

(11) Número de Publicação: **PT 733113 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/56 (2006.01) **C12N 9/24** (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) **C12N 15/81** (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **1995.01.06**

(30) Prioridade(s): **1994.01.11 NL 9400045**
1994.01.24 EP 94200159

(43) Data de publicação do pedido: **1996.09.25**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.05.02**
056/2007

(73) Titular(es):

**VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INSTITUUT VOOR
BIOTECHNOLOGIE
RIJVISSCHESTRAAT 120 9052 ZWIJNAARDE
BE**

(72) Inventor(es):

WALTER CHARLES FIERS BE
TOM MARIA DEROO BE
WILLY ALFONS MIN JOU BE

(74) Mandatário:

ANTÓNIO LUÍS LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
RUA DE MIGUEL LÚPI, Nº 16, R/C 1200-725 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VACINA CONTRA A GRIPE**

(57) Resumo:

RESUMO

"VACINA CONTRA A GRIPE"

A presente invenção diz respeito a uma neuraminidase recombinante que se pode obter mediante o desenvolvimento de células hospedeiras em um meio de cultura apropriado que se transformam com um vector de expressão da neuraminidase ou se infectam com um vírus que é transformado com um vector de expressão da neuraminidase, em que o vector de expressão compreende pelo menos uma parte da região codificante de um gene da neuraminidase de um vírus influenza menos a região que codifica a "âncora" de membrana, ou uma sua versão modificada, precedida no ciclo por uma sequência sinal; e isolamento do produto de expressão neuraminidase a partir do meio de cultura. A presente invenção diz ainda respeito a uma vacina em que se utiliza a neuraminidase recombinante, e a métodos para a sua preparação e purificação.

DESCRIÇÃO

"VACINA CONTRA A GRIPE"

A presente invenção diz respeito a uma neuraminidase recombinante de vírus influenza, a um vector de expressão com o qual se pode expressar a neuraminidase recombinante em células hospedeiras, a métodos para produzir e purificar a neuraminidase recombinante, a vacinas contra a gripe ("anti-influenza") e à utilização da neuraminidase recombinante de acordo com a presente invenção.

O vírus influenza dos tipos A e B que surgem por surtos epidémicos provocam desconforto considerável nos indivíduos afectados e exercem forte influência sobre a vida social e económica. Esses vírus induzem uma significativa taxa de mortalidade em pessoas idosas e em doentes com enfermidades crónicas. Durante os anos 40 (1940) que se seguiram à sua introdução, observou-se serem as vacinas inactivadas, baseadas em material viral cultivado em ovos de galinhas, manifestamente eficazes contra a infecção da gripe e terem resultado em uma diminuição significativa da taxa de mortalidade em populações de alto risco.

Entre os vírus dos canais brônquicos os vírus influenza são especiais porque sofrem uma significativa variação antigénica (designada "drift") nos seus dois antigénios de superfície, ou seja, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA).

Além disso, o vírus influenza do tipo A em particular pode escapar à imunidade prevalente devido ao fenómeno de "shift" (recombinação de genes). Aparecendo subitamente no

vírus humano existe um gene de NA que provém do reservatório animal de genes de vírus influenza. Em 1957 o vírus do tipo NA1 prevalente até àquela momento foi assim substituído por um novo vírus do tipo NA2. Desde 1977 vírus do tipo NA1 retornaram à população humana. Conseqüentemente, as vacinas actuais devem focar-se preferivelmente contra ambos os vírus dos tipos NA1 e NA2.

A NA catalisa a remoção dos restos terminais de ácido siálico dos grupos glicosílicos pelo que os potenciais receptores da HA são destruídos (Gottschalk, 1957; Burnet and Stone, 1947). Considera-se que a NA é essencial na prevenção da aglomeração dos vírus e na sua eficiente propagação de célula para célula (Colman and Ward, 1985).

Cada molécula de NA ($M_r=240\ 000$) apresenta uma estrutura semelhante a um cogumelo em forma de guarda-soi que consiste em quatro cadeias polipeptídicas idênticas assentes em dois dímeros que se ligam por pontes dissulfureto e que por sua vez se ligam conjuntamente por ligações não covalentes (Bucher and Kilbourne, 1972; Laver and Valentine, 1969; Varghese et al., 1983; Ward et al., 1983). Diferentemente da HA, a NA ancora-se na membrana lipídica através de uma sequência lipofílica NA-termina: que não sofreu "splicing" (Fields et al., 1983; Block et al., 1982), a suposta "âncora" de membrana. A maior parte da estrutura total projecta-se para fora por cima da membrana e aí forma a área distal da "cabeça" em forma de caixa localizada na extremidade de uma região em forma de "pedúnculo" ("stalk") alongado (Wrigley et al., 1973). No interior da cabeça cada monómero possui o seu próprio sítio catalítico e contém pelo menos quatro grupos glicosílicos ligados à NA (Colman et al., 1983; Ward et al.,

1982). Não obstante, não se demonstrou até hoje a presença de O-glicosilação.

Devido à sua localização exterior os antígenos HA e NA representam, relativamente ao sistema imunitário hospedeiro, as mais importantes estruturas-alvo viricas. Dos antibióticos que se ligam especificamente à HA pensa-se que os mesmos neutralizam a capacidade de infecção viral, provavelmente mediante o bloqueamento das fases iniciais da infecção (Hirst, 1942; Kida et al., 1983). Normalmente os anticorpos específicos da NA não impedem a infecção inicial de uma célula-alvo (Jahiel and Kilbourne, 1966; Kilbourne et al., 1968; Johanssen et al., 1988) mas sim a propagação do vírus. Além disso, devido aos mecanismos de competição, a resposta imunológica à NA parece estar parcialmente deprimida em benefício do antígeno HA que ocorre mais frequentemente (Johanssen et al., 1987, Kilbourne, 1976). Como resultado obtido o efeito da imunidade pela NA é geralmente dominado pelos anticorpos neutralizantes da HA. Por essa razão os desenvolvedores de vacinas focaram a sua atenção há muito tempo quase exclusivamente sobre a HA.

Contudo, uma série de observações experimentais indica que a NA é de facto capaz de contribuir com uma parte significativa no desenvolvimento de imunidade protectora contra a gripe (Schulman et al., 1968; Johansen and Kilbourne, 1990; Johansen et al., 1993). Estudos fundamentais sobre o potencial imunogénico da NA necessitam da disponibilidade de antígenos muito puros em quantidades suficientes e com a correcta conformação tridimensional. Até agora tem-se preparado a NA tratando envelopes virais com detergentes (Gallegher et al., 1984; Kilbourne et al., 1968) ou mediante clivagem proteolítica da cabeça da proteína,

geralmente por meio da pronase (Seto et al., 1966; Rott et al., 1974), seguida por purificação da NA. Mather et al., 1992 (Virus Research 26: 127-139) descreveram a expressão da NA em toda a extensão em células de insecto infectadas com baculovirus. A NA contém a âncora de membrana endógena e não foi precedida por uma sequência sinal. A maioria da NA expressa por Mather et al. 1992 associou-se portanto às membranas, mas os autores relataram também nos sobrenadantes das células infectadas uma pequena quantidade de um subproduto da NA de 50kD. No entanto, esse subproduto secundário da NA representa uma mistura indefinida e provavelmente heterogênea de produtos de clivagem imaturos ou não específicos da membrana associada à NA em toda a extensão. Conseqüentemente, por um lado, Mather et al. não obtiveram espécies moleculares da NA segregáveis bem definidas. Apesar de algum grau de utilidade, esses métodos apresentam consideráveis limitações no que respeita ao rendimento e pureza.

O objectivo da presente invenção é conseqüentemente apresentar uma neuraminidase recombinante de vírus influenza que possua propriedades antigénicas correspondentes à neuraminidase natural e se apresente dobrada ("folded") do modo correcto.

Uma tal neuraminidase recombinante sob uma forma efectivamente isolada pode obter-se de acordo com a presente invenção utilizando:

a) o desenvolvimento em um meio de cultura apropriado de células hospedeiras que se transformam por meio de um vector de expressão da neuraminidase ou se infectam com um vírus que se transforma com um vector de expressão da

neuraminidase, em que o vector de expressão compreende pelo menos uma parte da região codificante de um gene de neuraminidase de um vírus influenza menos a região que codifica a "âncora" de membrana precedida no ciclo por uma sequência sinal clivável; e

b) o isolamento do produto de expressão neuraminidase, do meio de cultura.

A neuraminidase recombinante de acordo com a presente invenção que é segregada no meio de cultura pode utilizar-se por exemplo em estudos fundamentais, e que se realiza a vacinação separada com NA de modo a determinar o papel da NA em uma vacina. Contudo, na prática a NA recombinante utilizar-se-á provavelmente ainda em associação com a NA de modo a aumentar o grau de protecção (percentagem da população inoculada que é eficazmente protegida contra uma infecção) e a persistência da protecção (protecção contra estirpes epidémicas posteriores).

Mais especialmente a presente invenção apresenta uma neuraminidase NA2 recombinante de vírus influenza que se pode obter mediante cultura de células hospedeiras em um meio de cultura apropriado e isolamento do produto de expressão neuraminidase a partir do meio de cultura. Isso impõe na prática por exemplo que o módulo de expressão recombinante proveniente de pAc21VNAs é inserido em um baculovírus "wild-type" (do tipo selvagem) ou em um seu derivado. Seguidamente infectam-se células hospedeiras com esse baculovírus recombinante.

As células hospedeiras utilizadas para a produção de neuraminidase recombinante de vírus influenza têm origem preferivelmente em organismos eucariotas inferiores como

insectos, preferivelmente na linha de células de insectos sf9, mas pode também ser em células de levedura como Saccharomyces ou Pichia.

A presente invenção diz ainda respeito a dois vectores de expressão de uma neuraminidase segregável por vírus influenza que compreendem uma origem de replicação, pelo menos uma parte da região codificante de um gene da neuraminidase de vírus influenza menos a região que codifica a âncora de membrana, uma sequência sinal localizada em 5' na região codificada e a ela acoplada durante o ciclo, um promotor localizado em 5' na sequência sinal e um terminador da transcrição localizado em 3' na região codificante. Mais especialmente a presente invenção apresenta um vector para utilização na expressão de uma neuraminidase NA2 segregável por vírus influenza que consiste em uma origem de replicação, a região codificante de um gene da neuraminidase NA2 de vírus influenza da estirpe A/Victoria/3/75 menos a região que codifica a âncora de membrana.

Para expressão em células de insecto coloca-se um tal vector em uma célula juntamente com um baculovirus "wild-type" ou seu derivado. Origina-se um baculovirus recombinante devido à ocorrência de uma dupla recombinação homóloga, em que se introduz o módulo de expressão de acordo com o vector no genoma viral. Concluída a purificação da placa obtém-se uma reserva ("stock") de baculovirus recombinantes que se podem utilizar subsequentemente para infectar por exemplo células sf9.

A sequência sinal provém preferivelmente de um gene da hemaglutinina de vírus influenza do tipo NA2 A/Victoria/3/75(H3N2). A presente invenção compreende

preferivelmente o vector pCZ1VNAs, depositado em 3 de Janeiro de 1994 no Laboratorium voor Moleculaire Biologie-Plasmidencollectie (LMBP), K.L. Ledeganckestraat 3, B-9000 Ghent, Bélgica. O número de admissão do depósito LMSP 2976, é utilizado na transformação de um vírus, como por exemplo o baculovírus, através da dupla recombinação homóloga. Na presente invenção o módulo de expressão do vector, constituído pelos sinais de regulação da transcrição, pela sequência sinal e pela região codificante, coloca-se no genoma do vírus.

Em uma outra forma de realização da presente invenção utiliza-se um segundo vector de acordo com a mesma invenção. Um tal vector destina-se à utilização em leveduras e compreende por exemplo uma origem de replicação, a região codificante de um gene da neuraminidase NA2 de vírus influenza estirpe A/Victoria/3/-75 menos as regiões que codificam respectivamente a âncora de membrana e a parte do pedúnculo ("stalk") de NA, uma sequência sinal localizada em 5' na região codificada e aí acoplada no ciclo, um promotor localizado em 5' na sequência sinal e um terminador de transcrição localizado em 3' na região codificante.

As sequências, promotora e terminadora, são preferivelmente homólogas e originam-se na Levedura metilotrófica Pichia pastoris, como sequências do gene álcool oxidase I. A sequência sinal é por exemplo o sinal de secreção do factor a da pré-pró-conjugação de Saccharomyces cerevisiae.

O vector pPFL1VNAs15 depositou-se em 3 de Janeiro de 1995 no Laboratorium voor Moleculaire Biologie-Plasmidencollectie (LMBP), K.L. Ledeganckestraat 35, B-9000

Ghent, Bélgica com o número de admissão do depósito LHEF 3223.

Observa-se que a neuraminidase recombinante de acordo com a presente invenção é capaz de induzir imunidade protectora contra vírus influenza, especialmente os do tipo NA2. Consequentemente a presente invenção também diz respeito a uma vacina contra a gripe ("anti-influenza") na qual se inclui a neuraminidase recombinante.

Além disso a presente invenção ainda diz respeito a um método de fabrico de neuraminidase recombinante e a um método de purificação da mesma.

A sigla "NAs" referida nas presentes memória descritiva e reivindicações significa neuraminidase (recombinante) segregável. A sigla "pNA" refere-se a neuraminidase natural tratada com pronase. "NA" significa neuraminidase.

A presente invenção será esclarecida com maior detalhe em referência aos exemplos descritos seguidamente na presente memória descritiva os quais têm apenas por objectivo fins explicativos e não implicam qualquer limitação no âmbito da mesma invenção.

EXEMPLO 1

EXPRESSION, PURIFICACAO E CARACTERIZACAO DE NEURAMINIDASE NA2 RECOMBINANTE DE VIRUS INFLUENZA

Materiais e métodos

1. Construcao de um gene que codifica uma neuraminidase que e segregada e a sua integracao em um sistema de expressao de baculovirus

a. Plasmideos

O plasmideo pV6/21 e um derivado de pBR322 que contem uma copia de um gene de neuraminidase de virus influenza A/Victoria/3/75(H3N2) (Van Rompuy et al., 1982). pSV51 e ambos pSV23m e pSV24m sao respectivamente os vectores de substituicao ultimo e inicial de SV40 e estao descritos em outros locais (Huylebroeck et al., 1988). pSRS-8 e um plasmideo baseado em pPLa2311 que contem a sequencia inicial de um gene da hemaglutinina (HA) do tipo A/Victoria/3/75 (H3N2) (Huylebroeck et al., 1988). O vector transportador pVL941 de baculovirus foi desenhado por Luckow e Summers (1989).

b. Subclonagem da sequencia peptidica sinal HA (prv-preHA).

Inseriu-se um fragmento 1830 bp SstNI de pSRS-8 em uma enzima de Klenow. Posteriormente procedeu-se ao arranjo de ligantes PvuII (GCAGCTCC). Digeriram-se o fragmento resultante e pBR322 com PvuI e PvuII e isolaram-se os fragmentos de respectivamente 731 bp e 1839 bp. A ligacao desses dois produziu pLVpreHA que continha a regioe 5' nao

través do gene da HA, com início em G₁₂₆(ATG = +1, +2, +3), seguida pela sequência peptídica sinal de HA intacta e pelos primeiros poucos codões de HA madura.

c. Construção de uma sequência quimérica que codifica NA que pode ser segregada: pAT1VNAs.

Abriu-se pV6/21 com PvuI e usou-se com exonuclease Ba/31. A essa mistura ligaram-se ligantes HindIII, seguida por digestão com HindIII. Selecionou-se um fragmento de NA de aproximadamente 1 500 bp e clonou-se no único sítio de restrição HindIII de pSV23m ((pSV23m/VNA). Plasmídeos com o "insert" virado para a esquerda digeriram-se subsequentemente com FnuDII em Sall e recuperou-se o fragmento 1291 bp que continha um gene de NA menos a sequência âncora membranar. incubou-se posteriormente pVpreHA com PstI e PvuI e reteve-se o fragmento 861 bp com a sequência sinal da NA. Finalmente fundiram-se ambos os fragmentos por ligação cega ("blunt") de PvuI-FnuDII e inseriram-se no fragmento 2253 bp Sall/PstI de pAT153, originando pAT1VNAs. Esse plasmídeo transporta a sequência que codifica o péptido sinal da HA incluindo os primeiros poucos aminoácidos da HA madura, seguida imediatamente pela sequência sem o péptido sinal/âncora de membrana da NA e por uma parte da região que codifica o pedúnculo ("stalk"). A ligação dos fragmentos da HA e da NA resulta em uma única substituição de um aminoácido (Gly por Ala), que corresponde à posição 5 da HA madura. Com base na informação publicada por Min Joo et al., (1988) e Van Rompuy et al., (1982), apresentam-se na fig. 2. as sequências previstas de ADN e dos aminoácidos adjacentes ao sítio de ligação nas NAs.

d. Integração de HAS em um vector transportador de baculovírus.

O fragmento 1368 bp XbaI/SalI de pAFIVNAs ligou-se ao fragmento 3362 bp SalI/EcoRI de pSV31 e ao fragmento 624 bp EcoRI/XbaI de pSV24m. Posteriormente inseriram-se uma cópia do fragmento 1647 bp BamHI que contém um gene de NAs com o sítio poli(A) de SV40 no único sítio de restrição de pVL941, tomando nota da orientação correcta relativa ao promotor poli-hedrina, resultando em pAc21VNAs. Essa construção permite uma recombinação homóloga com ADN de AcNPV "wild-type" após cotransfecção de células Sf9. Isolaram-se descendentes recombinantes de vírus por técnicas de purificação sucessiva em placa como descrito por Summers and Smith (1987).

2. Cultura de células de insecto - produção de NAs

Tendo em vista a cultura regular conservaram-se células de insecto Sf9 como monocamadas celulares confluentes em meio TC100 com 10% de soro fetal de vitela e 50 µg/ml de gentamicina. Para a infecção com o baculovírus recombinante transferiram-se as culturas para suspensões de 200 ml desenvolvendo-se em frascos cilíndricos de 850 cm² (25 rpm). Infectaram-se seguidamente as células em suspensão no final da sua fase logarítmica (2x10⁶ células/ml) com baculovírus recombinante em uma MOI ("multiplicidade de infecção", isto é o número de partículas virais infectivas por célula) de 1,0. Decorridas duas horas transferiram-se células infectadas para meio TC100 recente sem soro e continuou-se a incubação em suspensão durante 48 horas. Purificaram-se as NAs fora do meio, como se descreve seguidamente.

3. Cultura de vírus influenza X-47

A estirpe X-47 de vírus influenza utilizou-se como fonte para a preparação de NA natural de A/Victoria/3/75 após tratamento com cronase. O vírus X-47 cultivou-se na cavidade do saco vitelínico de ovos de galinha contendo um embrião com 11 dias. Após dois dias de incubação à temperatura de 25,5 °C arrefeceram-se os ovos durante a noite à temperatura de 4 °C e colheu-se o fluido do saco vitelínico para processamento posterior.

4. Sistemas tampão

Habitualmente utilizaram-se os tampões seguintes:

tampão A: 20 mM de dietanolamina/HCl pH 8,5;

tampão B: 50 mM de NaAc, pH 5,5;

tampão C: 10 mM de NaP, pH 7,4, 150 mM de NaCl;

Os tampões A e C contêm além disso 4% de butanol (excepto se indicado de outro modo) e 2 mM de CaCl₂.

5. Purificação de NAs

a. Fraccionamento com sulfato de amónio.

Após inoculação (ver acima) colheram-se culturas (normalmente aproximadamente 1 litro) de Sf9 em suspensão e precipitaram-se os resíduos celulares por centrifugação a 4 000xg durante 15 minutos. Todos os tratamentos posteriores se realizaram a 4°. Nas primeiras fases de purificação adicionaram-se às soluções 5 mM de NaH₂PO₄. Submeteu-se o meio bruto purificado a fraccionamento com sulfato de amónio a pH

7,5. Colheu-se por centrifugação (10 000xg; 60 minutos) o material que precipitou entre 20% e 60% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e dissolveu-se em tampão A (sem butanol) + 20 mM de NaCl em uma quantidade de 1/10 do volume inicial. O produto precipitado que se dissolveu novamente submeteu-se a diálise ([membrana peso molecular de corte (cut-off)]: 25 kd) contra 50 volumes do mesmo tampão durante 24 horas, tendo-se alterado o tampão três vezes sucessivas. Eliminaram-se os componentes insolúveis por centrifugação a 20 000xg durante 15 minutos.

b. Cromatografia de troca aniónica em Q-Sepharose

Primeiramente suplementou-se a solução submetida a diálise até 4% de butanol e colocou-se depois em uma coluna de Q-Sepharose (2,5x10 cm) que se equilibrou com tampão A + 20 mM de NaCl a uma velocidade dos fluxos superficiais de 25 ml/hora. Após lavagem da coluna com o mesmo tampão realizou-se a eluição com um gradiente de concentração linear de NaCl em um tampão de lavagem a 250 mM (250 ml; 25 ml/hora). Identificaram-se as fracções correspondentes a cada 2,5 ml que contêm NAs mediante avaliação da actividade enzimática e das concentrações por ELISA. A partir da coluna obteve-se por eluição a actividade da NA sob a forma de um único pico.

e. Cromatografia de afinidade em ácido N-(p-aminofenil)-oxâmico-agarose

A utilização dessa matriz de afinidade está descrita para a purificação da NA de vírus influenza (não recombinante) de enzimas de NA bacteriana (Custrecasas and ; 1971; Bucher, 1975]. O funcionamento correcto da matriz de afinidade conseguiu-se apenas mediante a adição

das concentrações inicialmente recomendadas do reagente tampão. Colheram-se as fracções activas após a separação da Q-Sepharose e adicionaram-se às mesmas um volume igual de 200 mM de NaAc pH 5,5. Posteriormente colocaram-se as fracções activas sobre uma coluna de ácido N-(p-aminofenil)oxálmico-agarose (1,5x5 cm) equilibrada em tampão B, 100 mM de NaCl. Posteriormente lavou-se a coluna com o tampão utilizado no equilíbrio e desionizou-se ("was desalted") com tampão B. Seguidamente realizou-se uma segunda fase de lavagem com tampão A. Utilizando o tampão A suplementado com 1M de NaCl a uma velocidade do fluxo de 10 ml/hora eluíram-se finalmente as NAs (colheiam-se fracções de 2 ml).

d. Cromatografia por filtração em gele Superdex 200

Utilizando concentradores CentriprepTM concentrou-se o eluato da coluna de afinidade ate 2,0 ml (Amicon; mwco: 30 kd). Cromatografou-se seguidamente o concentrado em fracções de 1,0 ml de volume da amostra em uma coluna para filtração em gele Superdex 200 (1,5 cm x 60 cm), que se equilibrou em tampão C com 4% de butanol. Eluiu-se a coluna utilizando o tampão de equilíbrio a uma velocidade do fluxo de 10 ml/hora e colheiam-se fracções de 1,0 ml. Para armazenagem a longo prazo à temperatura de 20 °C recolheram-se as fracções semelhantes, concentraram-se, como descrito antes, e suplementaram-se posteriormente com glicerol até uma concentração final de 59%.

A fim de determinar o peso molecular das proteínas purificadas calibrou-se a coluna para filtração em gele com apoferritina proveniente de baço equino (443 kd), β -amilase de batata doce (200 kd), álcool desidrogenase de levedura

(150 kd), albumina sérica bovina (67 kd) e anidrase carbônica (29 kd) (todas fornecidas por Sigma Chemical Co.).

6. Preparação e purificação de pNA

a. Tratamento com pronase

Inicialmente purificou-se por centrifugação a uma velocidade baixa (1000xg, 10 minutos) o fluido vitelínico de ovos de galinha infectados com X-47 e submeteu-se depois a centrifugação a 13000xg durante 16 horas tendo em vista a precipitação do vírus. Suspendeu-se novamente o precipitado viral em 10 ml de tampão C por equivalente de 100 ovos infectados e adicionou-se pronase até 2 mg/ml sem qualquer purificação posterior do vírus. Incubou-se a mistura durante 16 horas à temperatura de 20 °C ao mesmo tempo que se agitava suavemente a mão. Posteriormente eliminaram-se núcleos virais e componentes insolúveis da pronase por ultracentrifugação (100 000 x g, 1 hora) a temperatura de 4 °C. Seguidamente purificou-se por cromatografia em coluna o sobrenadante contendo as "cabeças" (heads) libertadas das NAs.

b. Cromatografia de troca catiónica em S-Sepharose

As técnicas cromatográficas realizaram-se à temperatura de 4 °C. A amostra de pNA bruta diluiu-se cinco vezes e deixou-se retornar até 50 mM de NaAc pH 5,5, 2 mM de CaCl₂ e 1% de butanol. Colocou-se depois a solução sobre uma coluna de S-Sepharose (1,5cm x 10 cm) que se equilibrou com tampão B + 1% de butanol e 50 mM de NaCl. Eluiu-se o material de ligação mediante a criação de um gradiente linear até 500 mM de NaCl no mesmo tampão. Colheram-se as frações que exibiram uma actividade enzimática mais elevada ("peak"); e

concentraram-se até 2,0 ml em tubos concentradores Centrifrap™ (Amicon) mwc: 30 kd).

d. Cromatografia por filtração em gele Superdex 200

Filtração em gele sobre Superdex 200 realizou-se de modo semelhante ao da purificação das NAs (excepto que a concentração em butanol foi 1%). A pNA pura armazenou-se à temperatura de -20 °C em glicerol a 50%.

7. Doseamento enzimático da NA

A determinação da actividade catalítica da NA baseou-se no método de Potier et al., (1979). Resumidamente, realizaram-se ensaios enzimáticos em um volume reaccional de 100 µl com 200 mM de NaAc pH 6,5, 2 mM de CaCl₂ e 1% de butanol na presença de 1 mM de ácido 2'-(4-metilumbeliferil)-α-D-N-acetilneuramínico como substrato. Concluída a incubação à temperatura de 37 °C durante 30 a 60 minutos interrompeu-se a reacção mediante a adição de 0,5 ml de 133 mM de glicina, 83 mM de NaHCO₃, 60 mM de NaCl pH 10,7. Mediante a leitura da absorção a 365 nm determinou-se 4-metilumbeliferona livre. Definiu-se uma unidade como a quantidade de enzima que libertou uma nmole de 4-metilumbeliferona por minuto.

8. Técnicas imunológicas

a. Preparação de IgG policlonal anti-pNA

Em um coelho de 3 meses de estirpe Nova Zelândia gerou-se um antígeno policlonal contra pNA purificada. A imunização primária administrou-se por via intramuscular em

cada pata sob a forma de quatro doses de 500 μ l contendo 53 μ g de pNA/dose e 75% de adjuvante completo de Freund. Seis semanas mais tarde administrou-se ao animal em ambas as patas traseiras dois reforços injectáveis análogos. Para a preparação das fracções de IgG purificou-se o soro colhido por adsorção sobre Proteína A Sepharose (Pharmacia LKB).

b. ELISA

Revestiram-se cavidades de uma placa de microtitulação com IgG de coelho anti-pNA. Diluíram-se as amostras para ensaio em PBS com 1% de albumina sérica bovina. Detectou-se antigénio ligado com IgG de coelho anti-pNA biotinilada acompanhada pelo conjugado estreptavidina-fosfatase alcalina (Boehringer). Desenvolveu-se a reacção enzimática mediante incubação das placas com p-nitrofenilfosfato (Sigma Chemical Co). Quantificaram-se os valores de absorção a 405 nm em um leitor de placas de microtitulação.

9. Métodos analíticos

A técnica de SDS/PAGE realizou-se de acordo com o método de Laemmli (1970) sobre gele de separação a 10% (excepto se indicado de outro modo). Desnaturaram-se todas as amostras na presença de β -mercaptoetanol, excepto se indicado de outro modo. Como proteínas marcadoras utilizaram-se em 10% de geles fosforilase b (94 kd), albumina sérica bovina (67 kd), ovalbumina (43 kd), anidrase carbónica (29 kd) e um inibidor da tripsina (20,1 kd, e sempre visível) (Pharmacia LKB). Fizeram-se passar geles em gradiente com as seguintes medidas de massa: miosina (22 kd), β -galactosidase (116 kd), fosforilase b, albumina sérica bovina e ovalbumina (fornecida por BioRad). A coloração pela prata realizou-se sobre geles

através de uma modificação do método descrito por Morrissey (1981). A concentração em proteína determinou-se pelo método de Bradford (1976) com albumina de galinha como padrão.

10. Análise de ligação cruzada

A molécula de ligação cruzada BS³ preparou-se na ocasião sob a forma de uma solução 1,0 M em 10 mM de Hepes, pH 7,4. Ligaram-se as proteínas em rede ("cross-linked") mediante a adição de BS³ até uma concentração de 0,5 mM em um volume reaccional de 30 µl. A incubação realizou-se durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente interrompeu-se a reacção com 5 µl de Tris 1,0 M, pH 8,0. Utilizando a técnica de SDS/PAGE analisaram-se modelos de polipéptidos.

11. Análise dos hidratos de carbono

Desnaturaram-se amostras de proteínas (entre 0,1 µg e 1 µg) mediante fervura em 500 µl de Tris/HCl pH 8,0, 0,5% de SDS, 50 mM de β-mercaptoetanol. Concluída a adição de NA-octilglucosido até uma concentração de 2,5% que resulta em pelo menos um excesso sete vezes superior à concentração final de SDS, adicionou-se NA-glicanase (aproximadamente 0,5 unidades; unidades de acordo com o fabricante) e incubou-se a mistura reaccional durante 16 horas à temperatura de 37 °C. Analisaram-se os modelos de digestão a partir da técnica em SDS/PAGE.

Resultados

1. Purificação da pNA

Em uma experiência característica relatada na presente memória descritiva manipulou-se um total de 186 ovos infectados. As diferentes fases de purificação estão resumidas no quadro 1. Após colheita do fluido vitelínico e precipitação do vírus, adicionou-se pronase até uma concentração de 2 mg/ml e incubou-se a mistura durante 16 horas à temperatura de 20 °C. Após ultracentrifugação encontrou-se na fracção sobrenadante mais ou menos 60% da actividade de NA. Observou-se que nas referidas condições a perda de actividade se atribuiu principalmente a uma remoção incompleta das cabeças de Nas das partículas de vírus. Concentrações elevadas de pronase, tempos de incubação longos ou temperaturas aumentadas não reforça a recuperação porque gradualmente a NA agregou-se mais (dados não apresentados). Posteriormente diluiu-se o material bruto da pNA e levou-se até pH 5,5. Colocou-se seguidamente sobre um trocador catiónico de S-Sepharose. Para um rendimento máximo de pNA todas as outras soluções continham 1% de butanol. A maior parte da proteína não foi rapidamente retida sobre a coluna de S-Sepharose e após eluição em gradiente registou-se apenas um único pico a aproximadamente 400 mM de NaCl (não apresentado). Esse material consistia em pNA extremamente pura tendo em vista que não se observaram bandas contaminantes após a análise por SDS/PAGE (fig. 3A, coluna 3). Além disso, a coloração pela prata não mostrou de modo algum qualquer diferença entre o conjunto ("pool") em S-Sepharose e uma fase de filtração adicional em gele Superdex 200 (fig. 3A, compara colunas 3 e 4). A última coluna forneceu um único pico em forma de sino para a fracção 40 (não

apresentado), que corresponde a um peso molecular de aproximadamente 210 kd. A fig. 3A elucida as sucessivas fases de purificação.

Por SDS/PAGE a pNA monomérica foi de facto visível sob a forma de um duplete de duas bandas, correspondente respectivamente a aproximadamente 5% kd e a aproximadamente 52 kd, em que a última foi a mais comum, conforme deduzido a partir das intensidades relativas da coloração pela prata. Em todas as 7s probabilidades esta ambivalência deriva da digestão preferida pela pronase em dois sítios diferentes na região do pedúnculo ("stalk region"). A ligação cruzada com o agente químico BS³ confirmou que se recuperou a pNA como uma autêntica proteína tetramérica (fig. 3B).

2. Construção e expressão de NAs

Separou-se um gene de NA de vírus influenza estirpe NA2 A/Victoria/3/75 da sua âncora de membrana da NA terminal e pelo contrário acoplou-se a sequência 5' de um gene de HA de A/Victoria/3/75 que contém um sítio de splicing de um peptido de sinal. A presente invenção tornou possível a síntese de um produto solúvel segregado. O gene quimérico resultante consiste em uma sequência de sinal da HA incluindo os codões dos primeiros 4 aminoácidos terminais da HA madura, seguida imediatamente pela sequência da NA sem a parte transmembranar ("âncora") e uma parte da região peduncular ("stalk region") (aminoácidos 1 a 45). Ambas as sequências de ADN se localizam no mesmo quadro de leitura ("reading frame") embora não se tenham introduzido aminoácidos extra. A ligação originou apenas uma única substituição nos aminoácidos correspondente à posição 5 da sequência "r" (fig. 2). Uma cópia dessa sequência quimérica, que essencialmente codifica agora uma

proteína que pode ser segregada, foi integrada atrás de um promotor de poli-hedrina de baculovirus AcNPV utilizando pVL941 como vector de transporte. Após inoculação de células de insecto Sf9 detectou-se rapidamente no meio a actividade de NA, o que mostra que na verdade se produz proteína solúvel.

Na fig. 4 pode observar-se que a actividade das NAs no meio atingiu um nível de patamar mais ou menos 48 horas após a infecção. Uma incubação adicional não foi vantajosa porque a concentração total de proteína começou a diminuir dramaticamente, provavelmente devido a considerável lise celular. Observou-se que a expressão pareceu ser mais importante quando a passagem intermédia entre a monocamada precursora de Sf9 e a avultada cultura da suspensão permaneceu limitada a um mínimo (dados não apresentados). Com base em diversas experiências de purificação averiguou-se que as NAs se expressaram em níveis variados desde 6 a 8 mg/l, uma capacidade de produção razoavelmente baixa, mas ainda compara-el com rendimentos relatados para outras glicoproteínas em complexo produzidas nesse sistema (Jarvis et al., 1990).

3. Purificação das NAs

Quarenta e oito horas após a infecção procedeu-se a colheita no meio TC100, momento em que a actividade enzimática específica do teor em proteína solúvel atingiu um pico (fig. 4). As diferentes fases e a das NAs estão resumidas no quadro 1. A precipitação pelo sulfato de amónio no meio bruto entre uma saturação de 20% a 60% proporciona uma moderada, dupla intensificação e possibilidade concentração do material. Após prolongada

diálise e remoção dos produtos insolúveis adicionou-se butanol até uma concentração de 4%. Observou-se que a adição de butanol exerceu um efeito intensamente favorável sobre a recuperação da massa das NAs, especialmente em situações de baixas concentrações de proteínas. Para evitar a formação de agregados insolúveis e possível que fosse necessário um determinado grau de hidrofobicidade do meio. A solução consistiu no fracionamento posterior por cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose (fig.5). A actividade da NA eluiu-se no início do gradiente salino sob a forma de um pico razoavelmente simétrico. De acordo com um ensaio ELISA as fracções restantes não continham material relacionado com a NA. Nessa fase extraiu-se mais ou menos 97,5% da quantidade inicial de proteína, originando um aumento da actividade específica utilizando um factor de aproximadamente 20. Seguidamente reduziu-se o pH da solução até 5,5 pelo carregamento de uma coluna de ácido N-(p-aminofenil)oxâmico-agarose. Sabe-se de estudos anteriores que nas NAs os ácidos oxâmicos substituídos são fortes inibidores reversíveis da NA de vírus influenza (Edmond et al., 1966). A utilização de ácido N-(p-aminofenil)oxâmico-agarose como absorvente selectivo da neuraminidase de vírus influenza ou de bactérias foi primeiramente demonstrado por Cuatrecasas e Illiano (1971) e mais tarde por Bucher (1977). De acordo com a técnica original eluiu-se a neuraminidase com um tampão de elevado pH (NaHCO_3 , 100 mM, pH 9,1). Na nossa experiência contudo essas condições permitem apenas uma parcial e lenta provisão de NAs. Desorção eficiente atingir-se-á apenas associando um pH aumentado com uma elevada concentração salina. Antes da eluição extraiu-se da coluna uma quantidade considerável de uma proteína especificamente ligada realizando uma fase de lavagem adicional a pH 8,5 na presença de uma baixa concentração salina. Preferindo diatanolamina a

NaHCO₃ como agente tampão tornou-se possível a absorção de 2 mM de CaCl₂, sem precipitação. Tem sido repetidamente relatado que a retenção da actividade da NA é até certo ponto dependente de íons Ca²⁺ (Cheng et al., 1966; Dirmock, 1971). De qualquer modo esse foi na verdade o caso no presente estudo que não se investigou detalhadamente.

A fim de eliminar vestígios de contaminantes residuais concentrou-se o eluato por ultracentrifugação e submeteu-se a filtração em gele Superdex 200 (fig. 6). A verificação a A₂₈₀ produziu três picos com desigual absorção que eluíram respectivamente a aproximadamente 220 ka, aproximadamente 130 kd e aproximadamente 54 kd. Os modelos de imunoreactividade do eluato avaliados por ELISA observaram-se serem uma representação fiel do perfil a A₂₈₀ para eaaa um dos três picos registados, o que sugere que todo o material era específico das NAs. A análise por SDS/PAGE das fracções de valor mais elevado ("peak") mostrou uma banda intensa na região expectável de aproximadamente 55 kd, embora se observasse uma pequena redução no peso moleeular de um número crescente de fracções (fig. 7A). O pico de 220 kd identificou-se como NAs tetraméricas por análise de ligação cruzada com SS³⁵, enquanto os dois picos que resultaram de uma menor dimensão molecular observaram-se serem respectivamente NAs diméricas e monoméricas, sendo a última forma de limitado significado quantitativo (fig. 7B). Pensa-se que devido à sua estrutura em forma de bastão ("rod-like structure") as NAs diméricas eluem ligeiramente abaixo do seu peso molecular actual em comparação com as NAs tetraméricas e monoméricas, das quais se pensa possuírem forma arredondada. Mais digno de nota foi que a actividade catalítica exigiu uma estrutura tetramérica de NAs totalmente organizada. É possível que a

formação tetramérica induza algumas alterações de conformação locais que são essenciais para a actividade enzimática.

No quadro I apresenta-se a diagrama de fluxo do processo de purificação.

4. Propriedades das NAs

A desnaturação mediante ebulição com SDS na presença de β -mercaptoetanol induziu a dissociação total de NAs em cadeias monoméricas com um peso molecular de 55 kd (Fig. 7A). Considerando a coloração pela prata dos geles de SDS/PAGE observaram-se as NAs tetraméricas e diméricas homogeneamente purificadas. As NAs monoméricas apresentaram-se com uma qualidade ligeiramente menor tendo em vista que eram visíveis alguns vestígios de contaminantes. Quando foram desnaturadas na ausência de um agente redutor, as NAs tetraméricas e diméricas migraram como cadeias diméricas de aproximadamente 110 kd (não apresentado). Esses resultados indicaram que os dímeros de NAs estão na verdade ligados internamente por pontes dissulfureto e podem ainda associar-se através de interacções não covalentes, por meio das quais se forma uma proteína tetramérica que corresponde à organização estrutural de NA natural.

Tem sido repetidamente relatado que as células de insecto geram um modelo de glicosilação de NA que difere quanto ao âmbito dos produzidos pelos mamíferos e por outras células superiores (Haich and Robbins, 1984; Butler and Hughes, 1981; Butters et al, 1981; Murada et al, 1980). Consequentemente investigou-se em comparação com a pNA natural a quantidade de hidratos de carbono ligados à NA associada às NAs recombinantes. Trataram-se amostras

representativas de proteínas com a enzima glicanase das NAs e analisaram-se posteriormente utilizando a técnica de SDS/PAGE (Fig. 9). A partir do deslocamento relativo das bandas pode concluir-se que a quantidade total de hidrato de carbono ligado à NA associada às NAs foi ligeiramente inferior comparada à associada à molécula natural (compara a fig. 9A e a 9B), uma observação que corresponde à realizada tendo em vista outras glicoproteínas que se exprimem nesse sistema (Kuroda et al., 1986; Domingo and Trowbridge, 1988; van Drunen Mittel et al., 1991). Também se estabeleceu ainda que as formas das NAs desnaturadas, enzimaticamente desglicosiladas migram com a mesma mobilidade electroforética sem restrição da sua estrutura oligomérica original, que confirma que primeiro se sintetizaram as NAs sob a forma de um polipéptido com um comprimento de cadeia uniforme (Fig. 9B, compara colunas 3, 5 e 9). O peso molecular da cadeia polipeptídica tratada com glicanase de NA avaliou-se em 47,5 kd, que corresponde a massa teórica de 47,717 a como calculado a partir da sequência prevista de aminoácidos. Suficientemente interessante, o grau de glicosilação da NA parece estar ligado a capacidade de formar tetrâmeros, tendo em vista que as bandas correspondem a NAs diméricas e monoméricas glicosiladas deslocadas ligeiramente mais rapidamente no gele do que a banda derivada das NAs tetraméricas glicosiladas (Fig. 9B, colunas 4 e 6 quando opostas à coluna 2; ver também fig. 7A). Na verdade tem sido sugerido que o hidrato de carbono ligado à NA, mais especialmente a cadeia de um oligossacarido que se liga a Asn200, pode exercer uma função na estabilização da estrutura tetramérica mediante acesso a uma interacção com uma subunidade adjacente (Varghese et al., 1983; Varghese e Colman, 1991).

Apenas a proteína tetramérica contribuiu para as propriedades catalíticas das NAs. As NAs tetraméricas isoladas exibiram um nível específico de actividade quase idêntico ao da pNA purificada (Quadros 1 e 2). A observação que as formas das NAs com uma disposição estrutural inferior são inactivas sob o ponto de vista enzimático, ainda que cada monómero tenha uma cavidade catalítica, possivelmente reflecte um papel fundamental relativamente às interacções quaternárias na funcionalidade da NA de v i r influência.

A fim de verificar as propriedades antigénicas das NAS, diluíram-se duas vezes consecutivamente amostras de proteínas de concentrações iguais e ensaiaram-se utilizando uma técnica de ELISA em sanduíche baseada na IgG anti-pNA policlonal (Fig. 10). As NAs tetraméricas forneceram uma curva de titulação que se dispõe de um modo idêntico ao gráfico de referência da pNA, o que indica que ambas possuem propriedades antigénicas idênticas ou muito similares. Apesar da ausência de actividade enzimática demonstrável, a actividade antigénica das NAs diméricas e monoméricas permaneceu realmente intacta, embora se possa observar uma pequena modificação ("shift") na antigenicidade. Essa pequena diferença na antigenicidade foi igualmente evidente no perfil de filtração em gele (Fig. 6) em que a razão actividade antigénica/A₄₂₀ do pico tetramérico foi ligeiramente superior. É possível que uma série de moléculas de anticorpos geradas contra a estrutura tetramérica nativa não fossem capazes de se ligarem eficientemente a NAs organizadas de um modo incompleto, por exemplo as que reconhecem áreas de contacto entre subunidades adjacentes. As alterações locais de conformação induzidas pela formação de tetrameros poderão igualmente originar uma série de subtis diferenças antigénicas.

Discussão

O principal objectivo da presente invenção foi a síntese do antígeno neuraminidase de vírus influenza sob a forma de uma proteína segregada, correctamente dobrada ("folded"), juntamente com o estabelecimento de uma técnica de purificação a fim de obter um produto homogéneo que se pode utilizar como agente de vacinação. A partir de um gene de NA da estirpe NA2 de vírus influenza A/Victoria/3/75 construiu-se um gene quimera em que se substituiu a região terminal original de NA que apresenta uma sequência de sinal associada a função âncora na membrana, pela fracção sequência 5' de um gene de HA de vírus influenza. A construção resultante que, devido ao péptido de sinal clivável derivado da Hk, codificou efectivamente uma NA segregável (NAs) foi posteriormente incorporada em um vektor de expressão de um baculovirus sob o regulamento de um poderoso promotor de poli-hedrina de transcrição. Concluída a infecção de células hospedeiras Sf9 de insectos segregaram-se de facto NAs no meio de cultura. Com base nos resultados de purificação avaliou-se o nível de expressão entre os valores de 6 a 8 mg/l. Demonstrou-se que no decurso da infecção pelo baculovirus a capacidade da célula hospedeira para processar proteínas por meio de secreção diminuiu dramaticamente (Jarvis e Summers, 1989). O sistema de produção como descrito é todavia aplicável a estudos de vacinação à escala laboratorial e considera-se apropriado para uma considerável graduação crescente de escala "scaling-up".

A purificação das NAs consistiu essencialmente em uma técnica de quatro fases que compreende um primeiro fraccionamento com sulfato de amónio, seguido por uma sucessão de três fases cromatográficas. Os rendimentos da

actividade enzimática avalia-se que se recuperaram mais ou menos 25% das NAs sob a forma de proteína purificada. Por meio de cromatografia sobre uma coluna para filtração em gele subfraccionaram-se as NAs em três populações de diferentes dimensões de moléculas que se identificaram por análise de ligação cruzada respectivamente como NAs tetraméricas, diméricas e monoméricas, em que a última forma se encontrava presente em apenas muito pequenas quantidades. Mediante avaliação a partir de SDS/PAGE seguida por coloração pela prata as duas formas principais NAs tetraméricas e diméricas, obtiveram-se em aproximadamente quantidades iguais e eram homogéneas.

A fim de avaliar as propriedades enzimáticas e imunológicas das NAs foi necessário isolar a NA natural como proteína de referência. Clivaram-se cabeças de NA de vírus X-47 A/Victoria/3/75 por tratamento com pronase e purificaram-se seguidamente por troca catiónica e cromatografia por filtração em gele. Após ligação cruzada confirmou-se que a pNA tinha retido a estrutura tetramérica da NA ligada a membrana intacta.

As propriedades catalíticas das NAs eram realmente marcantes visto que apenas a proteína tetramérica exibiu actividade enzimática. As NAs tetraméricas tinham uma actividade específico quase igual à da pNA. É improvável que as NAs diméricas e monoméricas fossem somente inactivas por serem proteínas desnaturadas, visto que durante a técnica de purificação essas formas também se fixaram rapidamente por cromatografia de afinidade com base no sítio de ligação ao substrato, o que sugere que a cavidade enzimática deve estar intacta sob o ponto de vista funcional, embora a transição catalítica seguinte aparentemente possa não ocorrer.

3 tratamento com glicanase ae NA revelou que no todo o teor em hidratos de carbono das NAs foi ligeiramente inferior em relação ao da pNA, uma propriedade também observada para outros glicoproteínas expressas nesse sistema (Kuroda et al., 1986; Domingo and Froehridge, 1988; van Brunen Litter et al., 1991). A hipoglicosilação foi aparentemente mais pronunciada relativamente às NAs diméricas e monoméricas.

Estudos estruturais por análise de difração dos raios X indicaram que a cadeia de hidratos de carbono ligada a ~~Asp104~~ estabelece um contacto íntimo com uma subunidade adjacente, o que sugere que a mesma poderá proporcionar interações adicionais para reforçar a estrutura quaternária (Varghese et al., 1983; Varghese and Colman, 1991).

A reactividade das NAs tetraméricas com a IgG policlonal produzida contra pNA purificada foi realmente total, o que indica que ambas as proteínas possuem propriedades antigénicas muito similares. No caso das NAs diméricas e monoméricas foi possível observar uma pequena modificação na antigenicidade. Disto pôde concluir-se que poderá ser possível isolar anticorpos monoclonais que se ligam à estrutura tetramérica da NA de vírus influenza. Provavelmente um tal anticorpo poderá ter acesso a uma interacção com determinantes superficiais derivados de subunidades adjacentes ou, em caso alternativo, o mesmo pode reconhecer epitopos formados após rearranjos conformacionais durante a formação do tetrâmero. Além disso, diferenças na composição dos hidratos de carbono poderiam igualmente modular as propriedades antigénicas.

EXEMPLO 2

SECREÇÃO DE NEURAMINIDASE RECOMBINANTE PELA PICHIA PASTORIS

Introdução

A fim de investigar se uma levedura se pode utilizar como célula hospedeira além das células de insecto para a produção de neuraminidase recombinante de vírus influenza, construiu-se um vector de expressão que continha a parte enzimática do "chapéu" ("hat") da neuraminidase.

Materiais e método

1. vector e hospedeiro.

Para construir a cassette de expressão utilizou-se o plasmídeo pPIC9 (Invitrogen,!) de Pichia pastoris. Esse plasmídeo compreende uma origem de replicação, um gene de resistência a ampicilina, regiões promotoras e terminadoras do gene álcool oxidase 1 (AOX1) aplicável de P. pastoris, o pré-pró-sinal de secreção ao factor α de Saccharomyces cerevisiae e o marcador HIS4 de P. pastoris.

Como hospedeiro utilizou-se a levedura metilotrófica Pichia pastoris (Invitrogen).

2. Construção da cassette de expressão

Mediante mutagénese sítio-dirigida introduziu-se um sítio de restrição StuI na sequência de ADNc de um gene de neuraminidase de A/Victoria/3/75. O sítio de restrição estava localizado na posição de Pro79. Utilizando esse sítio de

restrição a "sequência chapéu" imunogénica do gene da neuraminidase que contém o centro activo sob o ponto de vista enzimático pôde isolar-se como um fragmento *Sma*I/*Fln*dIII e clonar-se no sítio de restrição *Sna*BI do plasmídeo pPIC9 da *P.pastoris*. A Fig. 15 mostra um diagrama do plasmídeo pPIC9. A Fig. 16 representa uma vista da região de fusão entre a pré-pró-sequência de sinal e a neuraminidase recombinante. O pré-peptídeo é clivado no compartimento final do complexo de Golgi por meio da protease endógena KEX2. Extrai-se o dipéptido (Glu-Ala), utilizando dipeptidil aminopeptidase do tipo STE13. O resíduo extra de tirosina não é clivado e permanece presente no N-terminal da neuraminidase recombinante, mas não é necessário.

Linearizou-se o plasmídeo resultante na posição do marcador de selecção *HIS4* por meio de uma enzima de digestão *Sal*I e transformou-se posteriormente no interior de protoplastos GTS115 (*his4*) da levedura *P. pastoris* na presença de polietilenoglicol. O ADN isolado a partir dos transformantes submeteu-se a análise de Southern blot. Essa análise mostrou que o vector de expressão integrou-se por recombinação homóloga na posição do locus *his4* interno (embora deficiente). A maioria dos transformantes possui 1 a 2 cópias do plasmídeo mas os transformantes com uma elevada capacidade de secreção observou-se que possuíam cópias múltiplas que se integraram direccionadas da cabeça para a cauda no genoma hospedeiro em a estrutura em tandem. 3 número de cópias aumentou para 25 por transformante.

3. Expressão da neuraminidase

Os transformantes pré-desenvolveram-se em meio de glicérol mínimo tamponado (pH 6,0) e transferiram-se após 48

horas para um meio mínimo tamponado que contém 0,5% de metanol. Esse metanol induziu o promotor álcool oxidase 1 e expressou o "chaperon" ("hsc70") da neuraminidase. Utilizando a análise de Northern conhecida por se procedeu-se à estimativa na célula da quantidade de ARNm da neuraminidase. Essa análise mostrou que teve lugar uma muito eficiente indução.

Uma análise do sobrenadante celular pelo método de Western mostrou que uma neuraminidase recombinante com um peso molecular aproximado de 70 kDa foi aí segregada (ver fig. 17).

O produto segregado foi desglicosilado com PNGase F. Esse processo produziu um "núcleo" como produto com a dimensão aguardada de 43 kDa. Dependendo do número de cópias observou-se que o rendimento no meio da neuraminidase recombinante oscilou entre 1 e 1,5 mg/l.

EXEMPLO 3

IMUNIZAÇÃO

Materiais e métodos

1. Animais

Murghões Balb/c fêmeas cruzados ("inbred") (CCK Mol, Bélgica) tinham a idade de 8 semanas no início do procedimento de imunização. Nas experiências de imunização passiva os murghões receptores tinham a idade de 12 semanas. Acomodaram-se os murghões em grupos de três animais por

gaiola (410 cm²) e foi-lhes concedido acesso ad libitum aos alimentos e à água.

2. Virus

As estirpes de vírus influenza , disponibilizadas por Dr. A Douglas and Dr. J. Skehel (MCR Laboratories, Mill Hill, London). Os vírus laboratoriais X-31 e X-47 possuem uma composição antigénica H3N2 e derivam de rearranjos genéticos provenientes de A/PR/8/34 (H1N1) com respectivamente A/Aichi/2/68 (H3N2) e A/Victoria/3/75 (H3N2). As duas descendências virais adaptaram-se ambas mediante uma série de passagens através dos pulmões de tal modo que provocaram a morte dos murganhos.

3. NA (NAs) recombinante segregavel

Administrou-se NA de vírus influenza A/Victoria/3/75 sob a forma de proteína recombinante purificada produzida por um sistema de expressão de baculovírus em células de insecto, como descrito no Exemplo 1. A preparação de NAs purificadas que se utilizaram nas experiências de imunização descritas na presente memória descritiva continha uma mistura de moléculas tetraméricas e diméricas em uma solução salina tamponada com um fosfato (PBS).

4. Adjuvantes

Com base em um estudo de imunização coa HA recombinante de vírus de influenza que se realizou no nosso próprio laboratório escolheram-se adjuvantes apropriados. De acordo com as instruções do fabricante (Ribi Immunochem Research) acondicionaram-se em frascos com 1^{ml} adjuvante Ribi (com

monofosfaril-lipido A (MPLA), tre-halese-6,6-dimicolato (TDM), esqualeno e Tween 80 e *Salmonella typhimurium*. O dipéptido muramilo (MDP) foi fornecido por Sigma Chemical Co..

5. Protocolo de imunização

Injectaram-se murganhos por via subcutânea a intervalos de três sema-as com três doses com o volume de 200 µl de 1 µg de NAs cada. Tendo em vista a primeira imunização emulsionaram-se as NAs em metade da quantidade de uma dose normal para murganhos de Ribi (correspondente a 25 µg de MPLA, 25 µg de TDM, 2 µl de esqualeno e 0,1% de Tween 80). Administraram-se reforços ("booster") sob a forma de injectáveis adicionando 25 µg de MPLA e 25 µg de MCP as NAs. Aos animais de controlo administrou-se adjuvante dissolvido em PBS.

6. Imunização passiva

Três semanas após a administração de uma terceira imunização colheu-se sangue do murganho dador por punção cardíaca e reuniram-se preparações séricas dos murganhos correspondentemente tratados. Ao murganho receptor administrou-se uma única injeção intraperitoneal de 400 µl de soro imunitário ou de controlo.

7. Estimulação ("challenge") pelo vírus influenza

Sob a acção de um anestésico etéreo suve inocularam-se os murganhos por via intranasal com 20 µl de vírus especificado três semanas após a última injeção de reforço ("booster") ou um dia após a imunização passiva. Em seguida

acompanhou-se atentamente a evolução da infecção determinando a temperatura rectal e o peso corporal durante um período de pós-inoculação de 10 dias.

8. Processo serológico

Um dia antes do início do procedimento de vacinação (soro pré-imunitário) e duas semanas após cada imunização colheram-se amostras de sangue da artéria aa cauda. Realizando técnicas ELISA analisaram-se amostras séricas individuais quanto aos anticorpos específicos da NA. Revestiram-se placas de microtitulação (Nunc Maxisorp) com ~~NA~~ purificadas (50 ng/cavidade) e diluíram-se os soros em grupos de 1/5. A ligação de anticorpos específicos quantificou-se adicionando anticorpos anti-IgG murina de coelho conjugados com fosfatase alcalina (Sigma Chemical Co.), seguindo-se a incubação das placas com solução substrato de p-nitrofenol (Sigma Chemical Yo.). Em um leitor de placas de microtitulação determinaram-se os valores da DO a 435 nm. O título de anticorpos contra NA exprimiu-se sob a forma de recíproco da diluição sérica como números logarítmicos ("logs") resultantes de uma absorção de 0,05 mais elevada do que a das cavidades de controlo (tratadas com soro pré-imunitário).

Resultados

1. Desenho do estudo

De acordo com o protocolo de imunização descrito antes vacinaram-se com NAs três grupos de 12 surranhos. Paralelamente tratou-se um número igual de surranhos controlo com PBS. Grupos pareados de surranhos vacinados e de controlo

estimularam-se ("were challenged") posteriormente com vírus X-47 ou X-31 adaptados a murganhos. Em um caso alternativo serviram como doadores séricos para experiências massivas de imunização.

2. Respostas serológicas

A resposta de anticorpos contra NAs foi seguida por ELISA no soro de uma seleção ao acaso de 12 animais vacinados e de 12 animais de controlo (1 animal de cada gaiola) (fig. 11). A utilização da técnica de imunização contra NAs em murganhos causou um aumento estacionário no soro de anticorpos contra NAs. A primeira injeção de reforço ("booster") causou um aumento das quantidades dos anticorpos contra NAs de aproximadamente três "logs", enquanto uma segunda injeção de reforço resultou mas em um outro aumento do título dos anticorpos contra as NAs aproximadamente quintuplo. Nos murganhos de controlo uma única administração do adjuvante não resultou na produção significativa de anticorpos específicos que reagiram com as NAs.

3. Protecção homovariante com NAs

Três semanas após a vacinação examinaram-se murganhos vacinados e de controlo quanto a imunidade mediante administração de 20 D₅₀ do vírus X-47 homovariante NA (fig. 12). Todos os murganhos de controlo adoeceram gravemente, como verificado avaliando uma diminuição na temperatura corporal e perda de peso corporal. No quarto dia após a injeção contaram-se as primeiras vítimas tendo morrido todos os controlos no período dos 9 dias de inoculação. Em contraste os parâmetros clínicos nos vacinados contra as NAs diminuíram

apenas transitoriamente e até um grau muito modesto. Todos os animais vacinados sobreviveram à infecção.

Investigou-se também se poder-se-á conseguir o mesmo nível de imunidade protectora e uma terceira imunização, possivelmente por meio de compensação utilizando doses mais elevadas de NAs e/ou de adjuvante. Esses ensaios tinham basicamente o mesmo desenho experimental. Apesar dos murganhos imunizados desse modo exibirem geralmente uma boa resistência, alguns casos individuais adoeceram gravemente e uma série de vacinados morreram ocasionalmente, apesar da percentagem de sobreviventes ser raramente inferior a 80%. No entanto o nível da imunidade protectora alcançada através de três imunizações verificou-se ser superior em toda a linha.

4. Protecção heterovariante com NAs

Examinaram-se grupos paralelos de murganhos vacinados e de controlo quanto a imunidade com 20 DL_{50} do vírus X-31 heterovariante NA que apresenta uma NA que esta separada das NAs derivadas de A/Victoria/3/75 por 7 anos de "drift" antigénico (variações antigénicas minor que geralmente são mutações pontuais) (fig. 13). Como observado igualmente para estudo de imunização contra X-47, as consequências da infecção no grupo de controlo foram dramáticas. Os animais de controlo começaram logo a morrer 5 dias após a infecção. A mortalidade atingiu o máximo no 8º dia, depois do que restou apenas um sobrevivente. Murganhos imunizados por meio de NAs exibiram 100% de sobreviventes após a infecção pela heterovariante normalmente letal. Exactamente como no estudo de imunidade pela homovariante os vacinados foram capazes de seguir a seguir capazes de manter a sua temperatura corporal em níveis razoavelmente normais. A perda de peso corporal foi um

pouco mais pronunciado mas todos os murganhos começaram a recuperar a partir do 6º dia.

5. Imunidade protectora pode obter-se por transferência passiva de soro imunitario contra NAs

A fim de determinar se foram os mecanismos de defesa humoral os mecanismos principalmente responsáveis por provocarem imunidade protectora, avaliou-se a protecção dos animais por imunização passiva. Com este objectivo imunizaram-se murganhos dádres de acordo com uma técnica padrão. A colheita de sangue nesses animais proporcionou uma media de aproximadamente 400 µl de soro por indivíduo. Após reunir ("pooling") por um lado o soro controlo e por outro o soro imunitário injectaram-se os murganhos receptores por via intraperitoneal com uma única dose de 400 µl de soro. Antes da estimulação ("challenge") com 20 ~~ML~~ de vírus X-47 adaptado interpolou-se um período de 24 horas para permitir a propagação sistemática de moléculas anticorpo nos murganhos. Enquanto animais aos quais se tinha administrado soro controlo desenvolveram posteriormente hipotermia aguda e sofreram grave perda de peso conduzindo em última análise à morte, a administração de soro imunitário contra NAs protegeu os murganhos até essencialmente o mesmo grau como se demonstrou relativamente aos animais activamente imunizados (fig.14). Consequentemente pode concluir-se que os anticorpos pré-circulantes contra a NA são capazes de e suficientes para proporcionar protecção total.

Discussão

Durante muito tempo estudou-se a imunidade contra vírus influenza quase exclusivamente como função de um anticorpo

contra HA, ao mesmo tempo que se ignorou especialmente a importância da NA no contributo para a imunidade. A situação teve origem em parte na observação que apenas anticorpos capazes de se ligarem a HA tinham a capacidade de neutralizar directamente partículas virais (Hirst, 1942; Davenport et al., 1964; Kida et al., 1983), enquanto anticorpos contra a NA não pareciam serem capazes de impedir uma infecção primária sobre uma grande sequência de concentrações (Jahiel and Kilbourne, 1966; Kilbourne et al., 1968; Johansson, 1989). Essa tolerância provavelmente reflecte a última função desempenhada pelas NAs no ciclo de vida de um vírus influenza impedindo os vírus recém-formados de se agregarem à superfície da célula infectada (Colman and Ward, 1985; Brown and Laver, 1968). Além disso observou-se que a NA, em contraste com a HA, era o composto menos importante do envelope influenza, um facto que poderá contribuir ainda para o efeito de não neutralização dos anticorpos contra a HA (Schulman et al., 1968). Essa diferença na presença molar afecta igualmente as respostas relativas do anticorpo contra antigénios individuais. Repetida superapresentação de HA em relação a NA devido a confrontações sucessivas com o vírus influenza completo poderá resultar na supressão da produção de anticorpos contra NA, provavelmente como uma consequência da ajuda enfraquecida de células T específicas de NA (Kilbourne, 1976; Johansson et al., 1987; Kilbourne et al., 1987; Johansson et al., 1987). A fim de estudar a imunidade protectora contra NA é portanto necessário desenvolver sistemas em que se elimina a interferência na neutralização de anticorpos contra R e evita-se a inibição da resposta imunitária a NA através da competição pelos antigénios HA e NA. Abordagens clássicas foram ou baseadas no isolamento do componente NA natural (Schulman et al., 1968; Johansson and ... , 1990; Callaghan et al., 1984) ou baseadas no caso

alternativo da administração em associação de uma série definida de estirpes de influenza com antigénios HA e NA diferentes sob o ponto de vista seriológico (Rott et al., 1974; Kilbourne, 1976). Contudo os resultados descritos na presente memória descritiva demonstram expressamente uma imunização protectora por meio de uma proteína NA recombinante purificada. Um gene de NA de vírus A/Victória/3/75 (H3N2) transformou-se em um gene que codifica uma proteína segregável (NAs) por meio da substituição da região que codifica a âncora de membrana pela seqüência de sinal de um gene de hemaglutinina de vírus influenza (ver exemplo 1).

Técnicas *in vitro* estabeleceram já que anticorpos contra NA podem suprimir de um modo eficiente o rendimento de vírus que se desenvolveram mediante inibição da libertação e da propagação de partículas virais (Jahiel and Kilbourne, 1968; Kilbourne et al., 1968). Retiraram-se conclusões similares de animais imunizados com NA avaliando títulos virais reduzidos nos pulmões e desenvolvimento reduzido de lesões pulmonares (11, 12, 13). Apesar de se ter dedicado considerável atenção ao efeito da imunidade contra a NA respeitante à replicação viral nos pulmões, era questionável se a imunização com proteína pura de NA poderia prevenir os sintomas clínicos da doença ou poderia melhorar as hipóteses de sobrevivência após uma infecção potencialmente letal pelo vírus influenza. A essa questão não se apresentou ainda qualquer resposta satisfatória. Os resultados apresentados na presente memória descritiva demonstram contudo nitidamente que se pode conseguir protecção total contra uma infecção normalmente letal provocada pelo vírus influenza mediante imunização com NAs recombinantes puras, em que se exclui qualquer contribuição possível a partir de mecanismos imunitários

anapésticos anti-NA ou efeitos isunitários sobre a memória mediada por células contra antígenos de proteínas virais internas conservadas.

Nas experiências apresentadas na presente memória descritiva, imunizaram-se murganhos com três doses de 1 µg de NAs que se administraram a intervalos de três semanas. Os animais vacinados foram capazes de sobreviver completamente a uma infecção letal de vírus influenza, ~~em~~ que o vírus expressou NA homo- ou heterovariante. Devido à elevada dose do vírus da infecção foi muito marcante como animais apropriadamente imunizados permaneceram sem sintomas clínicos da doença como indicado por alterações na temperatura e no peso corporal. É importante notar que os adjuvantes que se administraram em associação com NAs possuem todas as propriedades capazes de provocar uma reacção e especialmente uma reacção imunológica ("reactogenic properties"), de forma que o processo de imunização descrito na presente memória descritiva aplica-se directamente na vacinação humana. As vacinas de acordo com a presente invenção são além do mais relevantes para outros mamíferos e para aves.

A transferência passiva de soro de murganhos que foram imunizados com NAs para murganhos receptores não tratados deu origem a iguais níveis de protecção, o que indica que o efeito protector da imunização contra NAs se pode explicar na base de anticorpos circulantes contra as mesmas NAs.

Quanto à protecção heterovariante descrita na presente memória descritiva, é importante considerar a relação estrutural entre o antígeno NA da vacina contra A/Victoria/3/75 e a NA do A/Aichi/2/68 que está presente na variante X-31 da infecção. Infelizmente, não existem dados

sobre a sequência respeitante à NA do vírus A/Aichi/2/68 (H3N2), embora se possa fazer contudo uma comparação com a sequência da NA do A/NT/60/68(H3N2) (Bentley and Brownlee, 1982), isolada no mesmo ano que a estirpe Aichi. Examinando atentamente a região da cabeça de ambas as variantes de NA, as substituições nos aminoácidos observam-se em 28 posições, estando a maioria localizada sobre a superfície da molécula.

É provável que a vacina de acordo com a presente invenção também possa proporcionar protecção contra variantes de "drift" eliminadas ainda em maior quantidade. Além disso é concebível que mediante modificação genética de um gene da NA se possam arranjar variações na sua estrutura antigénica. Isso pela presente invenção torna-se possível por exemplo para preparar associações ("cocktails") de versões diferentes de NA, por meio das quais se pode obter uma prolongada protecção contra diferentes estirpes de vírus influenza.

Figuras

A Figura 1 mostra a estratégia para a construção de um gene segregável de NA e a sua integração em um vector de transporte de baculovírus. Indicam-se apenas os sítios de restrição relevantes. As linhas finas contínuas ("single lines") representam sequências bacterianas plasmidiais, enquanto as zonas mais densas indicam sequências específicas de HA [contínuas ("full")] ou específicas de NA [tracejado ("dotted")]. A sequência de sinal de HA está indicada com um sombreado a traço simples ("single hatching"). A sequência de sinal/sequência de âncora de membrana da NA está indicada com um sombreado a traço duplo.

A Figura 2 mostra a sequência nucleotídica da linha de produção ("string") positiva de ADNc e a sequência de aminoácidos das regiões flancadoras do sítio de ligação entre o péptido de sinal de HA e a NA com a sua âncora de membrana de NA removida.

A Figura 2A mostra HA não processada com, detalhe, a sítio de restrição da peptidase de sinal entre Ala₁₆ e Glu₁₇ (linha vertical tracejada). O segmento terminal da NA utilizado para a secreção das NAs designa-se com um seta.

Na Figura 29 apresenta-se um detalhe da região "stalk" ("região do pedúnculo") da NA. A sequência truncada envolvida na construção de NAs designa-se com uma seta.

Na Figura 2C mostra-se como se constrói a sequência de NAs a partir de A e B. Apresentada na presente figura em detalhe encontra-se a região de fusão entre as sequências específicas de HA e de MA. As NAs provavelmente começam com os quatro aminoácidos da HA madura no terminal da NA seguidos por um códon mutado (sublinhado com uma linha tracejada).

Na Figura 3 apresentam-se as análises em SDS/PAGE da pNA purificada. A Figura 3A diz respeito a análises de amostras de proteínas colhidas em fases diferentes durante a purificação da pNA. A coluna 1 mostra as proteínas marcadoras; a coluna 2 o material bruto da pNA (1 µg; bandas da pNA inferiores aos níveis detectáveis); a coluna 3 mostra um "pool" ("conjunto") de S-Sepharose (1 µg); a coluna 4 o "pool" de Superdex 200 (1 µg). Na Figura 3B pode observar-se um gel em gradiente de 5,0% até 7,5% de 1 µg de pNA ligada em rede ("cross-linked") por meio de BS³. A coluna 1 mostra as proteínas marcadoras; a coluna 2 a pNA após o cruzamento em

rede ("cross-linked"). Bandas extra aparecem a aproximadamente 105 kd (dímero), aproximadamente 160 kd (trímero) e aproximadamente 210 kd (tetramero).

A Figura 4 mostra a progressão temporal da actividade específica (□) que se detecta no meio de cultura, como derivada dos níveis da actividade enzimática (○) e da concentração total de proteínas (◇), após inoculação de células Sf9 com baculovírus recombinante.

Na Figura 5 apresenta-se a cromatografia de troca aniónica sobre Q-Sepharose. Após dissolução e diálise do precipitado pelo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20 a 60%), colocou-se a solução (97,5 mg de proteína, 117 000 U) sobre uma coluna de Q-Sepharose. Antes de se realizar a eluição com um gradiente linear de NaCl (---) até uma concentração de 250 mM que se adicionaram ao tampão inicial, eliminou-se por lavagem o material não ligado. A concentração da proteína do eluato foi seguida por determinação a λ_{280} (-). Colheram-se fracções de 2,5 ml e analisaram-se quanto a actividade enzimática (○) e quanto à antigenicidade em um ensaio ELISA (A).

A Figura 6 mostra a filtração em gel de NAs sobre Superdex 200. O eluato, após a separação do ácido N-(p-amino-fenil)oxâmico da agarose (2,63 mg proteína, 49 100 U), concentrou-se até 2,3 ml e cromatografou-se posteriormente em fracções com o volume de amostra de 1,5 ml sobre uma coluna Superdex 200 em que o método se realizou à velocidade dos fluxos superficiais de 10 ml/hora. A λ_{280} foi continuamente seguida (-). Analisaram-se fracções individuais (1,0 ml) quanto à actividade enzimática (○) bem como à actividade antigénica (Δ). As setas indicam os volumes de eluição das

proteínas de calibração (ver texto): 443 kd (1), 200 kd (2), 130 kd (3), 67 kd (4) e 29 kd (5).

A Figura 7 mostra a análise em SDS/PAGE de NAs purificadas. Cada coluna corresponde ao número da fracção específica da filtração em gele Superdex 200. A Figura 7A mostra o modelo de SDS/PAGE após desnaturação de amostras de 10 μ l (adicionou-se β -mercaptoetanol). As colunas A e B indicam proteínas marcadoras. Na Figura 7B as amostras de proteínas ligaram-se em rede com BS³ e separaram-se posteriormente por electroforese sobre um gele em gradiente de 5,0% até 7,5% na presença de SDS mas sob condições não redutoras. As fracções 57 e 68 mostram um volume das amostras de 10 μ l; as fracções 70 a 77 mostram um volume das amostras de 25 μ l. As NAs tetraméricas originam bandas a aproximadamente 220 kd (tetrâmero) e a aproximadamente 110 kd (dímero). As NAs diméricas e monoméricas permanecem visíveis sob a forma de bandas de aproximadamente 110kd e de aproximadamente 55 kd respectivamente.

Apresentados na Figura 8 estão os resultados de SDS/PAGE de amostras de proteínas colhidas durante diferentes fases da técnica de purificação das NAs. A coluna 1 mostra as proteínas marcadoras; a coluna 2 o meio bruto (5 μ g); a coluna 3 o precipitado (5 μ g) pelo $(NH_4)_2SO_4$ (20 a 60)%; a coluna 4 o "pool" (2,5 μ g) da Q-Sepharose; a coluna 5 o "pool" após a separação (1 μ g) entre o ácido N-(p-aminófenil)oxâmico e a agarose; a coluna 6 o "pool" das fracções das NAs tetraméricas e diméricas após filtração (1 μ g) em gele Superdex 200.

A Figura 9 mostra a análise comparativa do teor em hidratos de carbono ligados à pNA e às NAs, como avaliado a

partir da digestão pela NA-glicanase e de SDS/PAGE. A enzima NA-glicanase é visível como uma banda de aproximadamente 35 kd. Na Figura 9A a coluna 1 mostra proteínas marcadoras; a coluna 2 pNA não digerida (1µg); a coluna 3 pNA (1µg) tratada com NA-glicanase. Na Figura 9B as colunas 1 e 8 mostram as proteínas marcadoras; a coluna 2 as NAs tetraméricas não digeridas; a coluna 3 as NAs tetraméricas tratadas com NA-glicanase; a coluna 4 NAs diméricas não digeridas; a coluna 5 NAs diméricas tratadas com Na-glicanase; a coluna 6 NAs monoméricas não digeridas; a coluna 7 NAs monoméricas tratadas com NA-glicanase.

A Figura 10 ilustra a identidade aproximada antigénica entre NAs e pNA. Levaram-se amostras de pNA e de NAs até concentrações iguais de proteína e diluíram-se deprecis em série de 1 para 2 em um ensaio ELISA. A figura mostra a curva sigmóide da antigenicidade avaliada relativamente a antígenios específicos. A pNA referência é indicada por o; as NAs tetraméricas por ◊; as NAs diméricas por ◻ e as NAs monoméricas por A.

A Figura 11 ilustra a resposta dos antirorpos contra as NAs. Catorze dias após cada uma das imunizações (designadas por meio de uma seta), colheram-se amostras de sangue dos murganhos e avaliou-se a presença de anticorpos contra as NAs em um ensaio ELISA (ver texto relativamente aos detalhes experimentais). Barras sombreadas a cheio e barras sombreadas a traço representam os títulos séricos médios [\pm D.F. (\pm S.D.)] de animais vacinados e de controlo respectivamente. A Figura 12 mostra a protecção homovariante. Estimularam-se vacinados [--- em (A); ▼ em (B) e (C)] e controlos [- em (A); * em (B) e (C)] com 20 DL₅₀ de homovariante, vírus X-47 adaptado murganho. Acompanhou-se a evolução da infecção

registando a taxa de sobrevivência (A) e determinando a temperatura rectal (B) e o peso corporal (C) dos murganhos (ver texto relativamente aos detalhes experimentais). Os "data points" ("Pontos de dados" que em estatística significa uma única determinação representada) transmitem valores médios \pm S.D. (\pm D.P.).

A Figura 13 ilustra a protecção heterovariante. Estimularam-se vacinados [---em (A); **V** em (B) e (C)] e controlos [- em (A); ***** em (B) e (C)] com 20 DL₅₀ do vírus X-31 heterovariante, adaptado a murganhos. Acompanhou-se a evolução da infecção registando a taxa de sobrevivência (A) e determinando a temperatura rectal (B) e o peso corporal (C) dos murganhos (ver texto relativamente aos detalhes experimentais). Os "data points" transmitem valores médios \pm 2S.D. (\pm 2D.P.).

A Figura 14 mostra a protecção por imunização passiva. Submeteram-se grupos de murganhos a imunização passiva utilizando injeção intraperitoneal de soro imunitário contra X-31 [---em (A); **V** em (B) e (C)] ou de soro controlo [- em (A); ***** em (B) e (C)]. Vinte e quatro horas mais tarde administraram-se aos mesmos grupos uma estimulação de 20 DL₅₀ de vírus X-47 adaptado a murganhos (ver texto relativamente aos detalhes experimentais). A taxa de sobrevivência, as temperaturas rectais e o peso corporal estão apresentados respectivamente em (A), (B) e (C). Os "data points" indicam o valor médio \pm S.D. (\pm D.P.).

A Figura 15 mostra um diagrama do plasmídeo pR109 que contém ainda as sequências do promotor *lacZ* e do terminador, o marcador *hisA* da *E. coli* e o pré-sinal de secreção

de um gene do factor *a* de Saccharomyces cerevisiae. Atrás do sinal de secreção localiza-se um sítio de clivagem múltiplo.

A Figura 16 apresenta um estudo da região de fusão entre o pré-pró-sinal de secreção e a porção recombinante do "chapéu" ("hat") da neuraminidase. "KEX2" indica onde o pró-peptídeo é cindido o compartimento final do complexo de Golgi pela protease endógena KEX-2. O dipéptido (Glu-Ala)₂ é removida por uma dipeptidil aminopeptidase do tipo STE 13. O resto tirosina não provém da neuraminidase mas não é removido. A prolina seguinte corresponde à posição 79 da neuraminidase do X-47.

A Figura 17 representa um ensaio de Western blot em 12,5% de gele de poliacrilamida com 5 amostras de transformantes individuais em um meio. A coluna 1 contém a amostra de uma estirpe de S. pastoris não transformada em um meio. Em cada coluna coloca-se o material proteico de 1 ml do meio de cultura precipitado por TCA.

Quadro 1: Purificação da pNA

	Volume	Proteína	Atividade total	Recuperação	Atividade específica	Purificação
Extrato	51	29	0	1	0/29	0/29
Material extraído de pH 8	11,8	22,3	24 000	100	2 000	1,2
D-Sepharose	25,1	2,28	24 000	100	24 000	10,0
Superdex 200	15,3	0,74	24 000	100	24 000	10,0

Este quadro diz respeito a uma única experiência de purificação característica (ver texto para mais detalhes). O volume após filtração em gele Superdex 200 representa um "pool" de dois ensaios cromatográficos.

Quadro 2: Purificação de NA's produzidas por células 919 de insecto

Fase	Volúme	Proteína	Atividade total	Rendimento	Atividade específica	Purificação
Extrato bruto	400	100	144 000	100	360	1,0
Fracção purificada por Superdex 200	10,1	31,3	137 000	95,1	1 350	3,8
Q-Sepharose	10,1	7,37	70 000	48,6	3 015	8,4
Acido N-glycosaminidase	10,1	7,43	68 000	47,2	3 075	8,5
Petrocare Superdex 200	5,0	0,99	34 000	23,6	34 750	96
Biotin	5,0	0,39	-	-	-	-
Biotin	5,0	0,33	-	-	-	-

Este quadro contém uma única experiência de purificação característica (ver texto para mais detalhes). Os volumes especificados após filtração em Superdex 200 mostram "pools" de fracções de NAs colhidas em dois ensaios cromatográficos.

REFERÊNCIAS

- Eentley, D.R. en Brownlee, G.G. Sequence of the N2 neuraminidase from influenza virus A/NT/40/68. Nucl. Acids Res. 10, 5033 (1982)
- Blok, J., Air, G. M., Laver, W. G., Ward, C. W., Lilley, G. G., Woods, E. F., Roxburgh, C. M. & Inglis, A. S. (1982) Studies on the size, chemical composition and partial sequence of the neuraminidase (NA) from type A influenza virus show that the N-terminal region of the NA Fs not processed and serves to anchor the NA in the viral membrane, virology 119, 109-121.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72, 248-254.

Bucher, D. J. (1977) Purification of neuraminidase from influenza viruses by affinity chromatography, *Biochim. Biophys. Acta* 482, 393-399.

Bucher, D. J. & Kilbourne, E. D. (1972) A2 (N2) neuraminidase of the X-7 influenza virus recombinant: Determination of molecular size and subunit composition of the active unit, *J. Virol.* 10, 60-66.

Burnet, F. M., Stone, J. D. (1947) The receptor destroying enzyme of *V. cholerae*, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 25, 227-233.

Butters, S. D. & Hughes, R. C. (1981) Isolation and characterisation of mosquito cell membrane glycoproteins, *Biochim. Biophys. Acta* 640, 655-671.

Butters, T. D., Hughes, R. C. & Vischer, P. (1981) Steps in the biosynthesis of mosquito cell membrane glycoproteins and the effects of tunicamycin, *Biochim. Biophys. Acta* 640, 672-686.

Chong, A. K. J., Pegg, M. S. & Itzstein, M. (1991) Influenza virus sialidase: effect of calcium on steady-state kinetic parameters, *Biochim. Biophys. Acta* 1077, 65-71.

Colman, P. M., Varghese, J. N. & Laver, W. G. (1983) Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase, *Nature* 303, 41-44.

Colman, P. M. & Ward, C. W. (1985) Structure and diversity of influenza neuraminidase, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 114, 177-235.

Cuatrecasas, F. & Illiano, G. (1971) Purification of neuraminidases from *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens* and influenza virus by affinity chromatography, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 178-184.

, N. J. (1971) Dependence of the activity of an influenza virus neuraminidase upon Ca^{++} , *J. Gen. Virol.* 13, 481-483.

Domingo, D. L. & Trowbridge, S. I. (1988) Characterisation of the human transferrin receptor produced in a baculovirus expression system, *J. Biol. Chem.* 263, 13386-13392.

Edmond, J. D., Johnston, R. G., Kidd, D., Rylance, H. J. & Sommerville, R. G. (1966) The inhibition of neuraminidase and antiviral action, *Br. J. Pharmacol.* 27, 415-421.

Fields, S., Winter, G. & Brownlee, G. G. (1981) Structure of the neuraminidase in human influenza virus A/PR/8/34, *Nature (Lond.)* 290, 213-217.

Gallagher, M., Bucher, E. J., Dourmaçhkin, R., Davis, J. E., Rosenn, G. & Kilbourne, E. D. (1984) Isolation of immunogenic neuraminidases of human influenza viruses by a combination of genetic and biochemical procedures, *J. Clin. Microbiol.* 20, 89-93.

Gottschalk, A. (1957) The specific enzyme of influenza virus and *Vibrio cholerae*, *Biochim. Biophys. Acta* 23, 645-648.

Griffin, J. A. & Compans, R. W. (1979) Effect of cytochalasin B on the maturation of enveloped viruses, *J. Exp. Med.* 150, 379-391.

Griffin, J. A., Szpak, S. & Compans, A. W. (1983) Effects of hexose starvation and the role of sialic acid in influenza virus release, *Virology* 125, 324-334.

Hirst, G. K. (1942) The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination, *J. Exp. Med.* 75, 47-64.

Hsieh, P. & Robbins, P. W. (1984) Regulation of asparagine-linked oligosaccharide processing, *J. Biol. Chem.* 259, 2375-2382.

Jahiel, R. L. & Kilbourne, E. D. (1966) Reduction in plaque size and reduction in plaque number as differing indices of influenza virus-antibody reaction, *J. Bacteriol.* 92, 1521-1534.

Jarvis, D. L., Fleming, J.-A. G. W., Kovacs, G. R., Summers, M. i. & Guarino, L. A. (1990) Use of early baculovirus promoters for continuous expression and efficient processing of foreign gene products in stably transformed Lepidopteran cells, *Bio/Technology* 8, 950-955.

Jarvis, D. L. & Summers, M. D. (1989) Glycosylation and secretion of human tissue plasminogen activator in recombinant baculovirus infected insect cells, *Mol. Cell. Biol.* 9, 214-223.

Johansson, B. E., Moran, T. M. & Kilbourne, E. D. (1987) Antigen-presenting B cells and helper T cells cooperatively mediate intravirionic antigenic competition between influenza A virus surface glycoproteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6869-6873.

Johansson, B. E., Bucher, D. J. & Kilbourne, E. D. (1989) Purified influenza virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection, *J. virol.* 63, 1239-1 246.

Johansson, B. E. & Kilbourne, E. D. (1990) comparative long-term effects in a mouse model system of influenza whole virus and purified neuraminidase vaccines followed by sequential infections, *J. Infect. Dis.* 162, 800-808

Johansson, B. E., Grajower, B. & Kilbourne, E. D. (1993) Infection-permissive immunization with influenza virus neuraminidase prevents weight loss in infected mice, *vaccine* 11, 1037-1041

Kendal, A. P., Pereira, M. S. & Skehel, J. J. (1982) Concepts and Procedures for Laboratory-based Influenza Surveillance, World Health Organization Collaborating Centers for Reference and Research on Influenza.

Kida, H., Webster, R. B. & Yanagawa, R. (1983) Inhibition of virus-induced hemolysis with monoclonal antibodies to different antigenic areas on the hemagglutinin molecule of A/Seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) influenza virus, *Arch. Virol.* 75, 91-99.

Kilbourne, E. D. (1976) comparative efficacy of neuraminidase specific and conventional influenza virus vaccines in induction of antibody to neuraminidase in humans, *J. Infect. Dis.* 134, 384-394.

Kilbourne, E. D., Laver, W. G., Schulman, J. L. & Webster, R. G. (1968) Antiviral activity of antiserum specific for an influenza virus neuraminidase, *J. virol.* 2, 281-288.

Kuroda, K., Hauser, C., Rott, R., Klenk, H.-D. & Doerfler, W. (1986) Expression of the influenza virus haemagglutinin in insect cells by a baculovirus vector, *EMBO J.* 5, 1359-1365.

Kuroda, K., Geyer, H., Geyer, R., Doerfler, W. & Klenk, H.-D. (1990) The oligosaccharides of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells by a baculovirus vector, *Virology* 174, 418-429.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature (London)* 227, , 680-685.

Laver, W. G. (1978) Crystallisation and peptide maps of neuraminidase "heads" from H2N2 and H3N2 influenza virus strains, *Virology* 86, 78-87.

Laver, W. G. & Valentine, R. C. (1969) Morphology of the isolated haemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus, *virology* 38, 105-119.

Luckow, V. A. & Summers, M. D. (1988) Trends in the development of baculovirus expression vectors, *Bio/Technology* 6, 47-55.

Luckow, V. A. & Summers, M. D. (1989) High level expression of nonfused foreign genes with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology* 170, 31-39.

Mayson, i. W., Robert, B., winzler, R. J. & Rafelson, M. E.
(1961) Studies on the neuraminidase of influenza virus.
I. Separation and some properties of the enzyme from Asian and
FRS strains; Arch. Biochem. Biophys. 92, 475-483.

Min Jou, W., Verhoeyen, M., Devos, R., Saman, E., Fang, R.,
Huylebroeck, S. & Piers, W. (1980) Complete structure of the
hemagglutinin gene from the human influenza A/Victoria/3/75
(H3N2) strain as determined from cloned DNA, Cell 19, 683-
696.

Morrisey, J. H. (1981) Silver stain for proteins in
polyacrylamide gels a modified procedure with enhanced
uniform sensitivity, Anal. Biochem. 117, 307-310.

Potier, M., Mameli, L., Balisle, M., Dallaire, L. & Melançon,
S.E. (1979) Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium
(4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminate) substrate,
Anal. Biochem. 94, 287-296.

Rott, R., Becht, H. & Orlich, M. (1974) The significance of
influenza virus neuraminidase in immunity, J. Gen. Virol. 22,
35-41.

Schulman, J. L., Khakpour, M. & Kilbourne, E. D. (1968)
Protective effects of specific immunity to viral
neuraminidase on influenza virus infection of mice, J. Virol.
2, 778-786.

Sato, J. T., Drzeniek, R. & Rott R. (1966) Isolation of a low
molecular weight sialidase (neuraminidase) from influenza
virus, Biochim. Biophys. Acta 113, 402-404.

Summers, M. i. & Smith, S. E. (1987) A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agricultural Experiment stations Bulletin No. 1555.

van Drunen Littel, S., Parker, M. D., Fitzpatrick, D. R., Lamb, T.J., van den Hurk, J. V., Campos, M., Harland, R. & Ebelick, L. A. (1991) Expression of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV by recombinant baculovirus and analysis of its immunogenic properties, J. Virol. 65, 263-271.

Van Rompuy, L., Min Jou, W., Huylebroeck, D. & Fiers, W. (1982) Complete nucleotide sequence of a human influenza gene of subtype N2 (A/Vic/3/75), J. Mol. Biol. 161, 1-11.

Varghese, J. N., Laver, W.G. & Colman, P. M. (1983) Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution, Nature (Lond.) 303, 35-40.

Varghese, J. N. & Colman, P. M. (1991) Three-dimensional structure of the neuraminidase of influenza virus A/Tokyo/3/67 at 2.2 Å resolution, J. Mol. Biol. 221, 473-486.

Ward, C. W., Colman, P. M. & Laver, W. G. (1983) The disulphide bonds of an Asian influenza virus neuraminidase, FEBS Lett. 153, 29-30.

Ward, V. W., Elleman, T. V. & Azad, A. A. (1983) Amino Acid sequence of the pronase-released heads of neuraminidase subtype N2 from the Asian strain A/Tokyo/3/67 of influenza virus, Biochem. J. 207, 11-95.

Webster, R. S., Hinshaw, V. S. & Laver, W. G. (1982) Selection and analysis of antigenic variants of the

neuraminidase of N2 influenza viruses with monoclonal antibodies, *Virology* 117, 93-104.

Webster, R. G., Peay, F. A. & Laver, W. G. (1980) Protection against lethal influenza with neuraminidase, *Virology* 104, 230-237.

Wilson, V. W. & Rafelson M. E. (1963) isolation of neuraminidase from influenza virus, *Biochem. Prep.* 10, 113-117.

Wrigley, N. G., Laver, W. G. & Downie, J. C. (1977) Binding of antibodies to isolated haemagglutinin and neuraminidase molecules of influenza virus observed in the electron microscope, *J. Mol. Biol.* 109, 405-421.

Wrigley, N. G., Skehel, J. J., Charlwood, P. A. & Erand, C.M. (1973) The size and shape of influenza virus neuraminidase, *virology* 51, 525-529.

Couch, R.B., Douglas, R.G. Jr., Freason, D.S. & Kasei, J.A. Correlation studies of a recombinant influenza-virus vaccine. XII. Protection against experimental virus in man. *J. Infect. Dis.* 1971, 124, 473

Ogra, P.L., Chow, T., Beutner, K.R., Rubi, E., Strussenberg, J., DeMello S. & Rizzone C. Clinical and immunological evaluation of neuraminidase-specific influenza A virus in humans. *J. Infect. Dis.* 1977, 135, 499

Rilbourne, E.D. comparative efficacy of neuraminidase-specific and conventional influenza virus vaccines in the

induction of antibody to neuraminidase in humans. J. Infect. Dis. 1976, 134, 384

Kilbourne, E.D., Cimini, R.F., , , Mitchell, J.K. Jr. & Cgra, P.L. Immunologic response to the influenza virus neuraminidase is influenced by prior experience with the associated viral hemagglutinin. I. Studies in human vaccines. J. Immunol. 1987, 138, 3010

Johansson, B.E., Moran, T.W., Bona, C.B., Popple, SW. & Kilbourne, E.D. Immunologic response to influenza virus neuraminidase is influenced by prior experience with the associated viral hemagglutinin. II. Sequential infection of mice simulates human experience. J. Immunol. 1987, 139, 2010

Johansson, B.E., Moran, T.M., Constantin, A.B. & Kilbourne, E.D. Immunologic response to influenza virus neuraminidase is influenced by prior experience with the associated viral hemagglutinin. III. Reduced generation of neuraminidase-specific helper T cells in hemagglutinin-primed mice. J. Immunol. 1987, 139, 2015

Hirst, G.K. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. J. Exp. Med. 1942, 75, 47

Davenport, F.M., Hennessy, A.V., Brandon, L.M., Webster, R.G., Barrett, CD. & Lease, G.O. Comparisons of serological and febrile responses in humans to vaccination with influenza A viruses or their hemagglutinins. J. Lab. Clin. Med. 1964, 63, 5

Kida, H., Webster, R.G. & Yanagawa, R. Inhibition of virus-induced hemolysis with monoclonal antibodies to different antigenic areas on the hemagglutinin molecule of A/Seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) influenza virus. Arch. Virol. 1983, 76, 81

Jahiel, R.I. & Kilbourne, E.D. Reduction in plaque size and reduction in plaque number as differing indices of influenza virus-antibody reactions. J. Bacteriol. 1966, 92, 1527

Kilbourne, E.D., Laver, W.G., Schulman, J.L. & Webster, R.G. Antiviral activity of antiserum specific for an influenza virus neuraminidase. J. Virol. 1968, 2, 281

Johansson, B.E., Bucher, D.J. & Kilbourne, E.D. Purified influenza virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity. J. Virol. 1989, 63, 1239

Schulman, J.L., Khakpour, M. & Kilbourne, E.D. Protective effects of specific immunity to viral neuraminidase on influenza virus infection of mice. J. Virol. 1968, 2, 778

Johansson, E.E. & Kilbourne, E.D. comparative long-term effects in a mouse model system of influenza whole virus and purified neuraminidase vaccines followed by sequential infections. J. Infect. Dis. 1990, 162, 800

Johansson, B.E., Moran, T.M. & Kilbourne, E.D. Antigen-presenting B cells and helper T cells cooperatively mediate intraviral antigenic competition between influenza A virus surface glycoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 1987, 84, 8868

Bott, R., Becht, H. & Grlich, M. The significance of influenza virus in immunity. *J. Gen. Virol.* 1974, 22, 35

Wentz, R.G., Bray, P.A. & Laver, W.G. Protection against lethal influenza with neuraminidase. *Virology* 1988, 164, 230

Johansson, B.E., Grajower, B. & Kilbourne, E.D. infection-permissive immunization with influenza virus neuraminidase prevents weight loss in infected mice. *Vaccine* 1993, 11, 1037

Kilbourne, E.D., Palese, P. & Schulman, J.L. Inhibition of viral neuraminidase as a new approach to the prevention of influenza. In *Perspectives in virology*. Vol 9 (Ed. Pollard, M.) New York, Academic Press, 1975, 99-113

Kilbourne, E.D. Immunization strategy: infection-permissive vaccines for the modulation of infection. In *Modern approaches to vaccines* (Eds. Chanock R.M., Lerner, R.A.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1984, 269-274

Vanlandschoot, P., Maertens, G., Min Jou, W. & Fiers, W. Recombinant secreted hemagglutinin protects mice against a lethal challenge of influenza virus. *Vaccine* 1993, 11, 1188

Brown, J. & Laver, W.G. The effect of antineuraminidase antibody on the elution of influenza virus from cells. *J. Gen. Virol.* 1968, 2, 291

Callaghan, J., Bucher, D.J., Dourmashkin, R., Davis, J. F., Rosen, G. & Kilbourne E.D. Isolation of immunogenic neuraminidase of human influenza viruses by combination of genetic and biochemical procedures. *J. Clin. Microbiol.*

1984, 20, 89

Colman, P.M. & Ward, C.K. Structure and diversity of influenza neuraminidase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1985, 114, 177

Kilbourne, ED. Influenza. Plenum, New York, 1987

van Rompuy, L., Min Jou, W., Hoylebroeck, E. & Fiers, W. Complete nucleotide sequence of a human influenza neuraminidase gene of subtype N2 (A/Vic/3/75). *J. Mol. Biol.* 1982, 161, 1

Lentz, M.R., Air, G.M., Laver, W.G. & Webster, R.G. Sequence of the neuraminidase gene from influenza virus A/Tokyo/3/67 and previously uncharacterised monoclonal variants. *Virology* 1984, 135, 257

Kawaoka, Y., Yamnikova, S., Chambers, T.M., Lvov, D.K. & Webster, R.G. Molecular characterization of a new hemagglutinin, subtype 14, of influenza A virus. *Virology* 1990, 179, 759

Baez, M., Palese, P. & Kilbourne, E.C. Gene composition of high-yielding influenza vaccine strains obtained by recombination. *J. Infect. Dis.* 1986, 141, 362

Lisboa, 30 de Julho de 2007

Reivindicações

1. Neuraminidase recombinante sob uma forma efectivamente isolada, que se obtém utilizando:

a) o desenvolvimento em um meio de cultura apropriado de células hospedeiras que se transformam por meio de um vector de expressão de neuraminidase e se infectam com um vírus que se transforma com um vector de expressão de neuraminidase, em que o vector de expressão compreende pelo menos uma parte da região codificante de um gene da neuraminidase de um vírus influenza com excepção da região que codifica a "âncora" de membrana precedida no ciclo por uma sequência sinal clivável; e

b) o isolamento do produto de expressão neuraminidase, do meio de cultura para utilização em uma vacina contra vírus influenza ("anti-influenza").

2. Neuraminidase recombinante sob uma forma efectivamente isolada de acordo com a reivindicação 1., a qual é a neuraminidase NA2 recombinante de vírus Influenza, em que se infectam as referidas células hospedeiras com um vírus que é transformado por dupla recombinação homóloga do seu genoma com o vector de expressão recombinante pAc2IVNAs (LMBP 2976), para utilização em uma vacina contra a gripe ("anti-influenza").

3. Neuraminidase recombinante sob uma forma efectivamente isolada de acordo com a reivindicação 1., a qual é a neuraminidase NA2 recombinante de vírus influenza, em que se transfectam as células hospedeiras com o vector de expressão recombinante pFF11VNAfla (LMBP 3023), para utilização em uma vacina contra a gripe ("anti-influenza").

4. Neuraminidase recombinante de vírus influenza de acordo com uma qualquer das reivindicações 3. ou 4., para utilização em uma vacina contra vírus influenza do tipo NA2.

5. Neuraminidase recombinante de vírus influenza de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 4., **caracterizada pelo facto** de as células hospedeiras provirem de um organismo eucariota inferior.

6. Neuraminidase recombinante de vírus influenza de acordo com a reivindicação 1., 2., 4. ou 5., **caracterizada pelo facto** de as células hospedeiras serem células de insectos.

7. Neuraminidase recombinante de vírus influenza de acordo com a reivindicação 6., **caracterizada pelo facto** de as células de insectos serem células de insectos sf9.

8. Neuraminidase recombinante de vírus influenza de acordo com a reivindicação 1., 3., 4. ou 5., **caracterizada pelo facto** de as células hospedeiras serem células de levedura, por exemplo de *Saccharomyces spec.* Ou *Pichia spec.*

9. Vector de expressão de uma neuraminidase segregável por vírus influenza que compreende:

a) pelo menos uma parte da região codificante de um gene de neuraminidase de vírus influenza com excepção da região que codifica a âncora de membrana;

b) uma sequência sinal localizada em 5' da região codificada e acoplada ao mesmo durante o ciclo;

c) um promotor localizado em 5' da sequência sinal; e

d) um terminador da transcrição localizado em 3' da região codificante.

10. Vector de acordo com a reivindicação 9., para a expressão de uma neuraminidase segregável por vírus influenza, que é a neuraminidase NA2 segregável por vírus influenza, vector esse que compreende:

a) a região codificante de um gene de neuraminidase NA2 de vírus influenza estirpe A/Victória/3/75 com exceção da região que codifica a âncora de membrana;

b) uma sequência sinal localizada em 5' da região codificada e acoplada na mesma durante o ciclo;

c) um promotor localizado em 5' da sequência sinal; e

d) um terminador da transcrição localizado em 3' da região codificante.

11. Vector de acordo com a reivindicação 9. ou 10., **caracterizado pelo facto** da sequência sinal ter origem no gene da hemaglutinina de vírus influenza NA2 A/Victoria/3/75 (H3N2).

12. Vector de acordo com a reivindicação 9., 10. ou 11., **caracterizado pelo facto** de o promotor ser o promotor poli-hidrina.

13. Vector de acordo com uma qualquer das reivindicações 9. a 12., **caracterizado pelo facto** do terminador da transcrição ter origem em SV40 e/ou em um gene de poli-hidrina.

14. Vector de acordo com uma qualquer das reivindicações 9. a 13., em que o vector é c pAc21VNAs com o número de admissão do depósito LMBP 2976.

15. Vector de acordo com a reivindicação 1., para expressão de uma neuraminidase segregável por vírus influenza em uma levedura, que compreende:

a) a região codificante de um gene de neuraminidase de vírus influenza com exceção da região que codifica a âncora de membrana e ainda com exceção da região que codifica pelo menos uma porção do pedúnculo ("stalk part") da neuraminidase;

b) uma sequência sinal localizada em 5' da região codificada e acoplada na mesma durante o ciclo;

c) um promotor localizado em 5' da sequência sinal; e

d) um terminador da transcrição localizado em 3' da região codificante.

16. Vector de acordo com a reivindicação 15., para expressão em uma levedura de uma neuraminidase segregável por vírus influenza, que é uma neuraminidase NA2 segregável por vírus influenza, em que a referida região codificante pertence a um gene da neuraminidase de vírus influenza da estirpe A/Victoria/3/75 com exceção das regiões que codificam respectivamente a âncora de membrana e pelo menos uma porção do pedúnculo ("stalk part") da neuraminidase.

17. Vector de acordo com a reivindicação 15. ou 16., **caracterizado pelo facto** da sequência sinal ser uma pré-pró-sequência sinal do factor a de *Saccharomyces cerevisiae*.

18. Vector de acordo com a reivindicação 15., 16. ou 17., **caracterizado pelo facto** de o promotor ser o promotor álcool oxidase I de *Pichia pastoris*.

19. Vector de acordo com uma qualquer das reivindicações 15. a 18., **caracterizado pelo facto de o terminador da transcrição ter origem em um gene da álcool oxigenase I de *Pichia pastoris*.**

20. Vector de acordo com uma qualquer das reivindicações 15. a 18., em que o vector é o pPP1LVNAfls com c número de admissão do depósito LMBF 3223.

21. Vacina que compreende a neuraminidase recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações I. a 8..

22. Vacina de acordo com a reivindicação 21., em que a neuraminidase recombinante é a neuraminidase NA2 recombinante de vírus influenza de acordo com uma qualquer das reivindicações 2. a 8..

23. Utilização de uma neuraminidase recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 8. para a preparação de ~~uma~~ vacina contra virus influenza.

24. Utilização de acordo com a reivindicação 23., em que a neuraminidase recombinante é a neuraminidase NA2 recombinante de vírus influenza de acordo com as reivindicações 2. a 8., para a preparação de uma vacina contra vírus influenza do tipo NA2.

25. Processo de fabrico de uma neuraminidase recombinante de virus influenza que consiste nas fases de:

a) construção de um vector de expressão que compreende uma sequência sinal e a ela acoplada durante o ciclo a região codificante de um gene de neuraminidase de virus

influenza com exceção da região que codifica a âncora de membrana e eventualmente da região que codifica o pedículo ("stalk part") da neuraminidase, isso na condição de seqüências promotora e terminadora apropriadas;

b) transformação de uma célula hospedeira com o vector de expressão assim obtido;

c) cultura da célula hospedeira transformada em um meio de cultura sob condições que possibilitam a expressão da neuraminidase recombinante; e

d) isolamento da neuraminidase recombinante a partir do meio de cultura.

26. Processo de fabrico de uma neuraminidase recombinante de vírus influenza que consiste nas fases de:

a) construção de um vector que compreende um módulo de expressão constituído por uma seqüência sinal e a ela acoplada durante o ciclo a região codificante de um gene de neuraminidase de vírus influenza com exceção da região que codifica a âncora de membrana, isso na condição de seqüências promotora e terminadora apropriadas para transcrição;

b) colocação do módulo de expressão do vector no genoma de um vírus através de uma dupla recombinação homóloga;

c) infecção de uma célula hospedeira com o vírus transformado assim obtido;

d) cultura da célula hospedeira infectada em um meio de cultura sob condições que possibilitam a expressão da neuraminidase recombinante; e

e) isolamento da neuraminidase recombinante a partir do meio de cultura.

27. Processo de acordo com a reivindicação 26., para o fabrico de uma neuraminidase recombinante de vírus influenza, que é uma neuraminidase NA2 recombinante de vírus influenza, em que a referida região codificante pertence ao gene da neuraminidase NA2 de vírus influenza da estirpe A/Victoria/3/75 com excepção da região que codifica a âncora de membrana e o referido vírus é um baculovirus "wild-type" (do tipo selvagem) ou um baculovirus derivado do primeiro.

28. Processo de acordo com a reivindicação 27., para o fabrico de uma neuraminidase NA2 recombinante de vírus influenza, em que o referido vector que compreende um módulo de expressão é o pAc21VNAs com o numero de admissão do depósito LMBP 2976.

29. Processo de acordo com a reivindicação 25., para o fabrico de uma neuraminidase recombinante de vírus influenza, que é uma neuraminidase NA2 recombinante de vírus influenza, em que a referida região codificante pertence ao gene da neuraminidase NA2 de vírus influenza da estirpe A/Victoria/3/75 com excepção da região que codifica a âncora de membrana e da região que codifica o pedúnculo ("stalk part") da neuraminidase.

30. Processo de acordo com a reivindicação 25., para o fabrico de uma neuraminidase recombinante de vírus influenza, que é uma neuraminidase NA2 recombinante de vírus influenza, em que o referido vector de expressão é o pSP11VNAs1s com o numero de admissão do depósito LMBP 3223, e a citada célula hospedeira é a *Sichia pastoris*.

31. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 25. a 30. para o fabrico de uma neuraminidase recombinante de

virus influenza, em que o referido isolamento da neuraminidase recombinante a partir do meio de cultura se faz através de fraccionamento com sulfato de amónio seguido por pelo menos um tratamento cromatográfico.

32. Processo de acordo com a reivindicação 31., **caracterizado pelo facto** do tratamento cromatográfico consistir em uma cromatografia de troca aniónica seguida por uma passagem ao longo de uma coluna de matriz de afinidade e em uma filtração em gele.

33. Processo de acordo com a reivindicação 32., **caracterizado pelo facto** do tratamento cromatográfico consistir em uma cromatografia de troca aniónica em Q-Sepharose seguida por uma passagem ao longo de uma coluna de ácido N-(p-aminofenil)oxâmico-agarose e em uma filtração em gele Superdex 230.

Lisboa, 30 de Julho de 2007

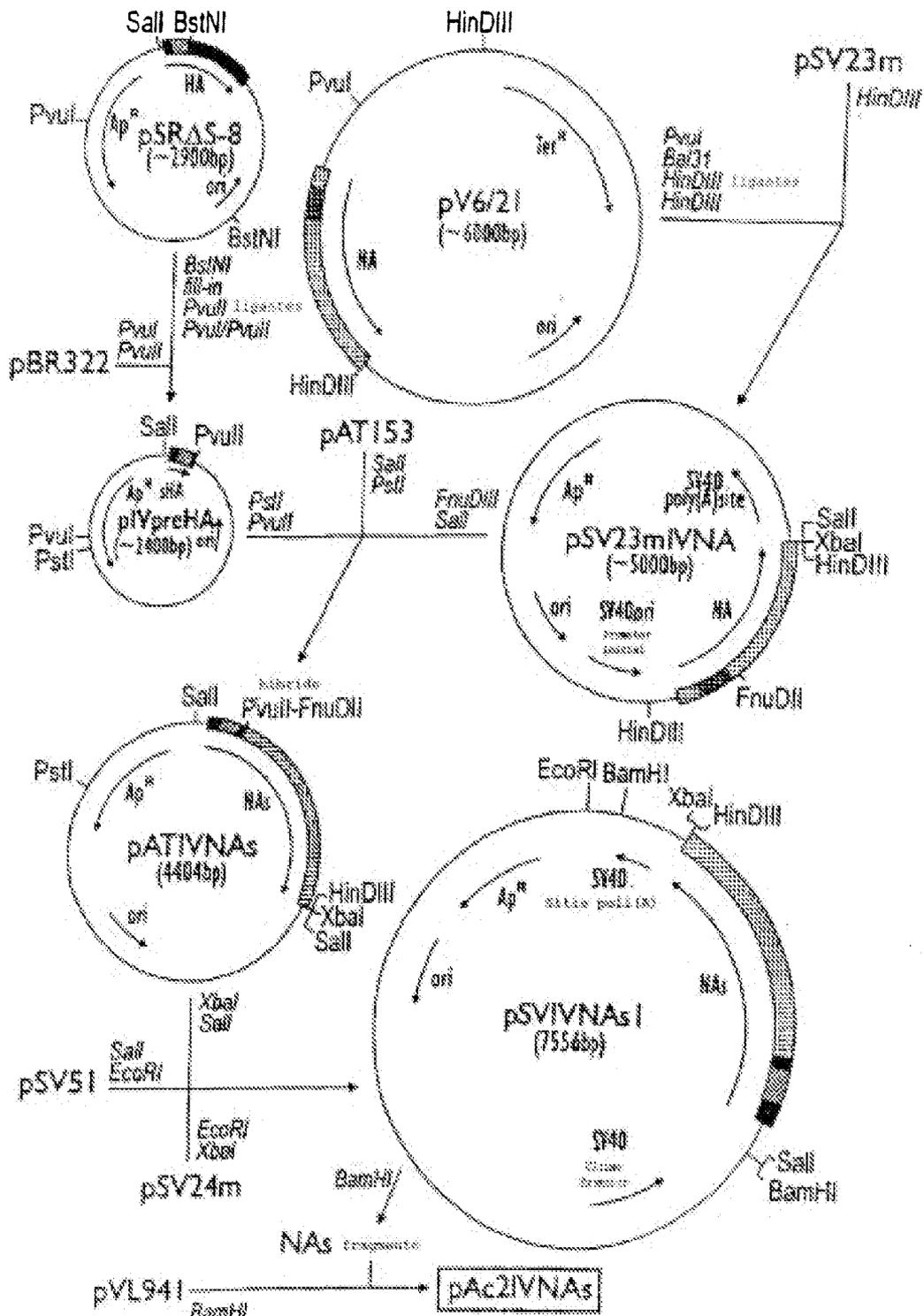
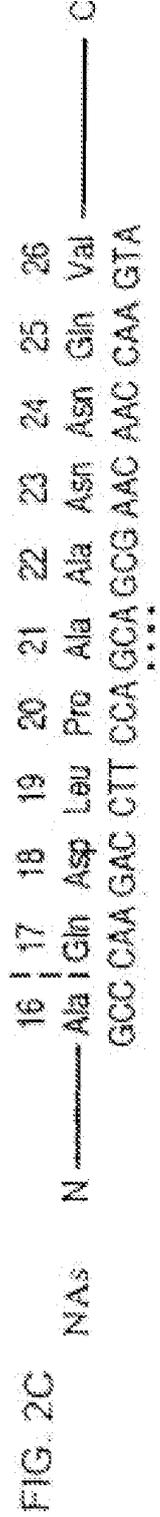
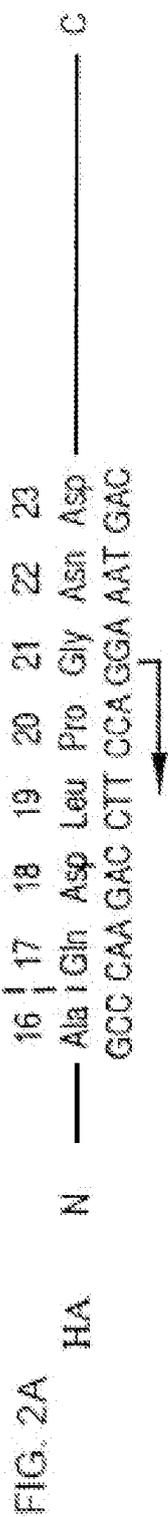


FIG. 1



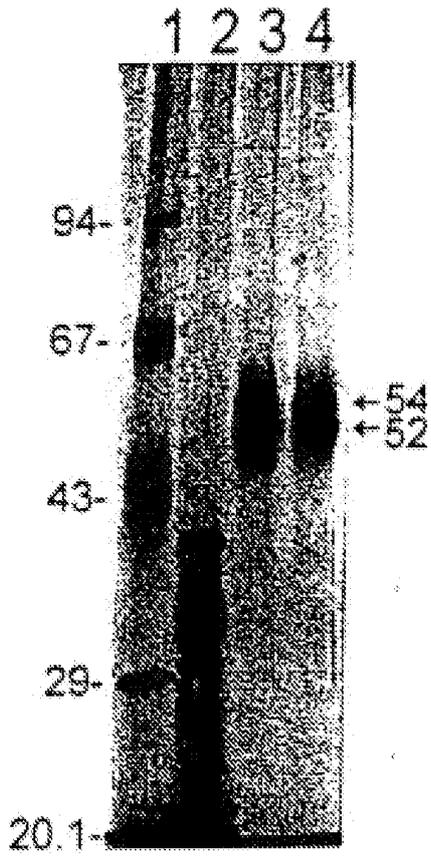


FIG. 3A

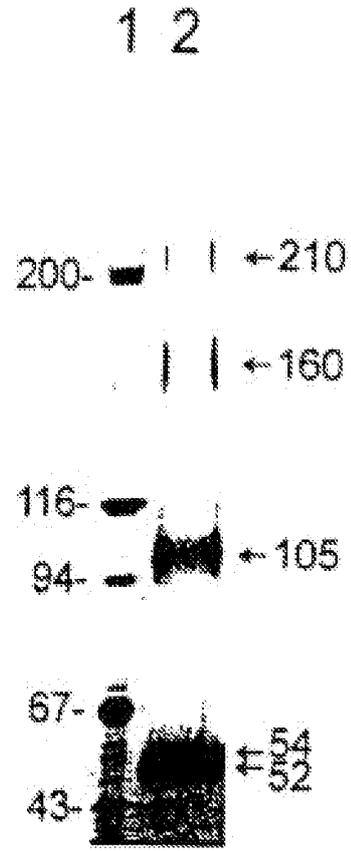


FIG. 3B

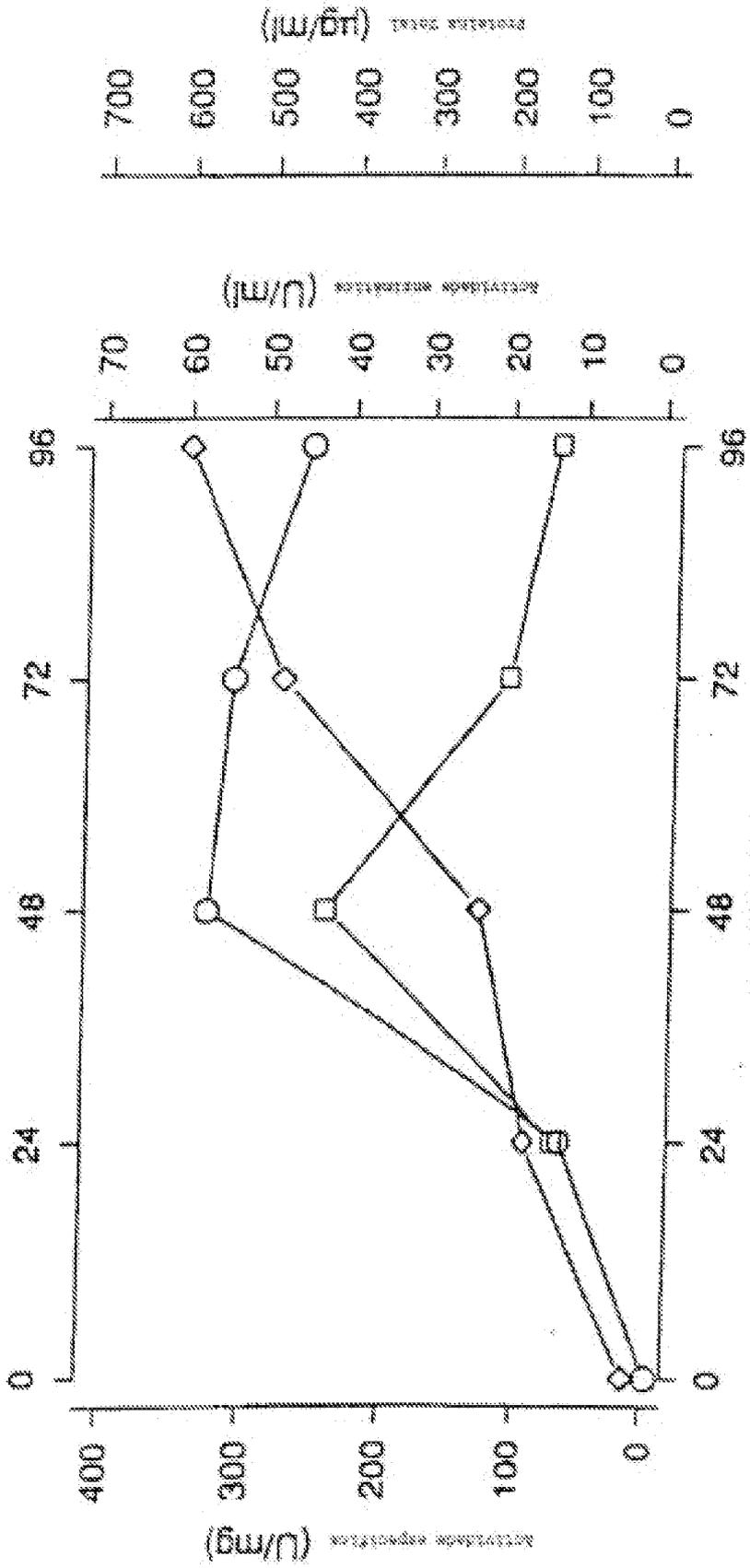


FIG. 4

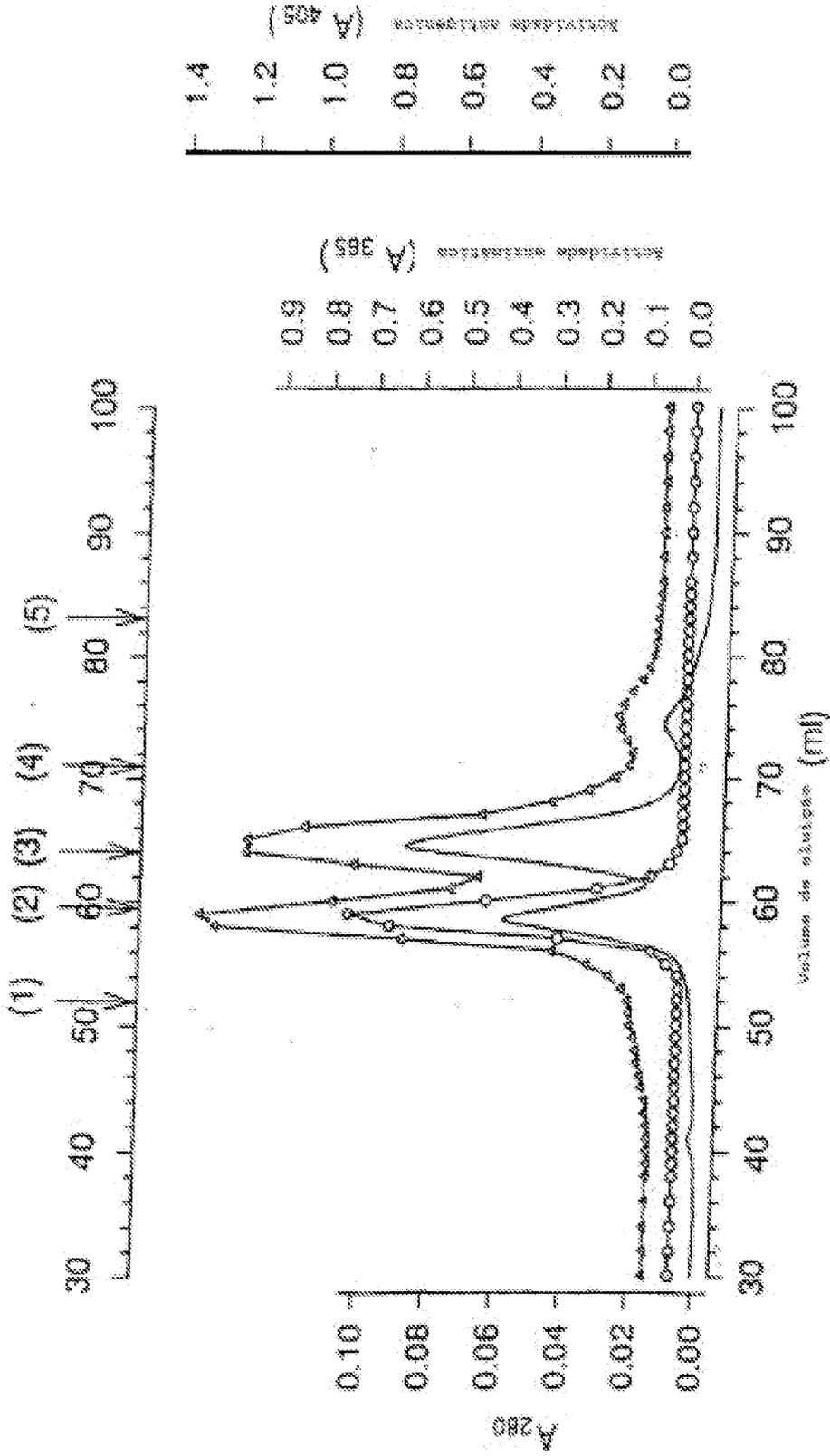


FIG. 5

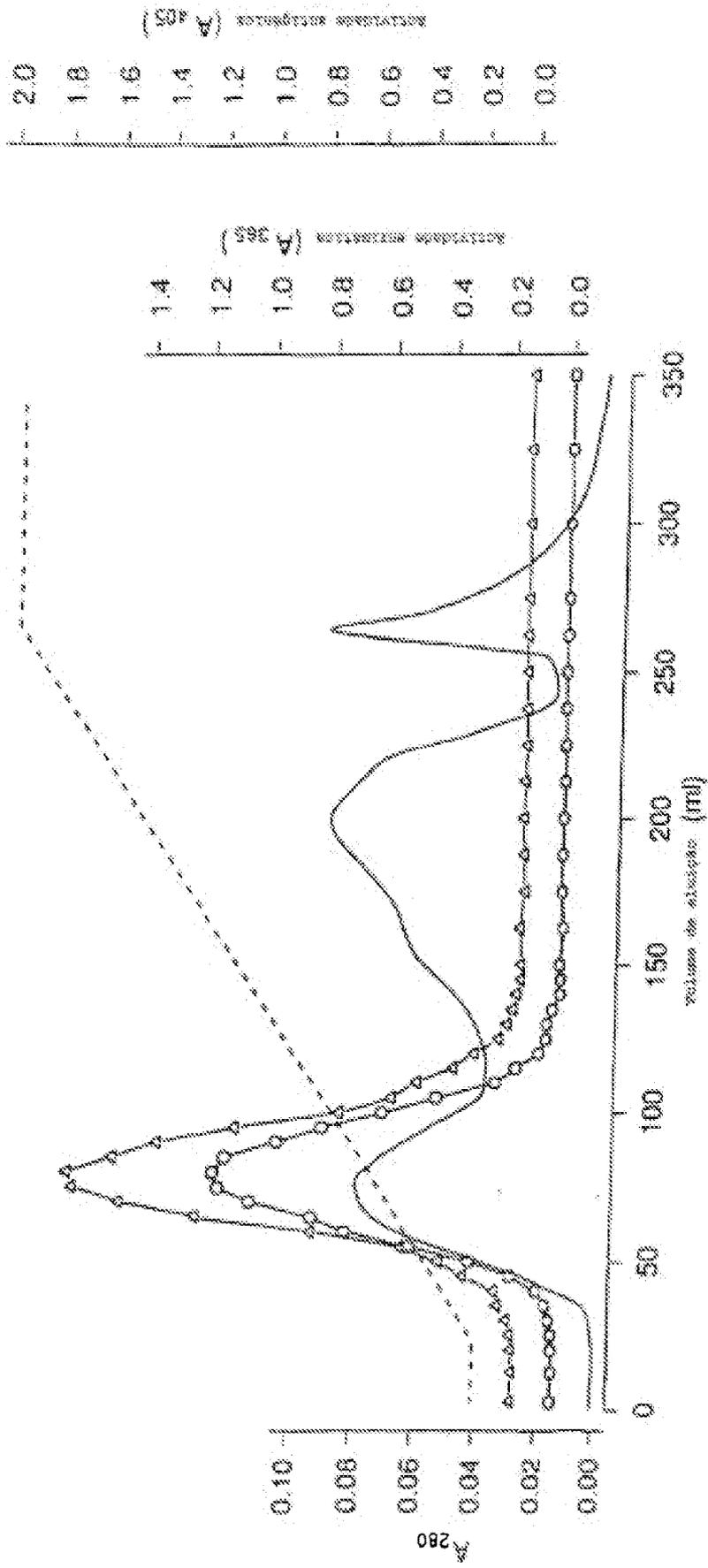


FIG. 6

FIG. 7A

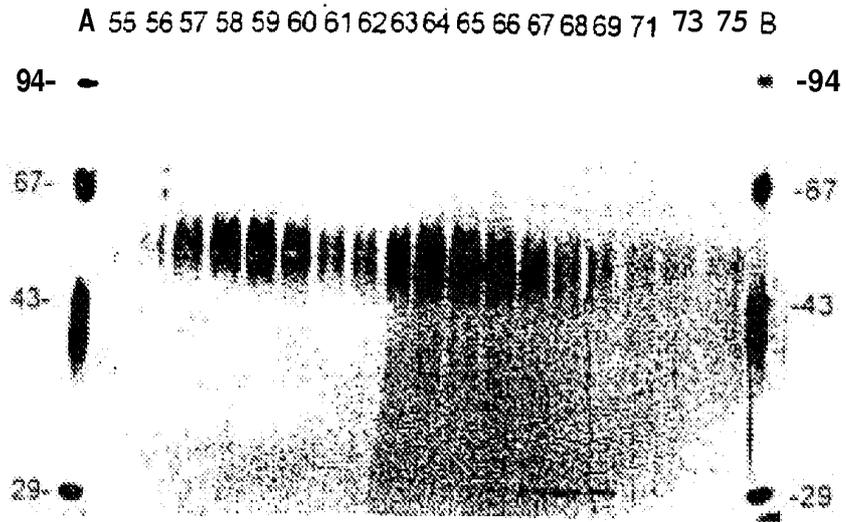
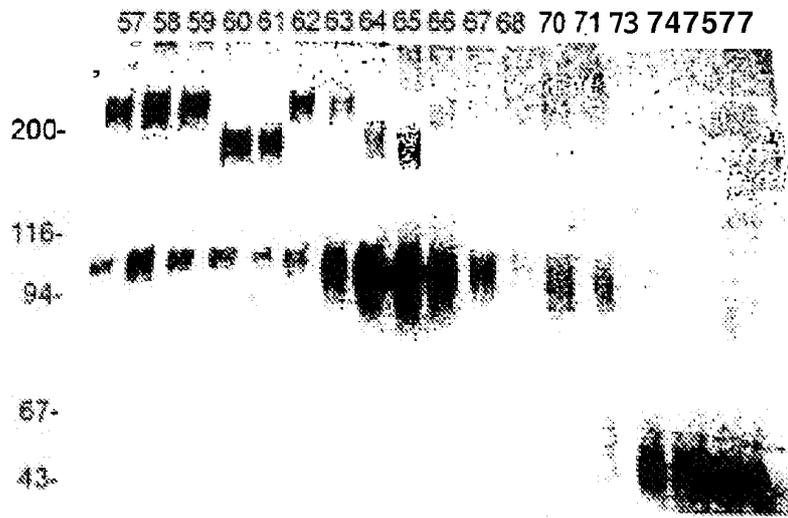


FIG. 7B



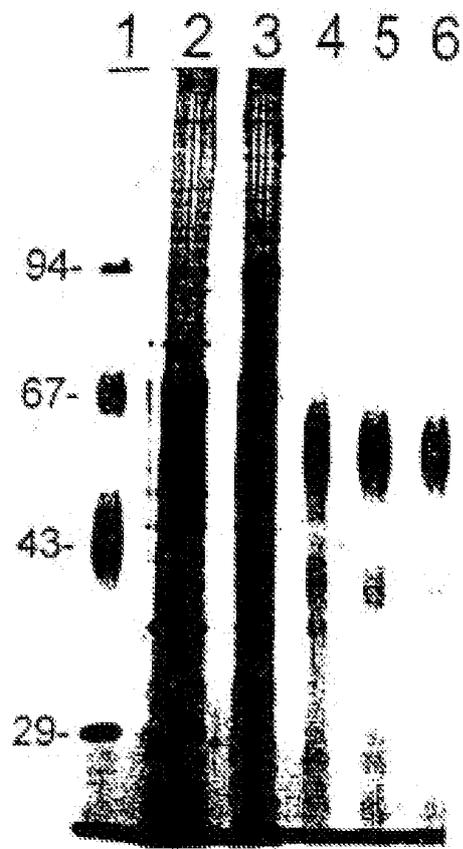


FIG. 8

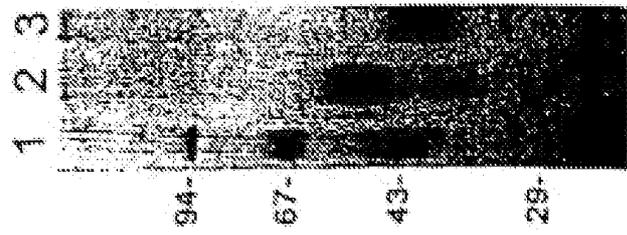


FIG. 9A

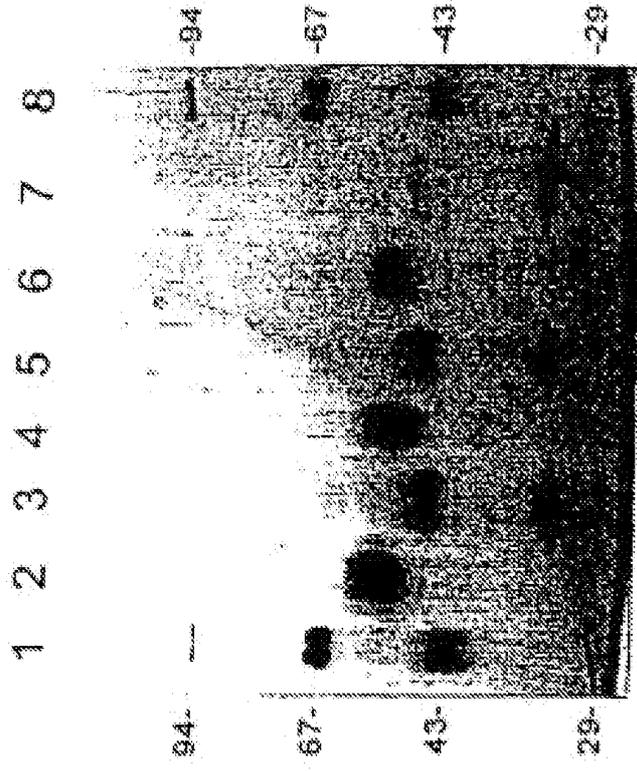


FIG. 9B

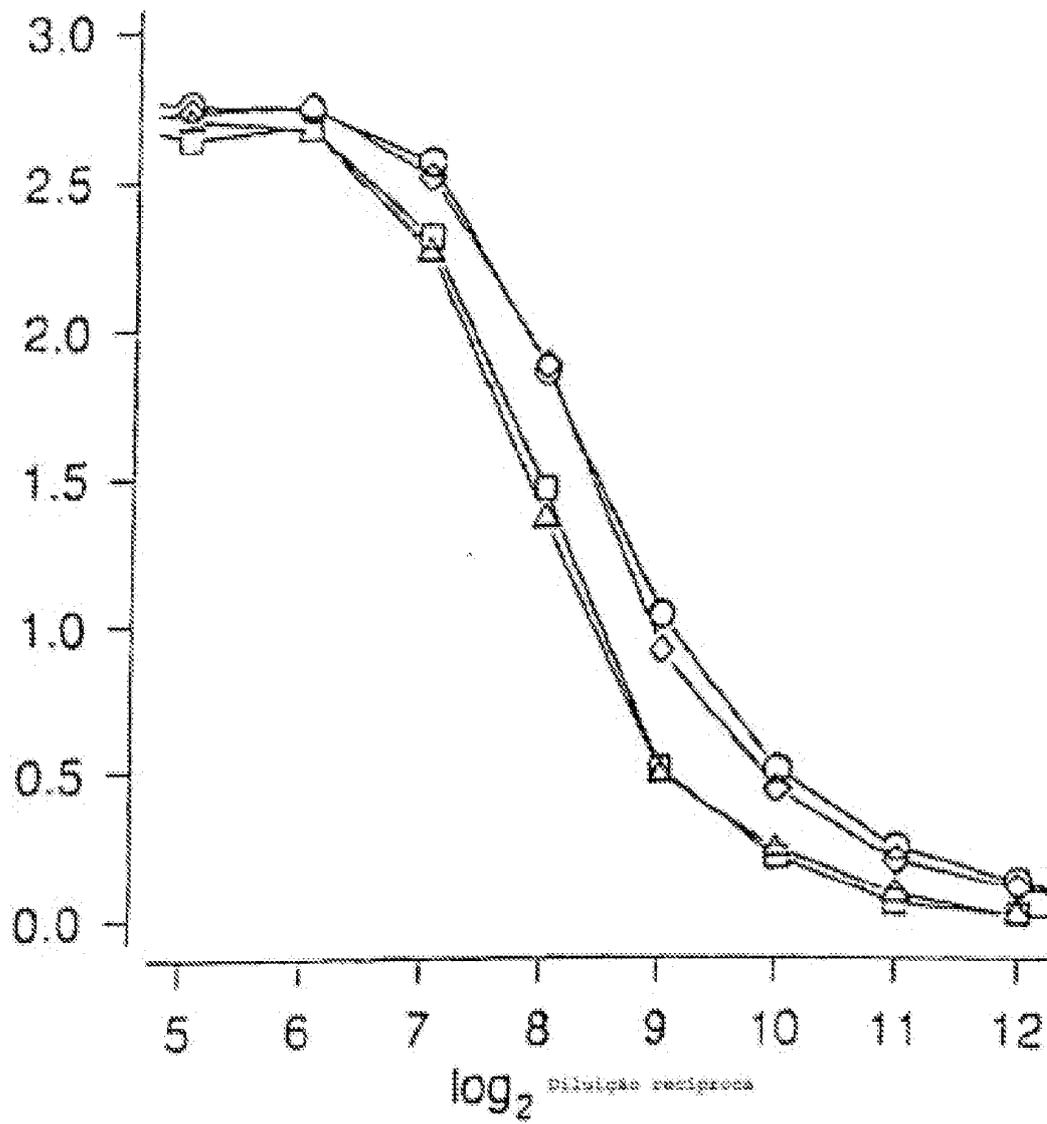


FIG. 10

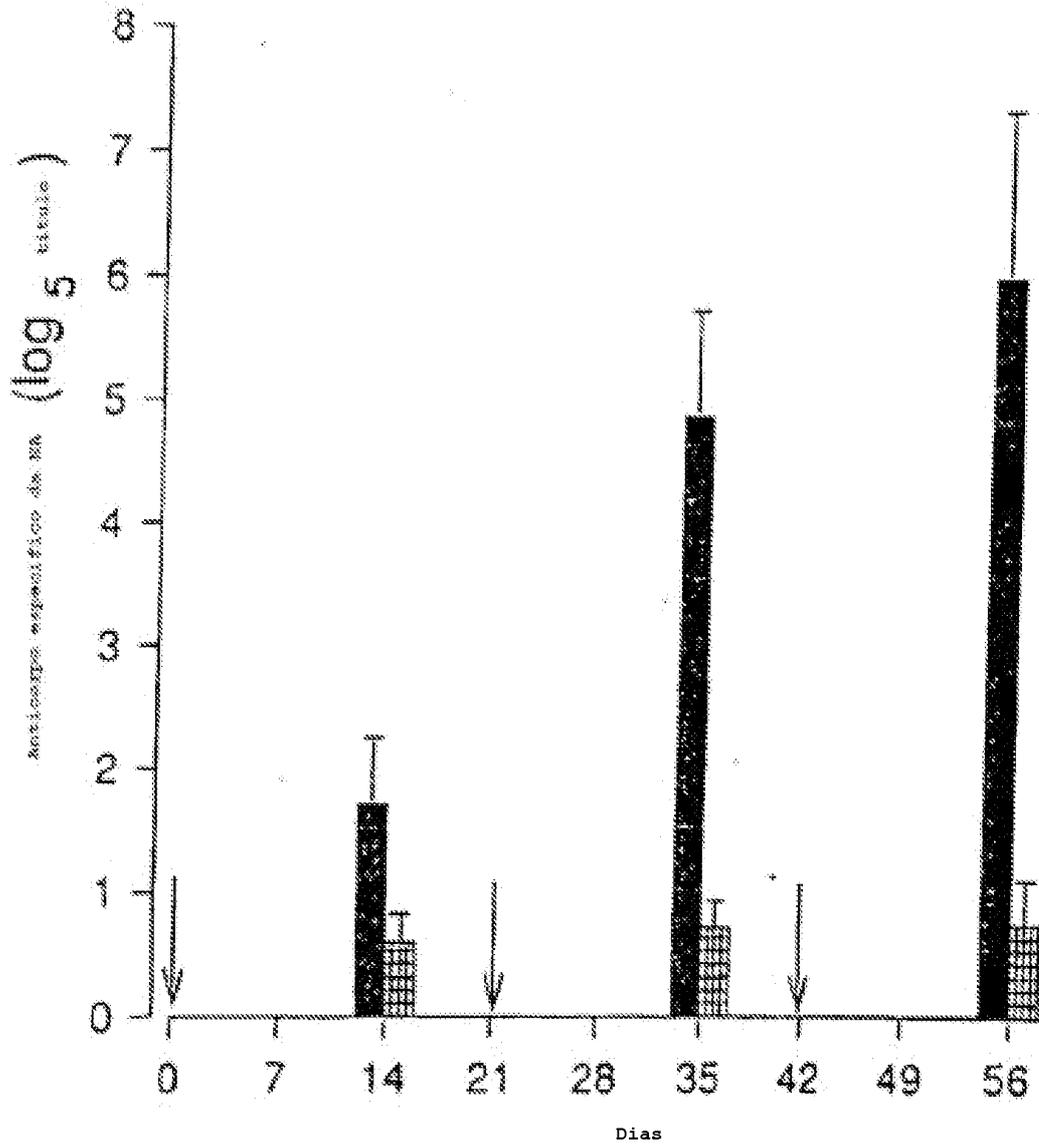


FIG. 11

FIG. 12A

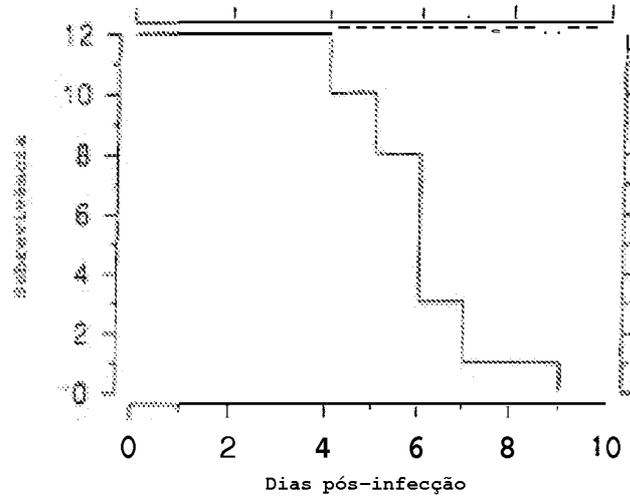


FIG. 12B

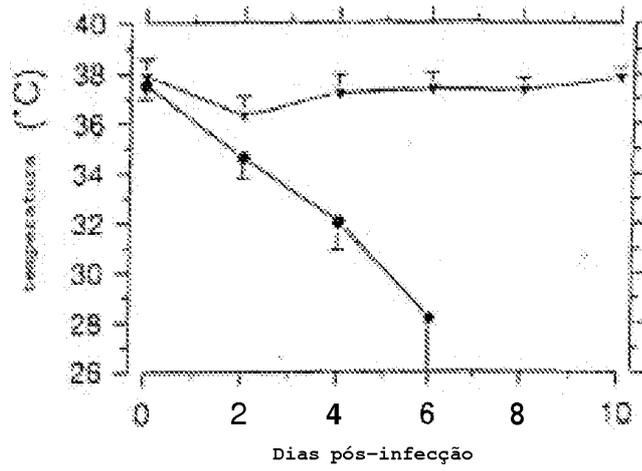


FIG. 12C

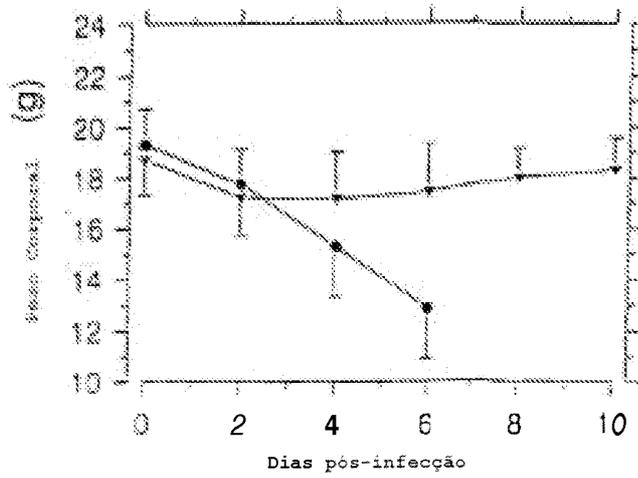


FIG. 13A

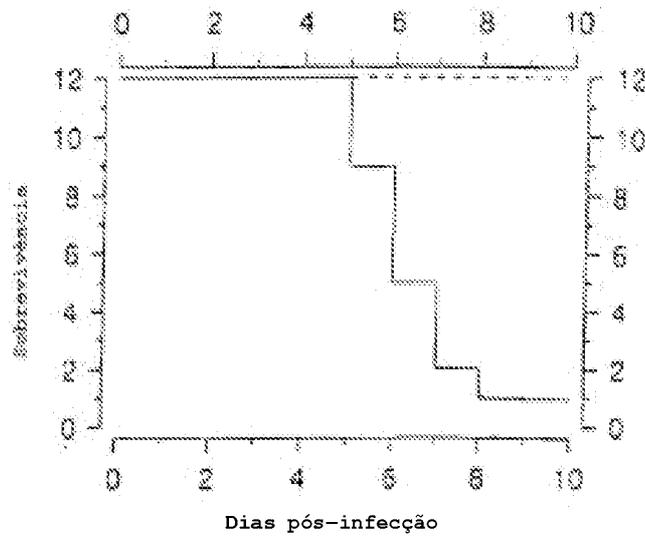


FIG. 13B

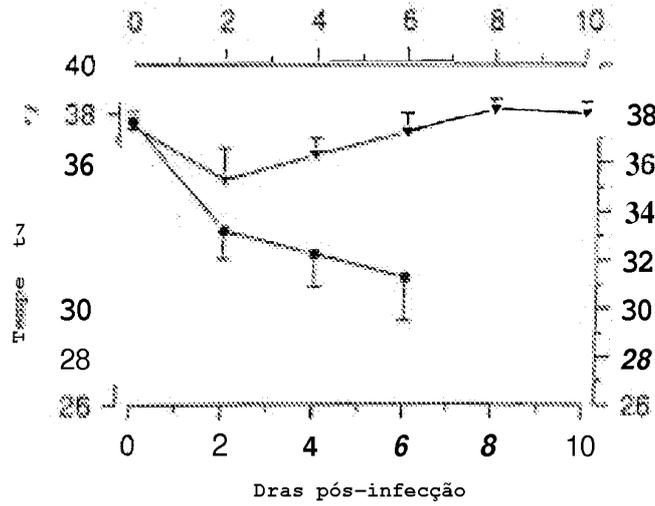


FIG. 13C

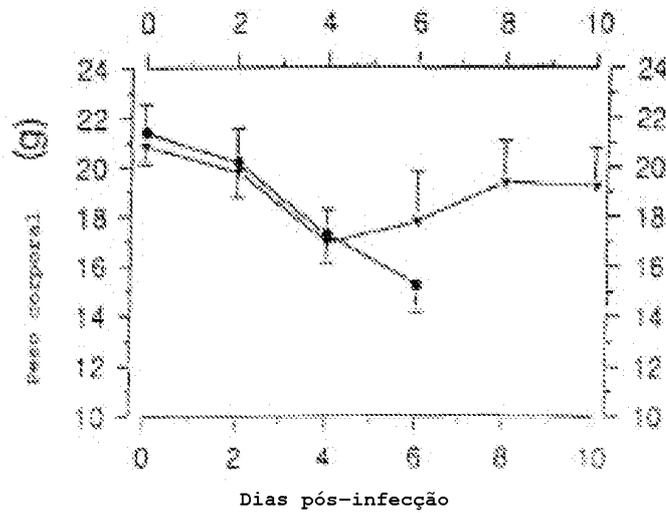


FIG. 14A

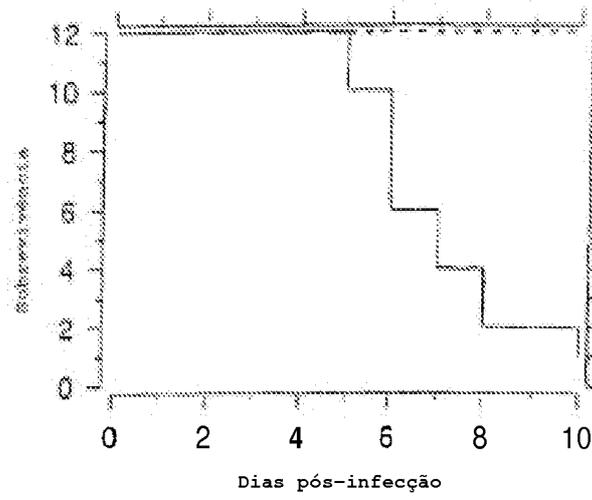


FIG. 14B

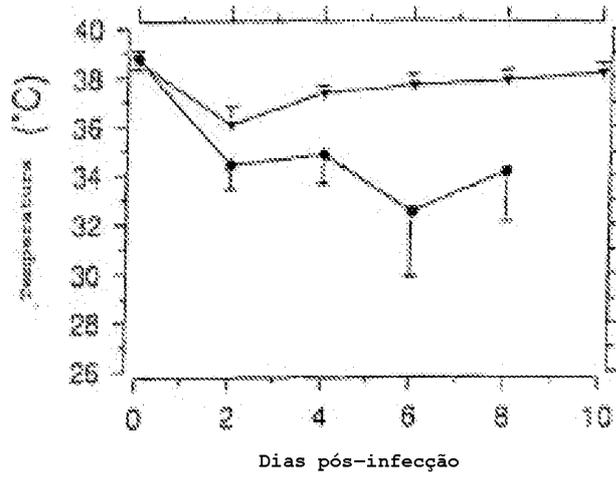
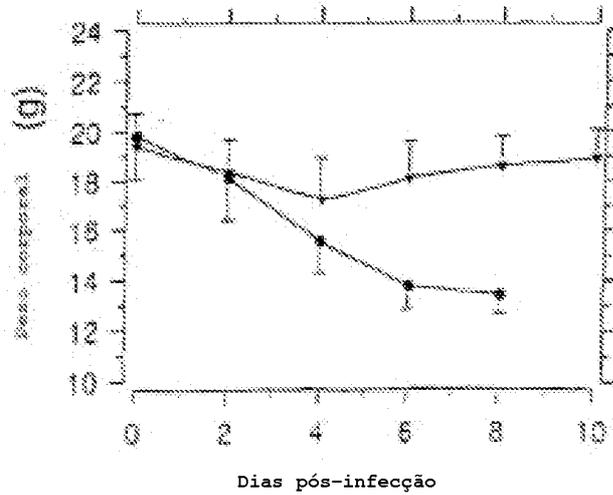


FIG. 14C



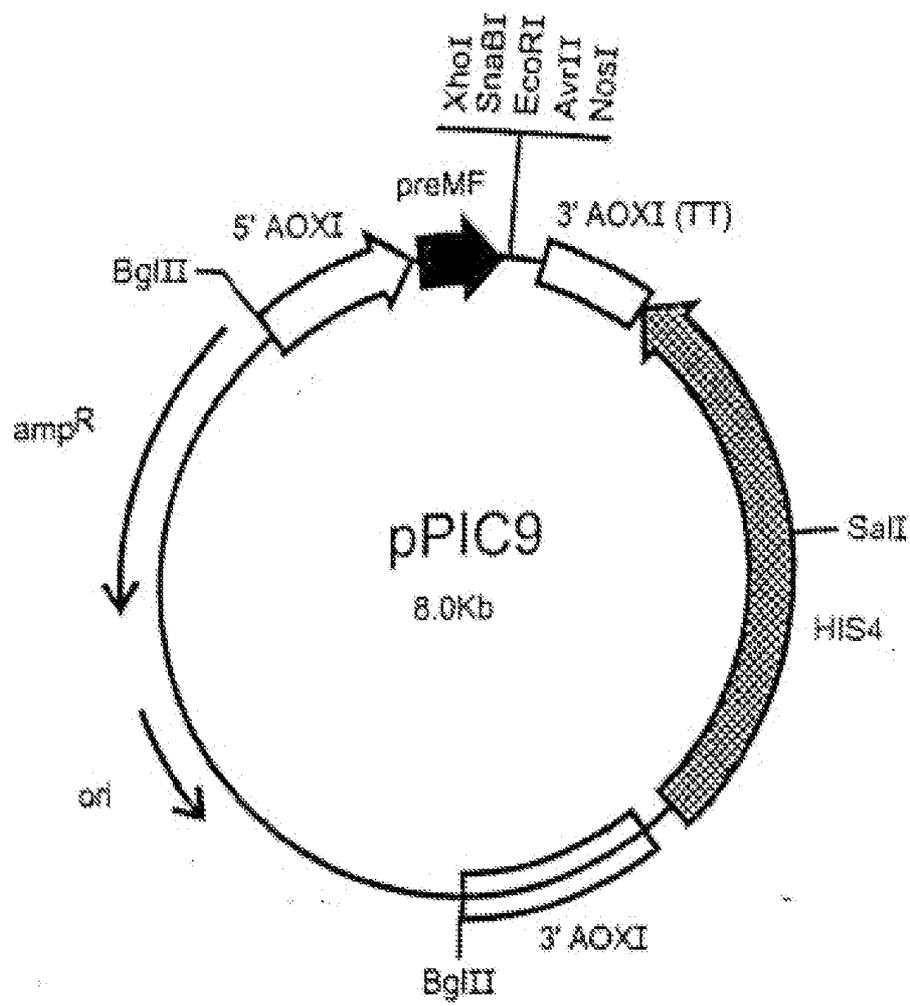
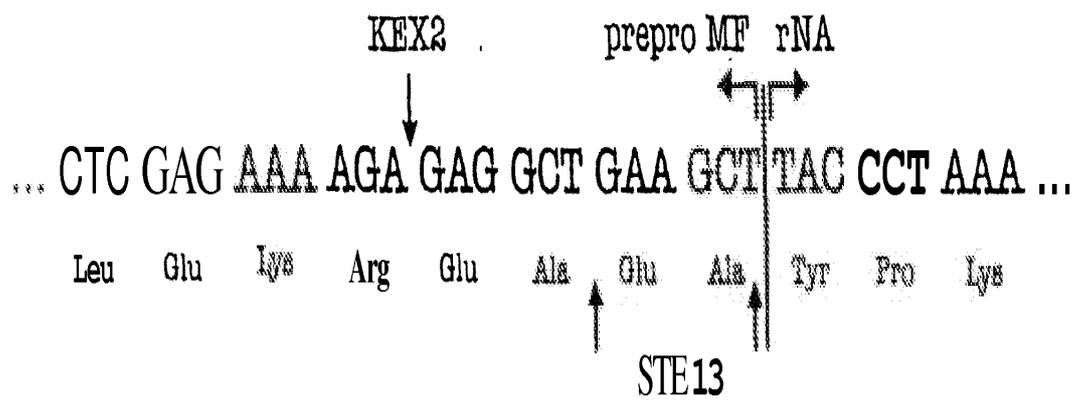


FIG. 15



FIG, 16

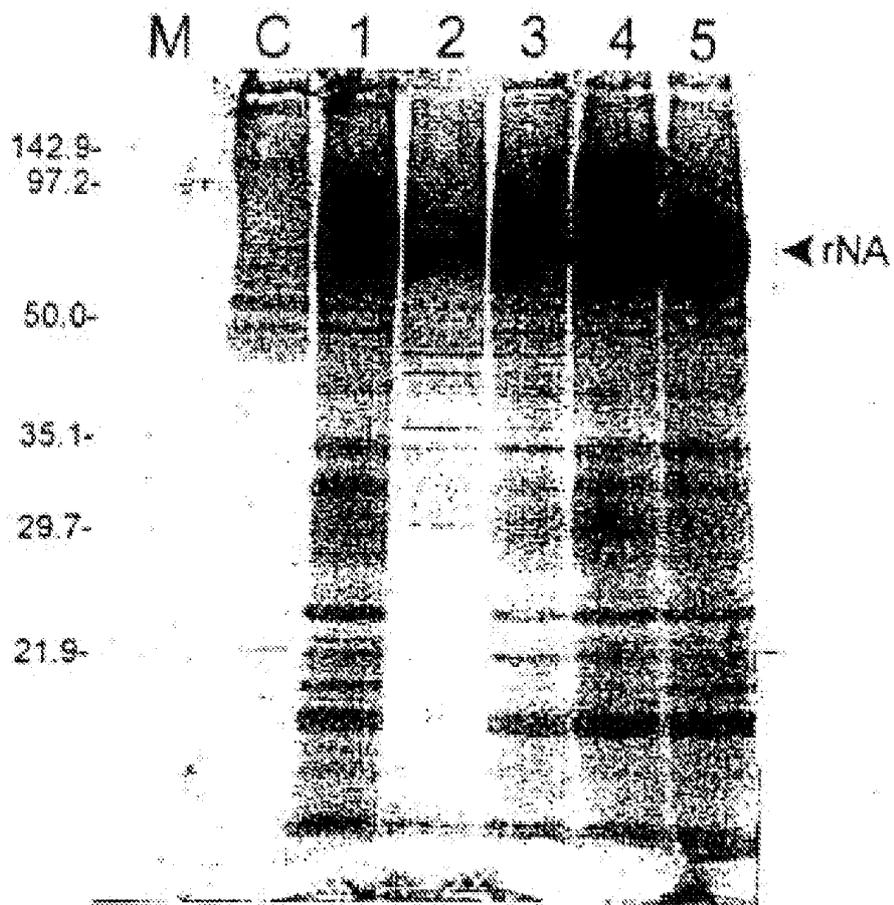


FIG. 17