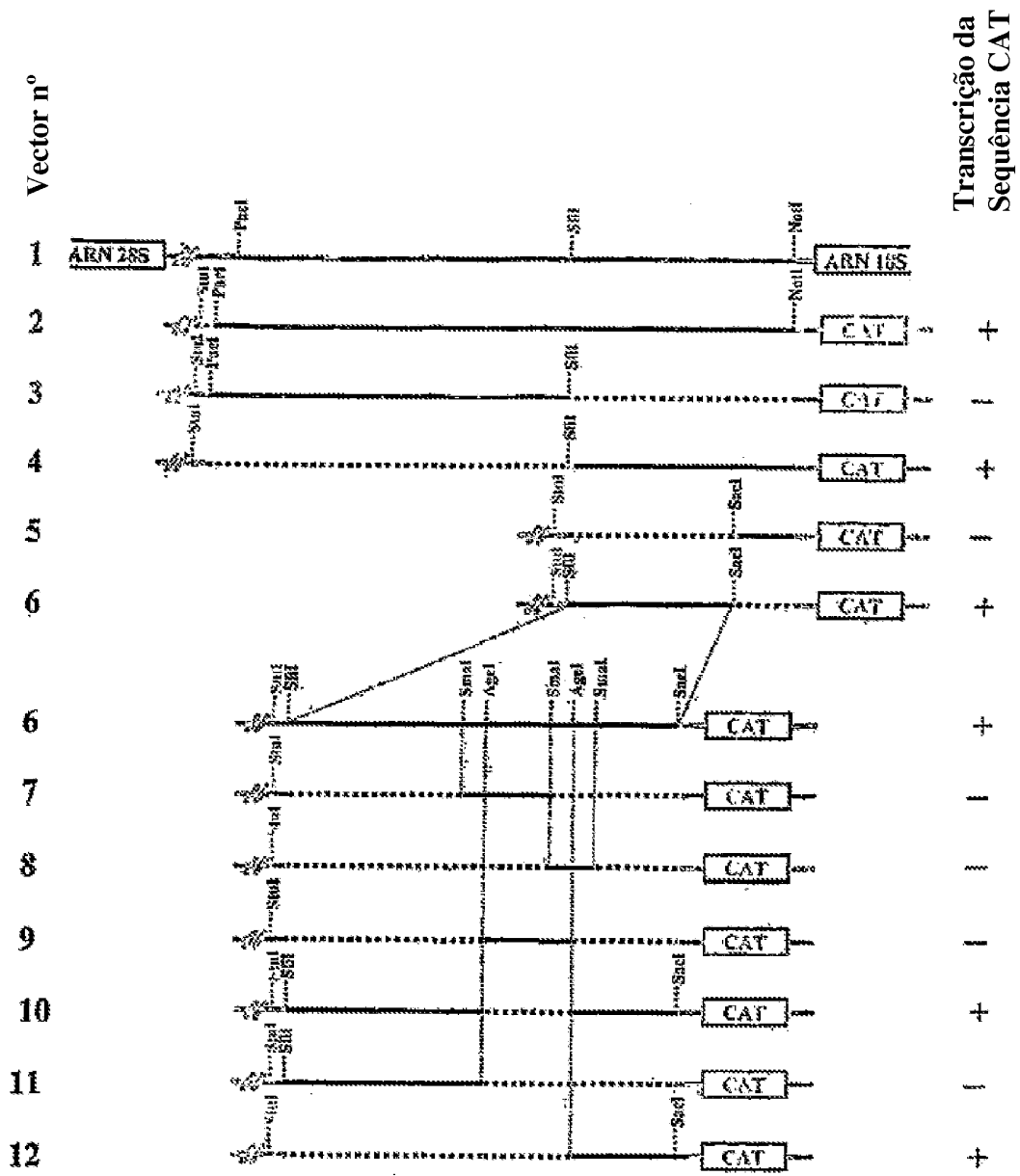


FIGURA 3



Vectores 1 = C13-18, 2 = pTCF (PacI-NotI)-CAT, 3 = pTCF (PacI-NotI) ? (SfiI-NotI)-CAT, 4 = pTCF (PacI-NotI) ? (PacI-SfiI)-CAT, 5 = pGEM (SacI-NotI)-CAT, 6 = pGEM (SfiI-SacI)-CAT, 7 = pGEM (SmaI-900)-CAT, 8 = pGEM (SmaI-300)-CAT, 9 = pGEM (AgeI-1000)-CAT, 10 = pGEM (SfiI-SacI)- ? (AgeI)- CAT, 11 = pGEM (SfiI-AgeI)-CAT, 12 = pGEM (AgeI-SacI)-CAT

FIGURA 4

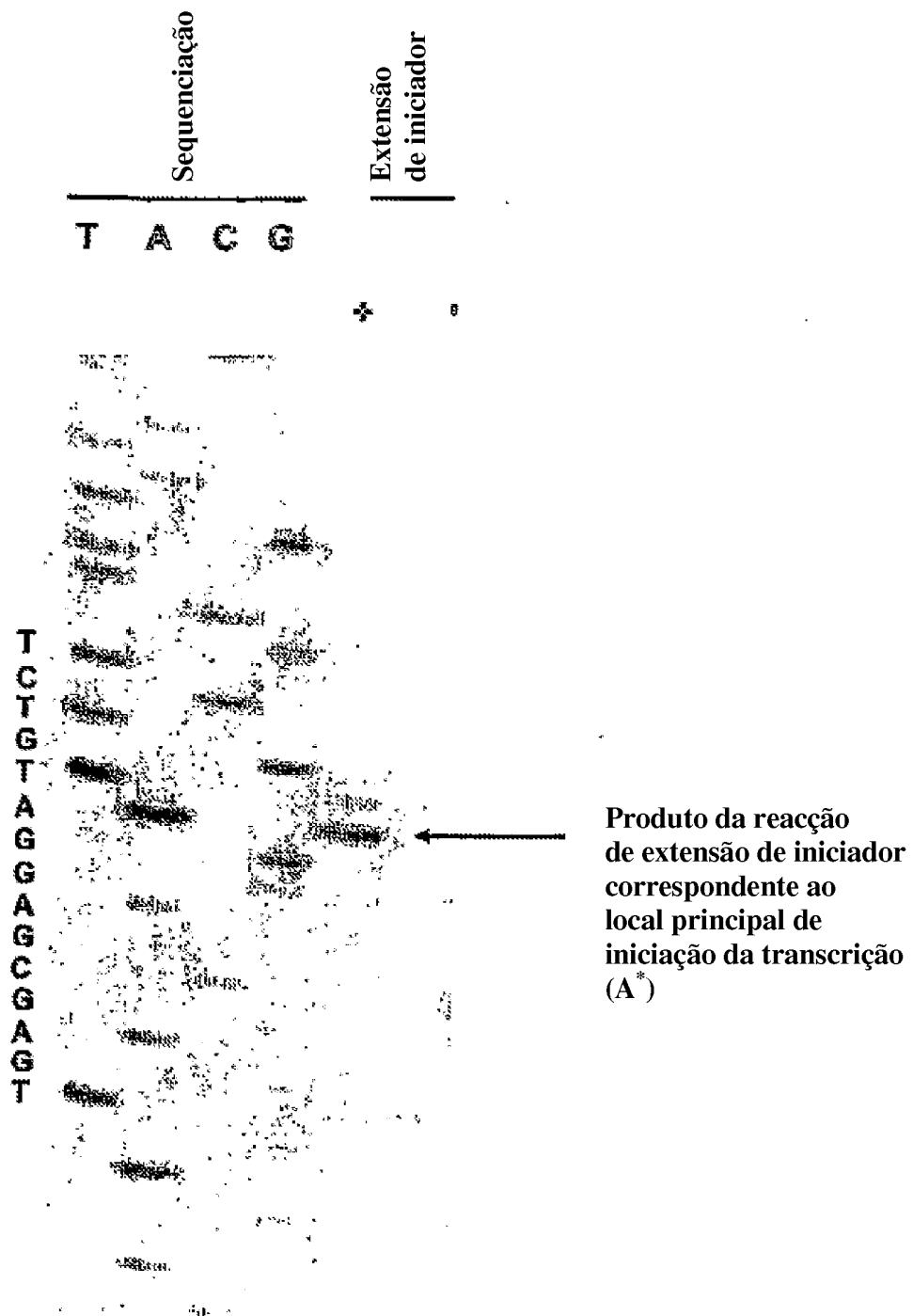
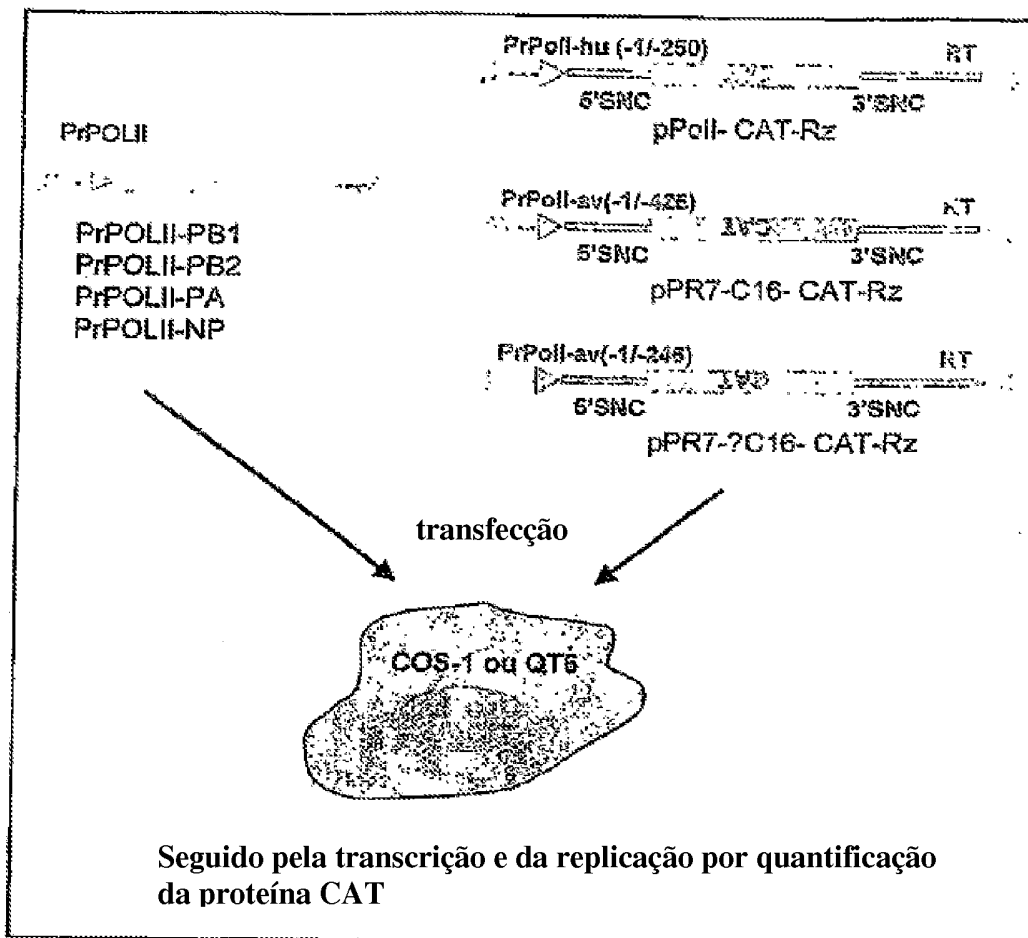


FIGURA 5



	COS-1	QT6
pPoll-CAT-Rz	~ 200	<0,06
pPR7-C16-CAT-Rz	<0,06	~ 200
pPR7-?C16-CAT-Rz	<0,06	~ 100

Níveis de CAT medidos nos extractos citoplásmicos de células ttransfectadas (em ng/10⁶ células transfectadas), às 24h após a transfecção

FIGURA 6