INPI
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação:* PT 759067 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6 )
C12N015/12 A C12N001/21 B
A61K038/18 B A61K031/70 B
C07K014/495 B C07K016/18 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1994.05.12

(30) *Prioridade:* 1994.03.08 US 208008

(43) *Data de publicação do pedido:* 1997.02.26

(45) *Data e BPI da concessão:* 2001.09.05

(73) *Titular(es):*
HUMAN GENOME SCIENCES, INC.
9410 KEY WEST AVENUE ROCKVILLE, MD 20850-3338 US

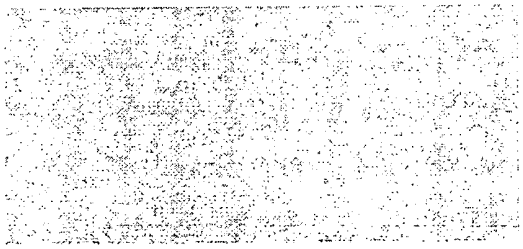
(72) *Inventor(es):*
MARK D. ADAMS US
PAUL S. MEISSNER US
REBECCA FULDNER US

(74) *Mandatário(s):*
JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* FACTOR ALFA H1 DO CRESCIMENTO TRANSFORMANTE

(57) *Resumo:*

FACTOR ALFA H1 DO CRESCIMENTO TRANSFORMANTE



Campo das Cebolas - 1149 - 035 LISBOA
Telefs.: 01 888 51 51 / 2 / 3
Linha azul: 01 888 10 78 • Fax: 01 887 53 08 - 886 00 66
E-mail: inpi @ mail. telepac. pt

REF.: A 2560 EP

INPI 758

INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

## FOLHA DO RESUMO

| PAT. INV. | MOD. UTI. | MOD. IND. | DES. IND. | TOP. SEMIC. | CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51) |
|---|---|---|---|---|---|
| [X] | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | |
| | | N.º Objectos ☐ | N.º Desenhos ☐ | | |

N.º 759.067 (11) DATA DO PEDIDO ___/___/___ (22)

REQUERENTE (71) (NOME E MORADA) **HUMAN GENOME SCIENCES, INC., norte-americana, industrial, com sede em 9410 Key West Avenue, Rockville, MD 20850-3338, Estados Unidos da América**

CÓDIGO POSTAL

INVENTOR(ES)/ AUTOR(ES) (72)

**MEISSNER, PAUL, S.; FULDNER, REBECCA e ADAMS, MARK, D.**

REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)

| DATA DO PEDIDO | PAÍS DE ORIGEM | N.º DO PEDIDO |
|---|---|---|
| | | |

FIGURA ( para interpretação do resumo)

EPÍGRAFE (54)

**"FACTOR ALFA H1 DO CRESCIMENTO TRANSFORMANTE"**

RESUMO (max. 150 palavras) (57)

A invenção descreve um polipeptido Fα-H1CT e um ADN (ARN) que codifica esses polipeptidos Fα-H1CT. A invenção descreve também um procedimento para a produção desses polipeptidos por meio de técnicas recombinantes e para a produção de anticorpos e antagonistas contra esses polipeptidos. Tais polipeptidos podem ser combinados com um veículo ou com um diluente farmacêutico adequado para assim se conseguir obter efeitos de diagnóstico,

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

Sotip

Campo das Cebolas - 1149 - 035 LISBOA
Telefs.: 01 888 51 51 / 2 / 3
Linha azul: 01 888 10 78 • Fax: 01 887 53 08 - 886 00 66
E-mail: inpi @ mail. telepac. pt

INPI 254

INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

**FOLHA DO RESUMO (Continuação)**

| PAT. INV. | MOD. UTI. | MOD. IND. | DES. IND. | TOP. SEMIC. | CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51) |
|---|---|---|---|---|---|
| ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | |
| | | N.º Objectos ☐ | N.º Desenhos ☐ | | |
| N.º ☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐ (11) | | DATA DO PEDIDO __/__/__ (22) | | | |

**RESUMO** (continuação) (57)

terapêuticos e/ou profilácticos contra diversas doenças. A invenção proporciona também métodos para a utilização dos anticorpos e dos antagonistas para inibir o Fα-H1CT para fins terapêuticos.

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

## Descrição

### "Factor alfa H1 do crescimento transformante"

A presente invenção diz respeito a novos polinucleótidos recentemente identificados, a polipeptidos codificados por tais polinucleótidos, à utilização de tais polinucleótidos e polipeptidos e também à produção desses polinucleótidos e polipeptidos. Mais particularmente, o polipeptido da presente invenção é o factor alfa-H1 do crescimento transformante humano (Fα-H1CT, em inglês TGFα-H1). A invenção também diz respeito à inibição da acção de tais polipeptidos.

O Fα-H1CT é um membro novo da família dos factores de crescimento epidermal (FCE). A família dos supergenes dos factores de crescimento epidermal (FCE) abrange um grande número de factores de crescimento importantes sob o ponto de vista médico, incluindo a subfamília dos factores α do crescimento transformante (FαCT).

A família dos factores de crescimento epidermal (FCE) compreende anfirregulina, cripto, herregulina e o FCE de ligação à heparina, para além do FαCT. O membro desta família que foi descoberto mais recentemente é a betacelulina que foi purificada a partir de meios condicionados de células beta do tumor pancreático do murganho (Sasada *et al.*, B.B.R.C. 190:1173-9 (1993)). Concluiu-se que este gene era expresso nos tecidos dos rins e do fígado e também noutras linhagens de células tumorais.

A anfirregulina purificada, estrutural e funcionalmente caracterizada, está descrita na patente de invenção norte-americana nº 5 115 096 concedida a 19 de Maio de 1992. A anfirregulina é um factor regulativo do crescimento de células bifuncionais, que exibe uma

poderosa actividade inibitiva da síntese do ADN em células neoplásicas, ao mesmo tempo que favorece o crescimento de determinadas células normais. O gene da anfirregulina foi clonado e utilizado para construir plasmídeos que comandam a expressão da anfirregulina bioactiva em células transformadas de *E. coli*.

O FαCT possui efeitos biológicos pleiotrópicos. A produção de determinados membros da família dos FαCT é por vezes elevada em algumas situações patológicas, tais como cancros, doenças da pele, doenças oculares e também no local de uma inflamação ou na cicatrização de ferimentos. Os membros da família FαCT e os seus receptores cognados foram já estudados exaustivamente ao longo de vários anos e recentemente foram publicadas revistas especializadas no assunto (Pringent e Lemoine, 'Progress in Growth Factor Research' 4:1-24 (1992); Schultz *et al.*, 'J. Cell. Biochem.' 45:346-352 (1991); Derynck, R., 'Mol. Reprod. and Dev.' 27:3-9 (1990)).

O FαCT é expresso, nos adultos normais, numa grande variedade de tecidos, incluindo a pele, o cérebro, a mucosa gastrointestinal, os tecidos da mama (incluindo a mama de virgens, grávidas e de lactantes), os macrófagos activados e os ceratinócitos, possuindo também o FαCT actividade angiogénica (Kudlow, J.E. e Bjorge, J.D., 'Seminars in Cancer Biology', 1:293--302 (1990).

Para além do seu envolvimento no combate à proliferação celular em diversos casos patológicos, os factores de crescimento da família FαCT são importantes para a embriogénese e para a manutenção da fisiologia normal dos adultos. Estes factores de crescimento influenciam diversos processos; há provas que sugerem que os FαCT estão implicados em vários aspectos da embriogénese, uma vez que são expressos nos oócitos não fertilizados, nos embriões antes da implantação e na decídua materna onde desempenham um papel na implantação ou no desenvolvimento da placenta. O murganho transgénico (murganho "transordinário"), ao qual falta

um gene funcional de FαCT, tem uma arquitectura anormal da pele, pêlo ondulado, bigodes encaracolados e desenvolve frequentemente uma inflamação da córnea, sugerindo estas observações que o FαCT desempenha um papel fundamental na determinação da arquitectura da pele e na regulação do desenvolvimento do pêlo (Mann *et al.*, Cell 73:249-261 (1993)). Muitos dos membros da família dos factores α do crescimento transformante são factores autócrinos e/ou paracrinos para as células cancerosas de muitos tecidos, tais como os da mama (FαCT), cólon (cripto) e pâncreas (betacelulina). A betacelulina é um mitogénio potente para as células epiteliais dos pigmentos da retina e para as células da musculatura lisa vascular (Shing *et al.*, Science, 259:1604-1607 (1993); e a anfirregulina (AR) possui propriedades quer estimuladoras do crescimento quer inibidoras do crescimento, dependendo isso das células visadas que estejam a ser testadas e da concentração de AR aplicada às células (Shoyab *et al.*, Science 243:1074--1076 (1989)). Por exemplo, a AR estimula a proliferação dos fibroblastos do prepúcio dos seres humanos, ao mesmo tempo que se sabe também que a AR inibe o crescimento da linhagem de células A431.

Além disso, os factores de crescimento FαCT estão relacionados com os seguintes estados patológicos: a) tumores; estudos recentes comprovaram que a administração de agentes que antagonizem a actividade dos FαCT (e/ou dos membros desta família) nos murganhos determina a regressão do tumor (Cook *et al*, Cancer Research, 52:3224-3227 (1992)); b) doenças da pele, por exemplo, a psoríase (Cook *et al*, Cancer Research, 52:3224-3227 (1992)); e c) a cicatrização de ferimentos (Schultz *et al.*, J. Cell. Biochem. 45:346-352 (1991).

O factor alfa do crescimento transformante de tipo humano (FαCT) é uma pequena proteína mitogénica de 6 kda que contém 50 aminoácidos e três pontes dissulfureto. O FαCT interactua com o receptor do FCE e activa a sua proteína-cinase intrínseca. O papel do FαCT

na fisiologia normal foi já descrito por Kudlow, J.E. e Bjorge, J.D., 'Cancer Biology', 1:293--302 (1990). A expressão do FαCT é mais prevalecente e abundante em tumores e células transformadas, mas também é detectável em níveis relativamente baixos ou moderados em determinados tecidos normais de adultos (cérebro, ceranócitos, células epiteliais, macrófagos activados, pituitária). A expressão do FαCT também é detectável nos embriões em desenvolvimento em momentos específicos e em tecidos específicos, mais notavelmente no cérebro, nos rins e no fígado em desenvolvimento.

Comprovou-se que quase todos os membros desta família que foram purificados e clonados até ao momento presente contêm 6 resíduos cisteína conservados que formam pontes dissulfureto para criarem três laços peptídicos, possuindo assim uma estrutura secundária semelhante. Além disso, todos estes factores de crescimento são sintetizados sob a forma de um percursor glicosilado muito maior ligado às membranas. O Fα-H1CT contém a totalidade destes resíduos cisteína conservados.

Esta família de factores de crescimento interactua com a família dos receptores de FCE que compreende também os c-erb-2 e c-erb-3, os ligandos para os quais não foram identificados (Prigent e Lemoine, 'Prog. in Growth Factor Res.', 4:1-24 (1992)). O envolvimento destes receptores nas neoplasias humanas tem sido profusamente estudado e concluiu-se que a expressão excessiva destes receptores estava associada a um prognóstico fraco para algumas formas de cancro (Holmes *et al.*, Science, 256:1205-1210 (1992)). Concluiu-se também que havia algumas células tumorais que sintetizavam de forma significativa níveis elevados de FαCT e/ou outros membros desta família.

De acordo com um dos seus aspectos, a presente invenção proporciona um novo polipeptido plenamente desenvolvido (maduro) que é um factor alfa H1 do crescimento transformante humano (Fα-H1CT) e também os seus fragmentos, análogos e derivados.

De acordo com outro dos seus aspectos, a presente invenção proporciona polinucleótidos (ADN ou ARN) que codificam tais polipeptidos.

De acordo com um outro dos seus aspectos, a presente invenção proporciona um polipeptido que é um fragmento solúvel de Fα-H1CT, isto é, Fα-H1CT sem a parte transmembranar.

Ainda de acordo com um outro dos seus aspectos, a presente invenção proporciona um procedimento para a produção desses polipeptidos por técnicas recombinantes.

Ainda de acordo com mais outro dos seus aspectos, a presente invenção proporciona um processo para a utilização de tais polipeptidos, ou polinucleótidos que codificam esses polipeptidos, para a preparação de composições para fins de diagnóstico e terapêuticos, por exemplo, para estimular a cicatrização de ferimentos, para restabelecer o funcionamento neurológico normal após traumas ou demência induzida pela SIDA, para o tratamento de doenças oculares, para definir determinadas células como alvos e para as aniquilar, para tratar doenças dos rins e do fígado e para favorecer o desenvolvimento dos folículos pilosos.

Ainda de acordo com mais um outro dos seus aspectos, a presente invenção proporciona um anticorpo contra o Fα-H1CT ou um seu fragmento solúvel.

Estes e outros aspectos da presente invenção devem ser evidentes para os especialistas na matéria, à luz dos preceitos aqui descritos.

Os desenhos adiante apresentados têm apenas por finalidade ilustrar casos específicos da presente invenção e não são de forma alguma limitativos.

A figura 1 ilustra a tradução dos aminoácidos previstos do bloco de leitura ininterrupta do ADNc do Fα-H1CT. A numeração começa na posição 7 devido ao ligador BamHI sintético nas posições 1-6 (não representado) que foi utilizado para clonar o gene. Também está indicado o codão de paragem final na posição 406. A sequência representada codifica 132 aminoácidos.

Efectuando a comparação com outros membros da família de genes FαCT é possível concluir que apenas os 50 aminoácidos que estão sublinhados são necessários para a produção de um factor de crescimento biologicamente activo solúvel (ver a figura 3).

A figura 2 ilustra a sequência completa de nucleótidos, constituída pelos 3286 nucleótidos de ADNc do Fα-H1CT. O ligador BamHI sintético na posição 1 e o ligador XhoI sintético na posição 3286 estão representados a negrito. O bloco de leitura ininterrupta que codifica a proteína Fα-H1CT está sublinhado, seguido pelo codão de paragem final (representado a negrito). Na região comprida não traduzida de 3' as incertezas existentes na sequência estão representadas utilizando os códigos convencionais da 'IUPAC'.

A figura 3 apresenta o alinhamento do Fα-H1CT com outros membros da família de genes FαCT. Os asteriscos indicam as posições dos 6 resíduos cisteína conservados críticos que são necessários para a actividade biológica desta família de moléculas de factores de crescimento. Os 50 resíduos aminoácidos do FαCT que estão sublinhados são os resíduos para os quais se comprovou que eram necessários para a actividade do factor de crescimento solúvel (Amphi = anfirregulina).

A figura 4 ilustra os resultados de uma análise pela autorradiografia à Northern que mostra o padrão de expressão do ARN do polipeptido da presente invenção.

O polinucleótido da presente invenção foi descoberto em bancos de ADNc obtidos a partir de tecidos de fetos e de cérebros humanos. Está estruturalmente relacionado com a família de genes FαCT. Contém um bloco de leitura ininterrupta que codifica um polipeptido maduro de 132 aminoácidos que revela uma homologia significativa com diversos membros da família de genes FαCT; estes membros compreendem o próprio FαCT e também outros

membros, tais como a anfirregulina e o cripto. Além disso, os seis resíduos cisteína que ocorrem em todos os membros, segundo um motivo característico, são conservados no Fα-H1CT.

Na figura 1, os 50 aminoácidos que se encontram sublinhados constituem um fragmento solúvel do Fα-H1CT, isto é, sem a parte transmembranar. Tal como sucede com o FαCT, também a forma solúvel do Fα-H1CT é libertada a partir de um precursor maior da glicoproteína de aminoácidos da membrana integral, por clivagem proteolítica. Derynck, R., Mol. Reprod. and Dev., 27:3-9 (1990). (Derynck, Mol. Reprod. Dev., 27:3-9 (1990)).

O polinucleótido da presente invenção pode estar sob a forma de ARN ou sob a forma de ADN, podendo esse ADN ser ADNc, ADN genómico e ADN sintético. O ADN pode ser de cadeia dupla ou de cadeia singular e se for de cadeia singular pode ser a cadeia codificadora ou a cadeia não codificadora (anti-sentido). A sequência codificadora que codifica o polipeptido maduro pode ser idêntica à sequência codificadora ilustrada na figura 1 ou pode ser a do clone depositado ou pode ser uma sequência codificadora diferente que codifique, como resultado da redundância ou da degeneração do código genético, o mesmo polipeptido maduro codificado pelo ADN da figura 1 ou pelo ADNc depositado.

O polinucleótido que codifica o polipeptido maduro da figura 1 ou um seu fragmento solúvel pode compreender: apenas a sequência que codifica o polipeptido maduro ou uma sua forma solúvel; a sequência codificadora do polipeptido maduro ou uma sua forma solúvel e uma sequência codificadora suplementar, tal como uma sequência líder ou secretória ou uma sequência de uma pro-proteína; a sequência codificadora do polipeptido maduro ou uma sua forma solúvel (e facultativamente uma sequência codificadora suplementar) e uma sequência não codificadora, tal como a sequência dos intrões ou a sequência não codificadora de 5' e/ou 3' da sequência codificadora do polipeptido maduro.

Assim sendo, o termo "polinucleótido que codifica um polipeptido" designa um polinucleótido que inclui apenas a sequência codificadora do polipeptido e também um polinucleótido que inclui uma sequência suplementar codificadora e/ou não codificadora.

A presente invenção também diz respeito a polinucleótidos que possuem uma sequência que é pelo menos 95% idêntica à de um polinucleótido, tal como definido antes. Assim, a presente invenção ainda diz respeito às variantes dos polinucleótidos supramencionados que codificam os fragmentos, os análogos e os derivados do polipeptido que possuam a sequência deduzida de aminoácidos da figura 1 ou uma sua forma solúvel. A variante do polinucleótido pode ser uma variante alélica do polinucleótido que ocorra naturalmente ou pode ser uma variante do polinucleótido que ocorra de uma forma não natural.

A presente invenção compreende os polinucleótidos que codificam o mesmo polipeptido maduro, ou uma sua forma solúvel, que está ilustrado na figura 1.

Conforme se disse antes, o polinucleótido pode ter uma sequência codificadora que seja uma variante alélica, que ocorra naturalmente, da sequência codificadora ilustrada na figura 1.

Conforme é sabido na especialidade, uma variante alélica é uma forma alternativa de uma sequência de polinucleótidos em que pode haver uma substituição, uma supressão ou uma adição de um ou vários nucleótidos, desde que isso não altere substancialmente a actividade do polipeptido codificado.

A presente invenção também compreende os polinucleótidos em que a sequência codificadora do polipeptido maduro pode estar fundida no mesmo bloco de leitura com uma sequência de polinucleótidos que auxilie a expressão e a secreção de um polipeptido a partir de uma célula hospedeira, por exemplo, uma sequência líder que funcione como sequência

secretória para controlar o transporte de um polipeptido a partir da célula. O polipeptido que possui uma sequência líder é uma pré-proteína e pode ter a sequência líder clivada pela célula hospedeira para originar a forma madura do polipeptido. Os polinucleótidos também podem codificar uma pró-proteína que seja a proteína madura mais os resíduos aminoácidos suplementares em 5'. Uma proteína madura que possua uma pró-sequência é uma pró-proteína e é uma forma inactiva da proteína. Logo que a pró-sequência tenha sido clivada, permanece a proteína madura activa.

Assim, por exemplo, o polinucleótido da presente invenção pode codificar uma proteína madura ou pode codificar uma proteína que tenha uma pró-sequência ou pode codificar uma proteína que tenha simultaneamente uma pró-sequência e uma pré-sequência (sequência líder).

Os polinucleótidos da presente invenção também podem possuir a sequência codificadora fundida no bloco com uma sequência marcadora que permita a purificação do polipeptido da presente invenção. A sequência marcadora pode ser um identificador hexa-histidina fornecido por um vector pQE-9 para permitir a purificação do polipeptido maduro fundido com o marcador, no caso de um hospedeiro bacteriano, ou então, por exemplo, a sequência marcadora pode ser um identificador hemaglutinina (HA), no caso de se utilizar como hospedeiro um mamífero, *v.g.*, células COS-7. O identificador HA corresponde a um epítopo derivado da proteína hemaglutinina da gripe (Wilson, I. *et al.*, Cell, 37:767 (1984)).

A presente invenção também diz respeito a polinucleótidos que hibridam, em condições rigorosas, com os polinucleótidos supramencionados. Tal como aqui utilizado, o termo "condições rigorosas" designa a hibridação que irá ocorrer apenas se houver pelo menos 95% e de preferência se houver pelo menos 97% de identidade entre as sequências. Os polinucleótidos que hibridam com os polinucleótidos supramencionados, numa variante preferida, codificam polipeptidos

que conservam praticamente a mesma função ou actividade biológica do polipeptido maduro codificado pelo ADNc da figura 1 ou pelo ADNc depositado.

A presente invenção também diz respeito a um polipeptido Fα-H1CT que é codificado por um polinucleótido de acordo com a invenção.

O polipeptido da presente invenção pode ser um polipeptido recombinante, um polipeptido natural ou um polipeptido sintético e de preferência é um polipeptido recombinante.

O polipeptido de acordo com a invenção pode compreender um ou vários resíduos aminoácidos onde haja um grupo substituinte, ou pode ser um polipeptido em que o polipeptido maduro esteja fundido com outro composto, tal como um composto para aumentar o período de semi-vida do polipeptido (por exemplo, o polietileno-glicol), ou pode ser um polipeptido em que outros aminoácidos estejam fundidos com o polipeptido maduro, tal como uma sequência líder ou secretória ou uma sequência que seja utilizada para a purificação do polipeptido maduro ou uma sequência de uma pró-proteína.

Os polipeptidos e polinucleótidos da presente invenção são fornecidos preferencialmente numa forma isolada e preferencialmente são purificados até se obter homogeneidade.

O termo "isolado" significa que o material é removido do seu ambiente original (*v.g.*, o ambiente natural, se ocorrer naturalmente). Por exemplo, um polinucleótido ou um polipeptido que ocorra naturalmente e que se encontre presente num animal vivo não está isolado, mas esse mesmo polinucleótido ou ADN ou polipeptido, separado de uma parte ou da totalidade dos materiais coexistentes no sistema natural, está isolado. Tal polinucleótido pode fazer parte de um vector e/ou tal polinucleótido ou polipeptido pode fazer parte de uma composição e mesmo assim ser considerado isolado, desde que esse vector ou essa composição não façam parte do seu ambiente natural.

A presente invenção também diz respeito a vectores que compreendem os polinucleótidos da presente invenção, às células hospedeiras que são geneticamente manipuladas com os vectores da invenção e à produção de polipeptidos da invenção por meio de técnicas recombinantes.

As células hospedeiras são geneticamente manipuladas (transduzidas ou transformadas ou transfectadas) com os vectores da presente invenção que podem ser, por exemplo, um vector de clonagem ou um vector de expressão. O vector pode estar, por exemplo, na forma de um plasmídeo, uma partícula viral, um fago, etc.. As células hospedeiras manipuladas podem ser criadas em cultura em meios nutrientes convencionais modificados convenientemente para activar os promotores, seleccionar os transformantes ou amplificar o gene Fα-H1CT. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e outras que tais, são as anteriormente utilizadas com a célula hospedeira seleccionada para a expressão e são evidentes para qualquer técnico nesta matéria.

Os polinucleótidos da presente invenção podem ser utilizados para a produção de um polipeptido por técnicas recombinantes. Assim, por exemplo, a sequência de polinucleótidos pode ser incorporada num veículo de expressão seleccionado entre vários, em particular os vectores ou os plasmídeos para a expressão de um polipeptido. Tais vectores compreendem as sequências de ADN cromossómico, não cromossómico e sintético, *v.g.*, derivados de VS40 (em inglês SV40); plasmídeos bacterianos, ADN de fagos; plasmídeos de leveduras; vectores obtidos a partir de combinações de ADN de plasmídeos e de fagos, ADN viral, por exemplo, do vírus de *vaccinia*, adenovírus, avipoxvírus e pseudo-raiva. No entanto, é possível utilizar qualquer outro plasmídeo ou vector, desde que seja replicável e viável no hospedeiro.

A sequência de ADN adequada pode ser inserida no vector por diversos métodos. Em geral, insere-se a sequência de ADN no local da endonuclease de restrição conveniente, por

procedimentos conhecidos na especialidade. Considera-se antecipadamente que esses e outros procedimentos são do conhecimento dos especialistas na matéria.

A sequência de ADN no vector de expressão está funcionalmente ligada a uma ou várias sequências adequadas (promotores) de controlo da expressão para comandar a síntese de ARNm. Como exemplos representativos de tais promotores é possível enumerar: o promotor de RTL ou VS40 (em inglês respectivamente LTR ou SV40), o promotor lac ou trp de *E. coli*, o promotor $P_L$ do bacteriófago lambda e outros promotores sobre os quais se sabe que regulam a expressão de genes em células procarióticas ou eucarióticas, ou seus vírus. O vector de expressão também contém um local de ligação ribossómico para o início da tradução e um terminador da tradução. O vector também pode conter sequências adequadas para amplificar a expressão.

Além disso, os vectores de expressão contêm preferencialmente um gene que confere uma característica fenotípica para a selecção de células hospedeiras transformadas, tal como a resistência à neomicina ou à di-hidrofolato-redutase, para a cultura de células eucarióticas, ou tal como a resistência à tetraciclina ou à ampicilina em *E. coli*.

O vector que contém a sequência de ADN adequada, tal como aqui se descreveu, e também um promotor ou uma sequência de controlo convenientes, podem ser utilizados para transformar um hospedeiro adequado para permitir que o hospedeiro exprima a proteína. Como exemplos representativos de hospedeiros adequados é possível enumerar: células de bactérias, tais como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*; *Streptomyces*; células de fungos, tais como leveduras; células de insectos, tais como *Drosophila* e *Sf9*; células de animais, tais como as de OCC (em inglês CHO), COS ou do melanoma de Bowes; células de plantas, etc.. Admite-se antecipadamente que a selecção de um hospedeiro conveniente é um assunto da competência dos especialistas na matéria, à luz dos preceitos aqui descritos.

Mais particularmente, a presente invenção compreende também arquétipos recombinantes que incorporam uma ou várias das sequências anteriormente descritas na sua generalidade. Tais arquétipos compreendem um vector, por exemplo, um vector plasmídico ou viral, no qual se inseriu uma sequência da invenção, com uma orientação directa ou reversa. De acordo com um aspecto preferido desta variante, o arquétipo compreende também sequências regulativas incluindo, por exemplo, um promotor funcionalmente ligado à sequência. Há inúmeros vectores e promotores adequados que são conhecidos pelos especialistas na matéria e que estão disponíveis nos circuitos comerciais. A título de exemplo indica-se seguidamente alguns vectores. Bacterianos: pQE70, pQE60, PQE-9 (Qiagen), Pbs, 'phagescript', PsiX174, 'Pbluescript SK', pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eucarióticos: pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). No entanto, é possível utilizar qualquer outro plasmídeo ou vector, desde que seja replicável e viável no hospedeiro.

As regiões promotoras podem ser seleccionadas a partir de qualquer gene desejado, utilizando vectores de CAT (cloranfenicol-transferase) ou outros vectores com marcadores seleccionáveis. Como exemplos de dois vectores convenientes refere-se o pKK232-8 e o pCM7. Os promotores particulares designados por promotores bacterianos compreendem lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda $P_R$, $P_L$ e trp. Os promotores eucarióticos compreendem o CMV antecipativo imediato, a timidina-cinase do VSH (em inglês HSV), os VS40 antecipativo e postecipativo, as RTL provenientes de retrovírus e a metalotioneina I do murganho. A selecção do vector e do promotor convenientes é um assunto da competência dos técnicos desta especialidade.

De acordo com outra variante, a presente invenção diz respeito a células hospedeiras que contêm o arquétipo descrito *supra*. A célula hospedeira pode ser uma célula eucariótica

superior, tal como uma célula de mamífero, ou pode ser uma célula eucariótica inferior, tal como uma célula de levedura, ou então a célula hospedeira pode ser uma célula procariótica, tal como uma célula bacteriana. A introdução do arquétipo na célula hospedeira pode ser efectuada pelo método de transfecção com fosfato de cálcio, pelo método de transfecção mediada por DEAE-dextrano ou por electroporação (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, 1986)).

Os arquétipos inseridos nas células hospedeiras podem ser utilizados de uma forma convencional para a produção de um produto génico codificado pela sequência recombinante. Em alternativa, os polipeptidos da presente invenção podem ser produzidos por via sintética, utilizando-se para tal sintetizadores convencionais de péptidos.

As proteínas maduras podem ser expressas em células de mamíferos, leveduras, bactérias ou outras células sob o controlo de promotores adequados. Também é possível utilizar sistemas de tradução sem células para a produção de tais proteínas, utilizando os ARN obtidos a partir dos arquétipos de ADN da presente invenção. Os vectores adequados de clonagem e de expressão utilizáveis com hospedeiros procarióticos e eucarióticos foram descritos por Sambrook *et al.* na obra 'Molecular Cloning: A Laboratory Manual', segunda edição (Cold Spring Harbor, N.I., 1989), cujo conteúdo se considera aqui incorporado por referência.

Aumenta-se a transcrição de um ADN codificador dos polipeptidos da presente invenção, pelos hospedeiros eucariotas superiores, inserindo no vector uma sequência intensificadora. Os intensificadores são elementos de ADN que actuam em posição cis, possuindo normalmente entre 10 e 300 pb aproximadamente, que actuam sobre um promotor para aumentar a sua transcrição. Como exemplos refere-se o intensificador VS40 no lado final da origem de replicação (pb 100 a 270), um intensificador do promotor antecipativo de citomegalovírus, um

intensificador de polioma no lado final da origem de replicação e os intensificadores de adenovírus.

De um modo geral, os vectores de expressão recombinantes irão conter origens de replicação e marcadores seleccionáveis que permitam a transformação da célula hospedeira, *v.g.*, o gene de *E. coli* e o gene TRP1 de *S. cerevisiae* de resistência à ampicilina e um promotor obtido a partir de um gene fortemente expresso para comandar a transcrição de uma sequência estrutural a jusante. Tais promotores podem ser obtidos a partir de operões que codificam enzimas glicolíticas, tais como a 3-fosfoglicerato-cinase (PGK), o factor α, a fosfatase ácida e as proteínas do choque térmico, entre outros. A sequência estrutural heteróloga é montada numa fase adequada com as sequências de início e de terminação da tradução e de preferência com uma sequência líder capaz de comandar a secreção da proteína traduzida no interior do espaço periplásmico ou no meio extracelular. Facultativamente a sequência heteróloga pode codificar uma proteína de fusão que compreenda um péptido de identificação do terminal N que confira características desejadas, *v.g.*, estabilização ou purificação simplificada do produto recombinante expresso.

Os vectores de expressão úteis para aplicações bacterianas são construídos inserindo uma sequência de ADN estrutural que codifica uma proteína desejada conjuntamente com sinais adequados de início e de terminação da tradução em fase de leitura compatível com um promotor funcional. O vector irá conter um ou vários marcadores fenotípicos seleccionáveis e uma origem de replicação para garantir a conservação do vector e também, se desejável, para favorecer a amplificação no interior do hospedeiro. Os hospedeiros procarióticos adequados para transformação são seleccionados entre *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* e diversas espécies pertencentes aos géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Staphylococcus*, embora também possam ser utilizados outros microrganismos, consoante a conveniência.

Como exemplo representativo mas não limitativo refere-se que os vectores de expressão úteis para aplicações bacterianas podem compreender um marcador seleccionável e uma origem de replicação bacteriana provenientes de plasmídeos existentes nos circuitos comerciais que compreendem elementos genéticos do vector de clonagem pBR322 (ATCC 37017) bem conhecido. Tais vectores comerciais compreendem, por exemplo, o pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala, Suécia) e o GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, E.U.A.). Estas secções "estruturais" de pBR322 são combinadas com um promotor adequado e com a sequência estrutural que se pretende exprimir.

A seguir à transformação de uma estirpe hospedeira adequada e após o desenvolvimento da estirpe hospedeira, até esta alcançar uma densidade celular conveniente, suprime-se a repressão do promotor seleccionado, trabalhando em condições adequadas (*v.g.*, mudanças de temperatura ou indução química) e a seguir cria-se as células em cultura durante um período suplementar.

De uma forma típica, realiza-se a colheita das células por centrifugação, fez-se o seu desmembramento por métodos físicos ou químicos e conserva-se o extracto impuro resultante para uma purificação subsequente.

As células microbianas utilizadas na expressão de proteínas podem ser desmembradas recorrendo a qualquer método conveniente, incluindo a prática dos ciclos de congelação--descongelação, tratamento com ultra-sons, desmembramento mecânico ou utilização de agentes apropriados para a citólise.

Também é possível utilizar diversos sistemas de cultura de células de mamíferos para a expressão da proteína recombinante. Como exemplos de sistemas de expressão existentes em mamíferos refere-se as linhagens de células COS-7 dos fibroblastos do rim do macaco, conforme

descrito por Gluzman, 'Cell', 23:175 (1981) e outras linhagens de células capazes de exprimirem um vector compatível, por exemplo, as linhagens de células C127, 3T3, OCC, HeLa e BHK. Os vectores de expressão de mamíferos irão conter uma origem de replicação, um promotor e um intensificador convenientes e também todos os locais necessários de ligação ribossómicos, locais de poliadenilação, locais de junção de dador e aceitador, sequências de terminação transcricionais e sequências não transcritas que flanqueiam em 5'. É possível utilizar sequências de ADN obtidas a partir do genoma viral VS40, por exemplo, os locais da origem VS40, do promotor antecipativo, do intensificador, de junção e de poliadenilação, para fornecer os necessários elementos genéticos não transcritos.

Recupera-se o Fα-H1CT, ou a sua forma solúvel, e purifica-se a partir de culturas de células recombinantes por métodos até agora praticados, incluindo a precipitação com sulfato de amónio ou em etanol, a extracção em meio ácido, a cromatografia de permuta aniónica ou catiónica, a cromatografia em fosfocelulose, a cromatografia por interacção hidrofóbica, a cromatografia por afinidade (*v.g.*, utilizando ADN ou nucleótidos sobre um suporte sólido), a cromatografia com hidroxiapatite e a cromatografia com lectina. É preferível trabalhar com concentrações fracas (aproximadamente entre 0,1 e 5 mM) do ião cálcio presente durante a purificação (Price *et al.*, J. Biol. Chem., 244:917 (1969)). Se necessário, é possível realizar passos de redobramento de proteínas para se completar a configuração da proteína madura. Finalmente, nos passos finais de purificação pode ser praticada a cromatografia em líquido de elevado rendimento (CLER).

O polipeptido da presente invenção pode ser um produto purificado naturalmente ou pode ser um produto obtido por meio de procedimentos de síntese química ou pode ser produzido por técnicas recombinantes a partir de um hospedeiro procariótico ou eucariótico (por exemplo,

células de bactérias, leveduras, plantas superiores, insectos e mamíferos, criadas em cultura). Consoante o hospedeiro utilizado num procedimento de produção por via recombinante, assim os polipeptidos da presente invenção podem ser glicosilados com hidratos de carbono provenientes de mamíferos ou de outros seres eucarióticos, ou podem ser não glicosilados. Os polipeptidos da presente invenção também podem conter um resíduo aminoácido metionina inicial.

Os polipeptidos da presente invenção podem ser utilizados para a caracterização de receptores da família de receptores de FCE (RFCE). Esta família compreende vulgarmente os receptores R1FCE, R2FCE, R3FCE e R4FCE. O receptor R2FCE também é designado por erb-2 e a sua molécula é útil em diversas aplicações de diagnóstico e terapêuticas (Prigent, S.A. e Lemoine, N.R., Prog. In Growth Factor Res., 4:1-24 (1992)). O polipeptido Fα-H1CT é provavelmente um ligando para um ou vários desses receptores e também para novos receptores ainda não identificados, de tipo FCE. A utilização do polipeptido Fα-H1CT pode ajudar a identificar, caracterizar e clonar esses receptores.

Os polipeptidos da presente invenção também podem ser utilizados para a preparação de uma composição farmacêutica para restabelecer ou reforçar funções neurológicas comprometidas devido a traumas ou a outras patologias degenerescentes (tais como a demência associada à SIDA, a demência senil, etc.). Concluiu-se que o FαCT e os seus homólogos eram os ligandos mais abundantes para o receptor de FCE/FαCT nas partes mais importantes do cérebro (Kaser *et al.*, 'Brain Res. Mol. Brain Res.' 16:316-322 (1992)). Parece haver uma distribuição disseminada de FαCT em diversas regiões do cérebro, em contraste com o FCE que apenas se encontra presente em áreas menores e mais discretas, sugerindo isso que o FαCT pode desempenhar eventualmente um papel fisiológico nos tecidos cerebrais. Estes inúmeros locais receptores

para o FαCT no cérebro sugerem que o FCT tem uma utilidade importante no favorecimento da diferenciação e da actividade das células cerebrais normais. Assim sendo, nos casos em que a actividade neurológica esteja comprometida, uma administração do polipeptido da presente invenção pode eventualmente estimular o cérebro e reforçar as funções fisiológicas convenientes.

Também é possível utilizar o F-H1CT, ou a sua forma solúvel, para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de uma doença ocular, por exemplo, uma inflamação da córnea. Diversas experiências realizadas permitiram associar membros da família do gene FαCT a essas patologias. Há um documento recente que resume alguns dos dados relacionados com o papel que estes factores de crescimento desempenham nas doenças oculares (Mann *et al.*, Cell 73:249-261 (1993)). Experiências recentes vieram demonstrar que diversos murganhos aos quais lhes falta o gene FαCT manifestam inflamação da córnea devido a uma infiltração de leucócitos e de outras células que vão afectar a substância própria dos olhos.

Além disso, é possível explorar a especificidade dos factores de crescimento FαCT para as suas células destinatárias, como um mecanismo para a destruição das células destinatárias visadas. Por exemplo, na composição farmacêutica de acordo com a invenção é possível acoplar o Fα--H1CT, ou as suas formas solúveis (por meio de diversos métodos possíveis), a moléculas tóxicas, por exemplo, radioisótopos farmacêuticos que inactivem as células destinatárias relevantes. Estas fusões de tipo factor de crescimento-toxina vão aniquilar a célula visada (e em certos casos as células vizinhas, através de diversos efeitos "colaterais"). Há um exemplo recente deste tipo de fusões entre toxinas-genes que foi publicado por Mesri *et al.*, J. Biol. Chem. 268:4853-62 (1993).

Posto isto, o Fα-H1CT pode ser utilizado para a preparação de uma composição farmacêutica onde esteja integrado como composto antineoplásico. Uma tal composição

farmacêutica de acordo com a invenção pode ser concebida para administração por diversas vias, por exemplo, por injecção, infusão, por via tópica ou parentérica, etc., mas sem que isso constitua qualquer limitação. A administração pode ser feita em qualquer veículo fisiologicamente aceitável, incluindo os solutos salinos tamponados com fosfato, soluto salino simples, água esterilizada, etc.. A composição farmacêutica também pode conter o Fα-H1CT e moléculas congéneres encapsuladas em lipossomas ou conjugadas com anticorpos que reconheçam e se liguem a tumores ou aos antigénios específicos de células, proporcionando assim um sistema para "visar" células.

O fragmento polipeptídico de Fα-H1CT também pode ser utilizado para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de determinadas doenças dos rins, uma vez que se concluiu que há expressão destes factores de crescimento nos rins. Assim sendo, estes factores podem ser eventualmente necessários para a correcta manutenção fisiológica deste órgão. O polipeptido da invenção também pode ser utilizado para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças relacionadas com a regeneração hepática/ /disfunção hepática, uma vez que o FαCT e os seus homólogos e o factor de crescimento dos hepatócitos desencadeiam a regeneração de hepatócitos após uma hepatectomia parcial e a seguir a uma necrose aguda das células hepáticas (Masushara, M. *et al.*, Hepatology 16:1241--1249 (1992)).

Há uma utilização importante para o Fα-H1CT que está relacionada com a preparação de composições farmacêuticas para a cicatrização de ferimentos. As composições da presente invenção podem ser utilizadas para o tratamento de uma grande variedade de ferimentos, incluindo praticamente todos os ferimentos cutâneos, os ferimentos da córnea e as lesões provocadas aos órgãos corporais ocos recobertos pelo epitélio. As lesões convenientes para o

tratamento são as que tenham resultado de traumas, tais como queimaduras, abrasão e golpes, e também as que tenham resultado de procedimentos cirúrgicos, tais como as incisões cirúrgicas e os enxertos de pele. Os outros casos adequados para o tratamento com o polipeptido da presente invenção são as situações crónicas, tais como as úlceras crónicas, as úlceras diabéticas e outros casos em que não haja cicatrização (tróficos).

Na composição farmacêutica de acordo com a presente invenção, o Fα-H1CT ou um seu fragmento solúvel pode ser incorporado em veículos fisiologicamente aceitáveis para aplicação à zona afectada. A natureza dos veículos pode variar de uma forma bastante ampla e irá depender do local de aplicação em causa. Para uma aplicação à pele é normalmente preferível utilizar uma base para cremes ou para unguentos; as bases adequadas são seleccionadas entre lanolina, 'Silvadene' (Marion) (particularmente para o tratamento de queimaduras), 'Aquaphor' (Duke Laboratories, South Norwalk, Conn.) e outras que tais. Se desejado, é sempre possível incorporar composições que contenham o Fα-H1CT em ligaduras ou pensos para ferimentos para que estes fiquem expostos ao péptido de uma forma contínua. Também são utilizáveis aplicações em aerossóis.

A concentração do Fα-H1Ct na composição farmacêutica não é crítica, mas deve ser suficiente para induzir a proliferação das células epiteliais. As composições podem ser adequadas para aplicação tópica à zona afectada, *v.g.*, podem ser concebidas tipicamente como gotas oculares que irão ser administradas aos olhos, ou podem ser concebidas como cremes, unguentos ou loções cuja administração se faz sobre a pele. No caso dos olhos, a composição farmacêutica é concebida para um tratamento frequente, significando isto que irá ser aplicada normalmente a intervalos de quatro horas ou menos. Na pele é desejável manter permanentemente a composição de tratamento sobre a zona afectada durante a cicatrização, fazendo-se as aplicações da composição de tratamento duas a quatro vezes por dia ou mais frequentemente.

A quantidade utilizada do polipeptido em causa, presente na composição farmacêutica da invenção, irá variar com o modo de administração, o recurso a outros compostos activos e não só, estando essa quantidade compreendida geralmente no intervalo aproximado entre 1 μg e 100 μg. O polipeptido em causa pode ser utilizado na composição farmacêutica com um veículo aceitável sob o ponto de vista fisiológico, por exemplo, um soluto salino, soluções salinas tamponadas com fosfato e não só. A quantidade de composto utilizado irá ser determinada de forma empírica, com base na resposta de células *in vitro* e com base na resposta de animais experimentais aos polipeptidos em causa ou às formulações que contenham esses polipeptidos.

O Fα-H1CT ou um seu fragmento solúvel podem ser utilizados para a preparação de uma composição farmacêutica que sirva para modular a angiogénese, a ressorção óssea, a resposta imunitária e as funções efectoras sinápticas e neuronais. O Fα-H1CT também pode ser utilizado para a preparação de uma composição farmacêutica para modular a cascata do ácido araquidónico.

O F-H1CT, ou um seu fragmento solúvel, também pode ser utilizado para a preparação de uma composição farmacêutica para aplicações relacionadas com a diferenciação terminal. Há inúmeros factores FαCT e seus homólogos que induzem a diferenciação terminal nas suas células destinatárias. Esta propriedade pode ser explorada *in vivo* para administração do factor e para induzir a morte das células visadas. Este regime é promissor para doenças relacionadas com a hiperproliferação de tipos de células medicamente indesejáveis, tal como sucede com os cancros e com outras doenças proliferativas (*v.g.*, inflamação, psoríase, etc.). Para além da administração *in vivo*, há inúmeras situações em que a administração *in vitro* pode ser legítima. Por exemplo, é possível eliminar da medula óssea populações de células indesejáveis *in vitro*, tratando as células com factores de crescimento e/ou com os seus derivados.

As aplicações de composições farmacêuticas de acordo com a invenção também visam os casos de alopecia, perda de cabelo e outras doenças da pele que afectem o desenvolvimento dos folículos pilosos. Há diversas provas que apontam para o envolvimento dos factores de crescimento FαCT em tais patologias. Conforme se disse antes, os murganhos "transgénicos", manipulados de modo a não conterem nenhuma mutação num gene FαCT, revelam anomalias relacionadas com a síntese quantitativa e qualitativa de pêlo. Além do mais, estudos cartográficos feitos com murganhos demonstraram que algumas mutações afectam o mapa do crescimento de pêlo no *locus* do gene FαCT (Mann *et al.*, Cell 73:249-261 (1993)). As aplicações tópicas ou sistémicas da composição farmacêutica da invenção, que contém o Fα-H1CT ou os seus derivados, podem servir para tratar determinadas formas de alopecia e de queda de cabelo, estando estas reivindicações contidas no âmbito da presente invenção.

Determinados estados patológicos podem melhorar parcial ou totalmente, mediante a administração clínica sistémica do factor de crescimento Fα-H1CT. Em particular, a composição farmacêutica da invenção pode ser concebida para administração sob a forma de terapia com genes (ver *infra*); ou mediante a administração de péptidos ou proteínas sintetizados a partir de arquétipos recombinantes de ADN de Fα-H1CT ou pelos métodos de síntese química de péptidos (Woo *et al.*, Protein Engineering 3:29-37 (1989)).

A terapia génica é a expressão do polipeptido da presente invenção *in vivo*.

Assim, por exemplo, a composição farmacêutica pode conter células, tais como as células da medula óssea, manipuladas com um polinucleótido (ADN ou ARN) que codifique o polipeptido *ex vivo*. As células manipuladas são então administradas a um paciente que se pretenda tratar com o polipeptido. Tais métodos são perfeitamente conhecidos na especialidade. Por exemplo, as células podem ser manipuladas por meio de procedimentos conhecidos na

especialidade, mediante a utilização de uma partícula retroviral que contenha ARN que codifique o polipeptido da presente invenção.

De igual modo, a composição farmacêutica pode ser concebida para manipular células *in vivo* para expressão do polipeptido *in vivo*, por exemplo, por processos conhecidos na especialidade. Conforme é sabido no domínio da técnica, uma célula produtora que produza uma partícula retroviral que contenha ARN que codifique o polipeptido da presente invenção pode ser administrada a um paciente para manipular células *in vivo* e para a expressão do polipeptido *in vivo*.

Estes e outros métodos para a preparação de composições farmacêuticas para administrar um polipeptido da presente invenção por meio de tais métodos, são evidentes para os especialistas neste domínio, à luz dos preceitos explicitados na presente invenção. Por exemplo, o veículo de expressão para manipular células pode ser diferente de uma partícula retroviral, por exemplo, pode ser um adenovírus, o qual pode ser utilizado para manipular células *in vivo* após a sua combinação com um veículo de administração conveniente.

Em alternativa, é possível conceber a composição farmacêutica da invenção para um método de terapia génica, em que a administração do polipeptido pode ser feita por injecção directa de ADN do Fα-H1CT por si só ou encapsulado (*v.g.*, lipossomas, etc.).

O polipeptido da presente invenção pode ser utilizado em combinação com um veículo farmacêutico adequado. Tais composições incorporam uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína e um veículo ou excipiente aceitável sob o ponto de vista farmacêutico. Tal veículo compreende, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os solutos salinos, os solutos salinos tamponados, dextrose, água, glicerol, etanol e suas combinações. A formulação deve ser ajustada ao modo de administração.

A invenção proporciona também uma embalagem ou estojo farmacêutico onde estão contidos um ou vários recipientes repletos com um ou vários dos ingredientes das composições farmacêuticas da invenção. Juntamente com esses recipientes pode haver um documento que contenha as instruções prescritas por uma entidade governamental que regule o fabrico, a utilização ou a comercialização de produtos farmacêuticos ou biológicos, indicando esse documento a aprovação de fabrico, utilização ou comercialização para administração humana, por parte da referida entidade governamental. Além disso, o polipeptido da presente invenção pode ser utilizado em conjunto com outros compostos terapêuticos.

É possível determinar a concentração mais eficaz para induzir ou para inibir a proliferação de populações de células destinatárias relevantes, sensíveis ao Fα-H1CT, acrescentando quantidades variáveis de Fα-H1CT às células e monitorizando as suas respostas. Além do mais, é possível avaliar as substâncias farmacológicas que façam aumentar ou diminuir a produção de Fα-H1CT, monitorizando a síntese da proteína, ou a mensagem do Fα-H1CT, pelas células tratadas com os agentes relevantes.

As sequências da presente invenção também são valiosas para identificação cromossómica. A sequência é enviada especificamente para um local particular de um determinado cromossoma humano, com o qual pode hibridar. Além do mais, há uma necessidade permanente de identificação de locais particulares no cromossoma. São poucos os reagentes de marcação dos cromossomas, com base em dados de sequências reais (polimorfismo das repetições) que se encontram presentemente disponíveis para marcar a localização cromossómica. A cartografia dos ADN em cromossomas, de acordo com a presente invenção, constitui um primeiro passo importante no correlacionamento dessas sequências com genes associados à doença.

Dito de forma abreviada, é possível cartografar sequências em cromossomas preparando iniciadores de RCP (de preferência com 15 a 25 pb) a partir do ADNc. Recorre-se à análise

do ADNc, auxiliada por computador, para seleccionar rapidamente iniciadores que não abranjam mais do que um exão no ADN genómico, o que iria complicar o processo de amplificação. Estes iniciadores são utilizados então para pesquisar, por RCP, os híbridos de células somáticas que contenham cromossomas humanos individuais. Apenas os híbridos que contenham o gene humano correspondente ao iniciador irão proporcionar um fragmento amplificado.

A cartografia de híbridos de células somáticas por RCP é um procedimento rápido para se atribuir um ADN particular a um cromossoma particular. Utilizando a presente invenção com os mesmos iniciadores oligonucleotídicos, é possível conseguir a sublocalização com painéis de fragmentos provenientes de cromossomas específicos ou de misturas de grandes clones genómicos, de uma forma análoga. As outras estratégias de cartografia que também é possível utilizar para cartografar os seus cromossomas são a hibridação *in situ*, a pesquisa prévia com cromossomas agrupados ordenadamente e marcados e a pré-selecção por hibridação para se construir os bancos de ADNc específicos dos cromossomas.

É possível recorrer à hibridação com fluorescência *in situ* (HFIS, em inglês FISH) de um clone de ADNc com uma multiplicação cromossómica metafásica para se conseguir uma localização cromossómica exacta num passo só. Esta técnica pode ser utilizada com um ADNc que não tenha mais de 500 a 600 bases; no entanto, para os clones com mais de 2000 pb é maior a probabilidade de se ligarem a um único local cromossómico com uma intensidade de sinal suficiente para uma detecção simples. A técnica de HFIS requer a utilização do clone a partir do qual se obteve o 'EST', e quanto maior melhor. Por exemplo, 2000 pb é bom, 4000 pb é melhor e mais de 4000 pb não irá provavelmente ser necessário para se conseguir obter bons resultados num período razoável. Para um estudo desta técnica veja-se Verma *et al.*, 'Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques', Pergamon Press, Nova Iorque (1988).

Logo que uma sequência tenha sido cartografada com uma localização cromossómica exacta, é possível correlacionar a posição física da sequência no cromossoma com os dados do mapa genético. (Tais dados podem ser encontrados, por exemplo, na obra de V. McKusick 'Mendelian Inheritance in Man' (disponível por consulta electrónica directa à biblioteca médica de "Johns Hopkins University Welch"). As relações entre genes e doenças que tenham sido cartografados para a mesma região cromossómica são depois identificadas por análise de concatenação (co-hereditariedade de genes fisicamente adjacentes).

A seguir é necessário determinar as diferenças existentes nas sequências de ADNc ou de ADN genómico, entre indivíduos afectados e não afectados. Se for observada uma mutação em alguns ou na totalidade dos indivíduos afectados, mas não em nenhum dos indivíduos normais, então é provável que a mutação seja o agente causativo da doença.

Com a resolução actual permitida pelas técnicas de cartografia física e de cartografia genética, um ADNc localizado com exactidão numa região cromossómica associada a uma doença pode ser um entre 50 e 500 genes causativos potenciais. (Isto corresponde a uma resolução cartográfica de 1 megabase e 1 gene por cada 20 kb).

A comparação entre indivíduos afectados e não afectados consiste, geralmente, em olhar primeiro para as alterações estruturais nos cromossomas, tais como as supressões ou as translocações que sejam visíveis a partir de multiplicações de cromossomas ou que sejam detectáveis recorrendo à RCP, com base nessa sequência de ADNc. Em última análise, é necessária uma sequenciação completa dos genes provenientes de vários indivíduos para se confirmar a presença de uma mutação e para se efectuar a distinção entre mutações e polimorfismos.

A presente invenção também tem por objecto a utilização de moléculas anti-sentido que hibridam especificamente com transcritos de um polipeptido da invenção para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de tumores. Esta utilização baseia-se na

inibição do Fα-H1CT *in vivo*, graças à utilização da tecnologia anti-sentido. A tecnologia anti-sentido pode ser utilizada para regular a expressão génica, mediante a formação de uma hélice tripla ou de ADN ou de ARN anti-sentido, baseando-se qualquer destes dois métodos na ligação de um polinucleótido ao ADN ou ao ARN. Por exemplo, a parte da sequência do polinucleótido de codificação em 5' que vai codificar o polipeptido maduro da presente invenção serve para engendrar um oligonucleótido de ARN anti-sentido com um comprimento entre 10 e 40 pares de bases. Concebe-se um oligonucleótido de ADN de modo a que seja complementar de uma região do gene implicado na transcrição (hélice tripla - ver Lee *et al.*, Nucl. Acid. Res., 6:3073 (1979); Cooney *et al.*, Science, 241:456 (1988); e Dervan *et al.*, Science, 251: 1360 (1991)), assim se evitando a transcrição e a produção do Fα-H1CT. O oligonucleótido de ARN anti-sentido hibrida com o ARNm *in vivo* e bloqueia a tradução de uma molécula de ARNm em Fα-H1CT (anti-sentido - Okano, J. Neurochem., 56:560 (1991); 'Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression', CRC Press, Boca Raton, FL (1988)). Em alternativa, a composição farmacêutica que incorpora os oligonucleótidos descritos antes pode ser concebida para fornecer os oligonucleótidos às células por meio de procedimentos conhecidos na especialidade, de tal modo que o ARN ou o ADN anti-sentido possam ser expressos *in vivo* para inibirem a produção do Fα-H1CT do modo anteriormente descrito.

Por tal motivo, os arquétipos anti-sentido para o F-H1CT podem ser utilizados para a preparação de composições farmacêuticas úteis na terapia antitumoral, uma vez que um estudo recente veio comprovar que a inibição da secreção ou da produção do FαCT (ou dos seus homólogos) pelas células tumorais em murganhos origina a regressão do tumor. Tais inibidores podem ser oligonucleótidos anti-sentido, anticorpos monoclonais, etc.. Os oligonucleótidos anti-sentido evitam a produção do factor de crescimento por parte da célula, ao passo que os anticorpos vão ligar-se e neutralizar o factor de crescimento segregado ou ligado à superfície.

Os polipeptidos, os seus fragmentos ou outros derivados, ou os seus análogos, ou as células que os exprimam, podem ser utilizados como imunogénios para a produção dos correspondentes anticorpos. Tais anticorpos podem ser, por exemplo, anticorpos policlonais ou monoclonais. A presente invenção compreende também os anticorpos quiméricos, de cadeia singular e humanizados e também os fragmentos Fal (em inglês Fab) ou o produto de um banco de expressão dos fragmentos Fal. É possível utilizar diversos procedimentos conhecidos na especialidade para a produção de tais anticorpos e fragmentos.

Os anticorpos gerados contra o polipeptido correspondente a uma sequência da presente invenção ou a um seu receptor *in vivo* podem ser obtidos por injecção directa do polipeptido num animal, ou por administração do polipeptido a um animal, de preferência um ser não humano. O anticorpo assim obtido irá ligar-se então ao próprio polipeptido. Deste modo, é possível utilizar até mesmo uma sequência que codifique apenas um fragmento do polipeptido para gerar anticorpos que se liguem ao polipeptido nativo intacto. Tais anticorpos podem ser utilizados então para isolar o polipeptido a partir do tecido que exprime esse polipeptido.

Para a preparação de anticorpos monoclonais é possível praticar qualquer técnica que proporcione anticorpos produzidos por culturas contínuas de uma linhagem celular. Como exemplos refere-se a técnica dos hibridomas (Kohler e Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), a técnica dos triomas , a técnica do hibridoma das células B humanas (Kosbor *et al.*, 1983, 'Immunology Today' 4:72) e a técnica do hibridoma do VEB (em inglês EBV) para produzir anticorpos monoclonais humanos (Cole *et al.*, 1985, em 'Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy', Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96).

As técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia singular (patente de invenção norte-americana nº 4 946 778) podem ser adaptadas à produção de anticorpos de cadeia singular para os produtos polipeptídicos imunogénicos da presente invenção. Os anticorpos específicos

para o FαCT podem ser utilizados para a preparação de composições de diagnóstico ou farmacêuticas úteis no diagnóstico e na terapia do cancro, uma vez que há muitos tipos de células cancerosas que fazem aumentar, por externalização, diversos membros da família FαCT durante os processos de neoplasias ou hiperplasias. Estes anticorpos ligam-se ao Fα-H1CT e inactivam-no. Os anticorpos monoclonais contra o FαCT (e/ou os membros desta família) estão a ser utilizados clinicamente quer para diagnóstico quer para a terapia de determinadas doenças, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, as anomalias do crescimento hiperplásico e neoplásico. O aumento externalizado da expressão do factor de crescimento pelos tecidos neoplásicos constitui a base para inúmeros ensaios séricos que permitem detectar o aumento do factor de crescimento no sangue dos pacientes afectados. Estes ensaios têm por objecto, tipicamente, não só fins de diagnóstico como também são aplicados para fins de prognóstico (para se detectar a presença de células tumorais ocultas a seguir a uma intervenção cirúrgica, tratamento por quimioterapia, etc.).

Além disso, as células malignas que exprimem o receptor Fα-H1CT podem ser detectadas utilizando o Fα-H1CT marcado, ou então moléculas congéneres do Fα-H1CT, no ensaio de ligação ao receptor, ou mediante a utilização de anticorpos para o próprio receptor de Fα-H1CT. As células podem ser distinguidas pela presença e pela densidade dos receptores para o Fα-H1CT, o que proporciona pois o meio para prever a sensibilidade dessas células às actividades biológicas do Fα-H1CT.

A presente invenção será melhor descrita tomando como referência os exemplos subsequentes; no entanto, faz-se observar que a presente invenção não fica limitada por esses exemplos. Todas as partes ou quantidades, salvo quando especificado de outro modo, são relativas ao peso.

Com o intuito de se facilitar a compreensão dos exemplos subsequentes, efectuar-se-á a descrição de determinados métodos e/ou termos vulgarmente utilizados.

Os "plasmídeos" são identificados por uma letra p minúscula precedida e/ou seguida de letras maiúsculas e/ou números. Os plasmídeos de partida aqui utilizados ou se encontram disponíveis nos circuitos comerciais, sem nenhum tipo de restrições, ou podem ser construídos a partir de plasmídeos existentes, de acordo com procedimentos que constam de obras publicadas. Além disso, os plasmídeos equivalentes aos descritos são conhecidos na especialidade e são evidentes para qualquer especialista na matéria.

O termo "digestão" de ADN designa uma clivagem catalítica do ADN com uma enzima de restrição que actua apenas em determinadas sequências no ADN. As diversas enzimas de restrição estão disponíveis nos circuitos comerciais, tendo sido praticadas condições de reacção e utilizados co-factores e bem assim todos os outros parâmetros necessários, como é do conhecimento de qualquer especialista na matéria. Para fins analíticos, utilizou-se tipicamente 1 μg de plasmídeo ou de fragmento de ADN conjuntamente com cerca de 2 unidades de enzima em cerca de 20 μL de solução tampão. Para se isolar os fragmentos de ADN para a construção dos plasmídeos fez-se digerir tipicamente 5 a 50 μg de ADN com 20 a 250 unidades de enzima num volume maior. As soluções tampão convenientes e as quantidades de substratos para as enzimas de restrição particulares são as especificadas pelos fabricantes. Os períodos de incubação foram normalmente de 1 hora a 37°C, mas podem variar em conformidade com as instruções dos fornecedores. Após a digestão, submete-se a mistura de reacção a uma operação de electroforese directamente sobre um gel de poliacrilamida para se isolar o fragmento desejado.

A separação dimensional dos fragmentos clivados tem lugar utilizando gel de poliacrilamida a 8%, descrito por Goeddel, D. *et al.*, 'Nucleic Acids Res.', 8:4057 (1980):

O termo "oligonucleótidos" designa quer um polidesoxinucleótido de cadeia singular quer duas cadeias complementares de polidesoxinucleótidos que podem ser sintetizadas por via química. Tais oligonucleótidos sintéticos não têm nenhum radical fosfato em 5' e por tal motivo não se ligam a outros oligonucleótidos sem a adição de um radical fosfato com uma ATP na presença de uma cinase. Um oligonucleótido sintético ligar-se-á a um fragmento que não tenha sido desfofosforilado.

O termo "ligação" designa um processo de formação de pontes fosfodiéster entre dois fragmentos de ácido nucleico de cadeia dupla (Maniatis, T. *et al.*, *Id.*., pág.146). Salvo quando especificado de outro modo, a ligação pode ter lugar utilizando tampões conhecidos e as condições correspondentes com 10 unidades de ligase do ADN das T4 ("ligase") por cada 0,5 μg de quantidades aproximadamente equimolares dos fragmentos de ADN que se pretende ligar.

Salvo quando especificado de outro modo, a operação de transformação foi executada conforme descrito no método de Graham, F. E Van der Eb, A., 'Virology', 52:456-457 (1973).

Exemplo 1

Expressão bacteriana do Fα-H1CT e sua purificação

O bloco de leitura ininterrupta do Fα-H1CT pode ser retirado do vector derivado do 'Bluescript' no qual está inserido, sendo então colocado no interior de um novo tipo de vector de clonagem designado por pQE9 (ver *infra*). Este vector pode aceitar fragmentos de BamHI-HindIII. É possível gerar um fragmento de restrição compatível de BamHI-HindIII, a partir de F-H1CT, mediante a utilização de iniciadores oligonucleotídicos de RCP correspondentes às extremidades 5' e 3' da sequência de ADN, para

sintetizar fragmentos de inserção. O iniciador oligonucleotídico de 5' tem a sequência 5'-ATTCTAGTTGGATCCGATGGACTACAATATCGACCA-3', contém um local de restrição Bam HI (sublinhado) seguido por 21 nucleótidos da sequência de codificação do Fα-H1CT; a sequência de 3' é 5'-CTCCCTCAAAGGAAGCTTTTAAGAGC-3' e contém as sequências complementares para o local HindIII que ocorre naturalmente (sublinhado) dentro da parte não traduzida de 3' do gene do Fα-H1CT. Os locais BamHI e HindIII são compatíveis com os locais BamHI e HindIII no vector pQE9 de expressão bacteriana (Qiagen, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311). O vector plasmídico codifica a resistência aos antibióticos ($Amp^r$), uma origem bacteriana de replicação (ori), um promotor/operador (P/O) regulável pelo IPTG, um local de ligação dos ribossomas (LLR, em inglês RBS), um identificador de 6-histidina (6-His) e os locais de clonagem da enzima de restrição. A mistura de ligação foi depois utilizada para transformar a estirpe M15/rep4 de *E. coli* (fornecida por "Qiagen" com a marca comercial m15/rep 4). A estirpe 'M15/rep4' possui cópias múltiplas do plasmídeo pREP4 que exprime o repressor lacI e também confere resistência à canamicina ($Can^r$). Os transformantes são identificados pela sua capacidade para crescerem em placas de CL (em inglês LB) que contenham quer Amp quer Can. Os clones que continham os arquétipos desejados cresceram de um dia para o outro (D/O) numa cultura em meio líquido de CL enriquecido com Amp (100 μg/mL) e Can (25 μg/mL). Utilizou-se a cultura D/O para inocular uma cultura grande diluída a valores entre 1:100 e 1:250. As células cresceram até terem atingido uma densidade óptica 600 ($DO_{600}$) compreendida entre 0,4 e 0,6. Depois acrescentou-se IPTG ("isopropil-β-D-tio-galacto-piranósido") até uma concentração final igual a 1 mM. O IPTG induz por inactivação do repressor lacI, depurando o P/O e fazendo com que haja uma maior expressão dos genes. As células ficaram a desenvolver-se durante mais 3 a 4 horas. A seguir efectuou-se a

colheita das células por centrifugação. Solubilizou-se a massa celular em agente caotrópico guanidina•HCl 6 M. Depois de realizada a clarificação, o Fα-H1CT solubilizado foi purificado a partir desta solução por cromatografia em coluna de quelato de níquel em condições que permitem a ligação correcta pelas proteínas que contêm o identificador 6-His. (Hochuli, E. *et al.*, 'Genetic Engineering Principle & Methods', 12:87-98, Plenum Press, Nova Iorque (1990)). Efectuou-se a eluição do Fα-H1CT (com uma pureza de 95%) a partir da coluna em guanidina•HCl 6 M a pH 5,0 e para efeitos de renaturação ajustou-se a concentração de guanidina•HCl para o valor de 3 M, com fosfato de sódio 100 mM, glutationa 10 mM (reduzida) e glutationa 2 mM (oxidada). Após a incubação desta solução durante 12 horas, efectuou-se a diálise da proteína para um valor da concentração do fosfato de sódio 50 mM.

# LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: MEISSNER *et al.*

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: "Factor alfa H1 do crescimento transformante"

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 5

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) ENDEREÇO: CARELLA, BYRNE, BAIN, GILFILLAN, CECCHI, STEWART & OLSTEIN

(B) RUA: 6 BECKER FARM ROAD

(C) CIDADE: ROSELAND

(D) ESTADO: NEW JERSEY

(E) PAÍS: E.U.A.

(F) CÓDIGO POSTAL: 07068

(v) FORMA LEGÍVEL POR COMPUTADOR:

(A) SUPORTE: DISQUETE DE 3,5 POLEGADAS

(B) COMPUTADOR: IBM PS/2

(C) SISTEMA OPERATIVO: MS-DOS

(D) PROGRAMA INFORMÁTICO: WORD PERFECT 5.1

(vi) DADOS ACTUAIS DO PEDIDO:

(A) NÚMERO DO PEDIDO: PCT US94/05476

(B) DATA DE DEPÓSITO: 12 DE MAIO DE 1994

(C) CLASSIFICAÇÃO:

(vii) DADOS ANTERIORES DO PEDIDO:

(A) NÚMERO DO PEDIDO:

(B) DATA DE DEPÓSITO:

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE O REPRESENTANTE/AGENTE:

(A) NOME: MULLINS, J.G.

(B) NÚMERO DO PEDIDO: 33 073

(C) REFERÊNCIA/NÚMERO DO PROCESSO: 325800-98

(ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:

(A) TELEFONE: 201-994-1700

(B) TELEFAX: 201-994-1744

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 400 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) TIPO DE CORDÃO: SIMPLES

(D) TOPOLOGIA: LINEAR

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

```
GATGGACTAC AATATCGACC AGATGTGAAA GATGCTAGTC ATCAAAGAGA AGATGTTTAT    60
ATTGGAAACC ACATGCCTTG CCCTGAAAAC CTCAATGGTT ACTGCATCCA TGGAAAATGT   120
GAATTCATCT ATTCTACTCA GAAGGCTTCT TGTAGATGTG AATCTGGCTA CACTGGACAG   180
CACTGTGAAA AGACAGACTT TAGTATTCTC TATGTAGTGC CAAGTAGGCA AAAGCTCACT   240
CATGTTCTTA TTGCAGCAAT TATTGGAGCT GTACAGATTG CCATCATAGT AGCAATTGTA   300
ATGTGCATAA CAAGAAAATG CCCCAAAAAC AATAGAGGAC GTCGACAGAA GCAAAACCTA   360
GGTCATTTTA CTTCAGATAC GTCATCCAGA ATGGTTTAAA                         400
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 132 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(C) TIPO DE CORDÃO:

(D) TOPOLOGIA: LINEAR

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Asp | Gli | Leu | Gln | Tir | Arg | Pro | Asp | Val | Lis | Asp | Ala | Ser | Asp | Gln |
| | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |
| Arg | Glu | Asp | Val | Tir | Ile | Gli | Asn | His | Met | Pro | Cis | Pro | Glu | Asn |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 |
| Leu | Asn | Gli | Tir | Cis | Ile | Iis | Gli | Lis | Cis | Glu | Phe | Ile | Tir | Ser |
| | | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Thr | Gln | Lis | Ala | Ser | Cis | Arg | Cis | Glu | Ser | Gli | Tir | Thr | Gli | Gln |
| | | | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 |
| His | Cis | Glu | Lis | Thr | Asp | Phe | Ser | Ile | Leu | Tir | Val | Val | Pro | Ser |
| | | | | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 |
| Arg | Gln | Ile | Ala | Ile | Ile | Val | Ala | Ile | Ala | Ala | Ile | Ile | Gli | Ala |
| | | | | 80 | | | | | 85 | | | | | 90 |
| Val | Gln | Ile | Ala | Ile | Ile | Val | Ala | Ile | Val | Met | Cis | Ile | Thr | Arg |
| | | | | 95 | | | | | 100 | | | | | 105 |
| Lis | Cis | Pro | Lis | Asn | Asn | Arg | Gli | Arg | Arg | Gln | Lis | Gln | Asn | Leu |
| | | | | 110 | | | | | 115 | | | | | 120 |
| Gli | His | Phe | Thr | Ser | Asp | Thr | Ser | Ser | Arg | Met | Val | | | |
| | | | | 125 | | | | | 130 | | | | | |

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 3288 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) TIPO DE CORDÃO: SIMPLES

(D) TOPOLOGIA: LINEAR

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:

```
GGATCCGATG GACTACAATA TCGACCAGAT GTGAAAGATG CTAGTGATCA AAGAGAAGAT      60
GTTTATATTG GAAACCACAT GCCTTGCCCT GAAAACCTCA ATGGTTACTG CATCCATGGA     120
AAATGTGAAT TCATCTATTC TACTCAGAAG GCTTCTTGTA GATGTGAATC TGGCTACACT     180
GGACAGCACT GTGAAAAGAC AGACTTTAGT ATTCTCTATG TAGTGCCAAG TAGGCAAAAG     240
CTCACTCATG TTCTTATTGC AGCAATTATT GGAGCTGTAC AGATTGCCAT CATAGTAGCA     300
ATTGTAATGT GCATAACAAG AAAATGCCCC AAAAACAATA GAGGACGTCG ACAGAAGCAA     360
AACCTAGGTC ATTTTACTTC AGATACGTCA TCCAGAATGG TTTAAACTGA TGACTTTTAT     420
ATGTACACTG ACCATGTGAT GTACATTTAT TATGTCTTTT TTTAAAGAAT GGAAATATTT     480
ATTTCAGAGG CCTTATTTTT GGACATTTTT AGTGTAGTAC TGTTGGCTCG TATTTAGAAT     540
ATTCAGCTAC GACAGTTTTG GACTGTTTAG TAGTCTTTGT TTTATGTTTT TAAATACAGA     600
AATTGCTTTC ACAAATTTGT ACCACATGGT AATTCTAAGA CTTGTTCTTT ACCCATGGAA     660
TGTAATATTT TKGGAAAGAT GGACTACTTC ACAAATGGGT TATAAAGTCA TATTCCACTT     720
CTTCCACAAA TGACCACAGG AAATTGACCA AGCATGAACT TAARGAATCG CCTGTCGRGR     780
GTTACAGRAG RTGAAGGACC ARGACGCTGC TCTTACCATT GTGACTGTGC TGGACAAAGT     840
AGCCTCCATC GTGGACAGTG TGCAGGCAAG CCAGAAGAGA ATAGAAGAGA GACACAGGGA     900
AATGGAAAAT CCCATAAAAT CCGTCCAGAT TGACCTGTTG RAGCTTTCAC AGTCGCATAG     960
CAATACAGGG CATATCATTA ACAAATTGTT TGAGAAAACC CGAAAAGTTA GTGCTCACAT    1020
TAAAGATGTG AAAGCCCGGG TGGAGAAGCA ACAAATTCAT GTTAAAAAAG TTGAAGTCAA    1080
GCAAGAGGAA ATAATGAAGA AAAACAAATT CCGCGTGGTA ATATTCCAGG AGAAGTTTCG    1140
GTGTCCGACA TCCCTGTCTG TTGNTTAAAG ACAGAAACCT AACTGAGAAC CAAGAAGAGG    1200
ATGATGATG ATATCTTTGGA TCCCCCAGTA GGATCTTGTC TTCGGATGAA GATTATTATG    1260
```

```
TTGAAGAAA GCAGGTCTTGC CAGGCTTAGG AAGTCCGGCC AGGAGCCCCT TGATAATATC      1320
CAGAAGGCN TTTTCCAAAGA AAACTGCGAA GACCCGGCAG AATCTTGACC AGAAAGTGAA      1380
CGAATTAGA ACTAGAATAGT GACCCCGGAG AGGAGAGAGA GGCTAAGGCA GTCAGGAGTA      1440
GAGGCTGAG TACAGTCAGGG GAGAGGCTGA GACAGTCAGG GGGAGAGGTT TAAGAAATCT      1500
ATTTCTAAT GCAGCTCCCTC AAAGGAAGCT TTTAAGATGC GCAGCCTCAG GAAAGGTAAG      1560
GACCGAACA GTGGCTGAAGG TGAGGAATTG TGCCAGGGGA GATGGTGTTG GACATCAWTG      1620
SCAGGAGCG AGTCTTCTKGG SCCCATCAGK GAGCTCTWCT CTGATGAGTC ARTGACCAAA      1680
AMACGAGGC AGCCAGGCCGG TGTATCCTCC CCATGAAGGA AGAGAAATCC CCACCCCCGA      1740
RCCTTTAAA AGTTACTTTTA AATCTCAGGT GAAAGTAGAG GATGATGAAT CTCTTTTGGT      1800
TAGATTTAA AGCACTCATCG TAAAGAGGGA ATTAAGTATA TCCTAAATAT GAATCTCCTA      1860
ATCATCCAG TTTTAGTTTGA ATAGTGTAGT CGTCYACATT TCTGTGCCAT GTAGGAAAAC      1920
ATAAATGTA ATTTTTTTCTT ATATTTAAAA TCTTGAAGAT AATATAAATA TTATTATCAC      1980
TCTTTCTCA TGGCAGCTGTG GATTTTTTAG TTCCTTTCTC TTGTCCACCA GAAAAATAGT      2040
TTCCTAGGT TGGGCCAGTTA CGTGTTTGGT AAGGGCAACT TTGCGSCCGT CATTTGCAGG      2100
AGAACTCTA AATATTGGTTA GGATTAATAT TGTGGCCASC CTCMAAGGGG AATAACTCAT      2160
GTGTGGGTT ATATCGTCCAG ATGTTCAGAT CAACAGATTT GTTAGTAAAT TAGCAGTCAC      2220
ACCCCTTTT TTGATGCTTTC ACATTAAAAA ATTGAAGTTT TGGACTTGAG CATTTGGCTC      2280
TAGTATCAT AGCTTTACTTA AAAGAAAACC CTGGSCAAGT CATCATCTGC TTATTCTCAT      2340
CAGTAAAAA TGGAGAGGGTT GGCCTCTSCT KCCTGCCTCA GAGGACTGTT GTGATGATCA      2400
AAGGAAATG GTACACATTCT GGGGGAACAA GAAGCACACC CAGAGAAAAC AARCCTCATC      2460
AGTTCCTCC CAAACAGAATG GAAAGAGTTA CACCTTCTGA WAAGCCCTCA GCACCAATCA      2520
GTAAGGTCC TAGGTTGGAGA GAAACTAAAG CTGGTCTTCA GAARCCTTTT CACAGAATCA      2580
AGAGTGAAA AATAAGTAAAT GTTTGGGTGW CCACTTTTTC ATCAGACTAA CTATATCTTG      2640
GGTTTTAGT TGGGTCCAAAT GTTCCCCAGC CAGACCCTTT CTAATTTCCT TTTGATTAAG      2700
ATCTTTGGT GGACTATAGCA CNTAAATTTG TTTAAGCAGT ATGAGGCATA AAATTGTGAC      2760
TATGTTTCT AAAGTCGGCCC TGATGCATTG GGTTTGGAAA TGACCACAAA TATTCCTGTT      2820
TTCCTGAGT GTACCCTTCAG GGTCCAGCTG TCCAAAACAG TGTTGATAGG AGTTCATCAT      2880
ACCTCCTTT GGGAGGAAGCC AAGATTCTCC TTATCTTTTA GCTTTAAGAT CCGTGGAATC      2940
CAGGAAGAG AACAATGTCTA TTGTTGCTAA AGAAAGAAAG AAATGGGCCG GGTGTGGTGG      3000
CTCACGGGG AGTAATCCCAG CACTTTGCGA GGCCGAGGTG GGTGAATCAC CTGAGGTCAG      3060
AAGTTCACG ACCAGCCTGAC CAACATGGCG AAACCCTGAC TCTACTGAAA AAACCAAAAT      3120
TACTGGGCA TGGTGGCATGC GCCTGTCCCA GCTACTCAGG AGGCTGAGAC AGGAGAATTG      3180
CTTGAACCC AGGAGGCGGAG GTTCAGTGAA CCGAGATTGT TCCACTCACT CAAGCCTGGG      3240
CCAAAGAGC CAGACTCTGTT TCCAAAAAAA AAAAAAAAAA AACTCGAG                    3288
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 36 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) TIPO DE CORDÃO: SIMPLES

(D) TOPOLOGIA: LINEAR

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: oligonucleótido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4:

ATTCTAGTTG GATCCGATGG ACTACAATAT CGACCA 36

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 26 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) TIPO DE CORDÃO: SIMPLES

(D) TOPOLOGIA: LINEAR

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: oligonucleótido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

CTCCCTCAAA GGAAGCTTTT AAGAGC 26

Lisboa, 8 de Novembro de 2001

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua do Salitre, 195, r/c-Dtº.
1269-063 LISBOA

## Reivindicações

1. Polinucleótido que codifica o factor α-H1 do crescimento transformante humano (Fα--H1CT) seleccionado entre o conjunto constituído por:

(a) polinucleótidos que codificam pelo menos uma forma madura do polipeptido Fα-H1CT que possui a sequência deduzida de aminoácidos da figura 1;

(b) polinucleótidos que possuem a sequência codificadora ilustrada na figura 1 que codifica pelo menos a forma madura de Fα-H1CT;

(c) polinucleótidos cuja cadeia complementar hibrida, em condições rigorosas, com um polinucleótido de (a) ou (b); e

(d) polinucleótidos que possuem uma sequência cuja identidade é pelo menos 95% igual à de um dos polinucleótidos de (a) ou (b);

ou a cadeia complementar de um polinucleótido desses.

2. Polinucleótido de acordo com a reivindicação 1, o qual codifica um fragmento solúvel de Fα-H1CT.

3. Polinucleótido das reivindicações 1 ou 2, o qual é ADN.

4. ADN de acordo com a reivindicação 3, o qual é ADN genómico.

5. Polinucleótido das reivindicações 1 ou 2, o qual é ARN.

6. Vector que contém o polinucleótido de uma qualquer das reivindicações 1 a 5.

7. Vector da reivindicação 6, em que o polinucleótido está funcionalmente ligado às sequências de regulação da expressão que permitem a expressão em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas.

8. Célula hospedeira manipulada geneticamente com o vector das reivindicações 6 ou 7.

9. Processo para a produção de um polipeptido codificado pelo polinucleótido da reivindicação 1, o qual consiste em criar em cultura a célula hospedeira da reivindicação 8 e em recuperar o polipeptido codificado por esse polinucleótido, a partir da referida cultura.

10. Processo para a produção de células capazes de exprimirem um polipeptido codificado pelo polinucleótido da reivindicação 1, o qual consiste em manipular geneticamente células com o vector das reivindicações 6 ou 7.

11. Polipeptido codificado por um polinucleótido de uma qualquer das reivindicações 1 a 4 ou susceptível de ser obtido por um processo da reivindicação 9.

12. Anticorpo contra o polipeptido da reivindicação 11.

13. Composição farmacêutica que incorpora um polinucleótido de uma qualquer das reivindicações 1 a 5, moléculas anti-sentido que hibridam especificamente com os transcritos desses polinucleótidos, polinucleótidos que codificam tais moléculas anti-sentido, o polipeptido da reivindicação 11 ou um ADN que codifica e é capaz de exprimir o referido polipeptido *in vivo* e/ou o anticorpo da reivindicação 12, conjuntamente com um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

14. Composição de diagnóstico que compreende o polinucleótido de uma qualquer das reivindicações 1 a 5, um polipeptido da reivindicação 11 e/ou um anticorpo da reivindicação 12.

15. Utilização de um polinucleótido de uma qualquer das reivindicações 1 a 5 ou de um polipeptido da reivindicação 11 ou de um ADN que codifica e é capaz de exprimir o referido polipeptido *in vivo*, para a preparação de uma composição farmacêutica para restabelecer ou reforçar as funções neurológicas comprometidas em consequência de traumas ou de outras patologias degenerativas.

16. Utilização da reivindicação 15, em que a patologia degenerativa é a demência associada à SIDA ou a demência senil.

17. Utilização de um polinucleótido de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 5 ou de um polipeptido da reivindicação 11 ou de um ADN que codifica e é capaz de exprimir o referido polipeptido *in vivo*, para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças oculares, doenças renais ou disfunções hepáticas ou para estimular a cicatrização de ferimentos, para tratar a alopecia ou a queda do cabelo.

18. Utilização de um anticorpo da reivindicação 12 ou de moléculas anti-sentido que hibridam especificamente com os transcritos de um polinucleótido de uma qualquer das reivindicações 1 a 5 ou de polinucleótidos que codificam tais moléculas anti-sentido, para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de tumores.

Lisboa, 8 de Novembro de 2001

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua do Salitre, 195, r/c-Dto.
1269-063 LISBOA

## Resumo

### "Factor alfa H1 do crescimento transformante"

A invenção descreve um polipeptido Fα-H1CT e um ADN (ARN) que codifica esses polipeptidos Fα-H1CT. A invenção descreve também um procedimento para a produção desses polipeptidos por meio de técnicas recombinantes e para a produção de anticorpos e antagonistas contra esses polipeptidos. Tais polipeptidos podem ser combinados com um veículo ou com um diluente farmacêutico adequado para assim se conseguir obter efeitos de diagnóstico, terapêuticos e/ou profilácticos contra diversas doenças. A invenção proporciona também métodos para a utilização dos anticorpos e dos antagonistas para inibir o Fα-H1CT para fins terapêuticos.

Lisboa, 8 de Novembro de 2001

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua do Salitre, 195, r/c-Dtº.
1269-063 LISBOA

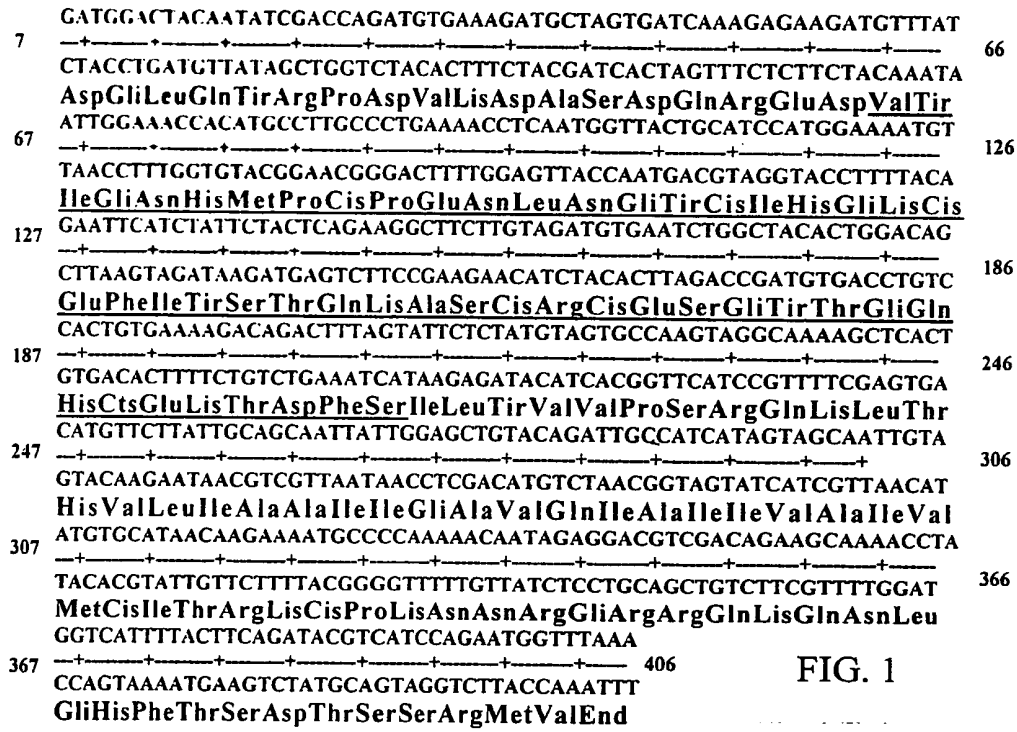

GATGGACTACAATATCGACCAGATGTGAAAGATGCTAGTGATCAAAGAGAAGATGTTTAT
7
66
CTACCTGATGTTATAGCTGGTCTACACTTTCTACGATCACTAGTTTCTCTTCTACAAATA
AspGliLeuGlnTirArgProAspValLisAspAlaSerAspGlnArgGluAspValTir
ATTGGAAACCACATGCCTTGCCCTGAAAACCTCAATGGTTACTGCATCCATGGAAAATGT
67
126
TAACCTTTGGTGTACGGAACGGGACTTTTGGAGTTACCAATGACGTAGGTACCTTTTACA
IleGliAsnHisMetProCisProGluAsnLeuAsnGliTirCisIleHisGliLisCis
127
GAATTCATCTATTCTACTCAGAAGGCTTCTTGTAGATGTGAATCTGGCTACACTGGACAG
186
CTTAAGTAGATAAGATGAGTCTTCCGAAGAACATCTACACTTAGACCGATGTGACCTGTC
GluPheIleTirSerThrGlnLisAlaSerCisArgCisGluSerGliTirThrGliGln
CACTGTGAAAAGACAGACTTTAGTATTCTCTATGTAGTGCCAAGTAGGCAAAAGCTCACT
187
246
GTGACACTTTTCTGTCTGAAATCATAAGAGATACATCACGGTTCATCCGTTTTCGAGTGA
HisCtsGluLisThrAspPheSerIleLeuTirValValProSerArgGlnLisLeuThr
CATGTTCTTATTGCAGCAATTATTGGAGCTGTACAGATTGCCATCATAGTAGCAATTGTA
247
306
GTACAAGAATAACGTCGTTAATAACCTCGACATGTCTAACGGTAGTATCATCGTTAACAT
HisValLeuIleAlaAlaIleIleGliAlaValGlnIleAlaIleIleValAlaIleVal
ATGTGCATAACAAGAAAATGCCCCAAAAACAATAGAGGACGTCGACAGAAGCAAAACCTA
307
366
TACACGTATTGTTCTTTTACGGGGTTTTTGTTATCTCCTGCAGCTGTCTTCGTTTTGGAT
MetCisIleThrArgLisCisProLisAsnAsnArgGliArgArgGlnLisGlnAsnLeu
GGTCATTTTACTTCAGATACGTCATCCAGAATGGTTTAAA
367
406
CCAGTAAAATGAAGTCTATGCAGTAGGTCTTACCAAATTT
GliHisPheThrSerAspThrSerSerArgMetValEnd

FIG. 1

FIG. 2A

POS. 1

GGATCCGATGGACTACAATATCGACCAGATGTGAAAGATGCTAGTGATCAAAGAGAAGATGTTTATATTGG
AAACCACATGCCTTGCCCTGAAAACCTCAATGGTTACTGCATCCATGGAAAATGTGAATTCATCTATTCTAC
TCAGAAGGCTTCTTGTAGATGTGAATCTGGCTACACTGGACAGCACTGTGAAAAGACAGACTTTAGTATTCT
CTATGTAGTGCCAAGTAGGCAAAAGCTCACTCATGTTCTTATTGCAGCAATTATTGGAGCTGTACAGATTGC
CATCATAGTAGCAATTGTAATGTGCATAACAAGAAAATGCCCCAAAAACAATAGAGGACGTCGACAGAAGCA
AAACCTAGGTCATTTTACTTCAGATACGTCATCCAGAATGGTTTAAACTGATGACTTTTATATGTACACTG
ACCATGTGATGTACATTTATTATGTCTTTTTTTAAAGAATGGAAATATTTATTTCAGAGGCCTTATTTTTGG
ACATTTTTAGTGTAGTACTGTTGGCTCGTATTTAGAATATTCAGCTACGACAGTTTTGGACTGTTTAGTAGT
CTTTGTTTTATGTTTTTAAATACAGAAATTGCTTTCACAAATTTGTACCACATGGTAATTCTAAGACTTGTT
GTTTACCCATGGAATGTAATATTTTKGGAAAGATGGACTACTTCACAAATGGGTTATAAAGTCATATTCCAC
TTCTTCCACAAATGACCACAGGAAATTGACCAAGCATGAACTTAARGAATCGCCTGTCGRGTGTTACAGRAG
RTGAAGGACCARGACGCTGCTCTTACCATTGTGACTGTGCTGGACAAAGTAGCCTCCATCGTGGACAGTGTG
CAGGCAAGCCAGAAGAGAATAGAAGAGAGACACAGGGAAATGGAAAATGCCATAAAATCCGTCCAGATTGAC
CTGTTGRAGCTTTCACAGTCGCATAGCAATACAGGGCATATCATTAACAAATTGTTTGAGAAAACCCGAAAA
GTTAGTGCTCACATTAAAGATGTGAAAGCCCGGGTGGAGAAGCAACAAATTCATGTTAAAAAAGTTGAAGTC
AAGCAAGAGGAAATAATGAAGAAAAACAAATTCCGCGTGGTAATATTCCAGGAGAAGTTTCGGTGTCCGACA
TCCCTGTCTGTTGNTTAAAGACAGAAACCTAACTGAGAACCAAGAAGAGGATGATGATGATATCTTTGGAYC
CCCCAGTAGGATCTTGTCTTCGGATGAAGATTATTATGTTGAAGAAAGCAGGTCTTGCCAGGCTTAGGAAGT
CCGGCCAGGAGCCCCTTGATAATATCCAGAAGGCNTTTTCCAAAGAAAACTGCGAAGACCCGGCAGAATCTT
GACCAGAAAGTGAACGAATTAGAACTAGAATAGTGACCCCGGAGAGGAGAGAGAGGCTAAGGCAGTCAGGAG
TAGAGGCTGAGTACAGTCAGGGGAGAGGCTGAGACAGTCAGGGGGAGAGGTTTAAGAAATCTATTTCTAATG
CAGCTCCCTCAAAGGAAGCTTTTAAGATGCGCAGCCTCAGGAAAGGTAAGGACCGAACAGTGGCTGAAGGTG
AGGAATTGTGCCAGGGGAGATGGTGTTGGACATCAWTGSCAGGAGCGAGTCTTCTKGGSCCCATCAGKGAGC

EM CORRESPONDÊNCIA COM A FIG. 2B

EM CORRESPONDÊNCIA COM A FIG. 2A

FIG. 2B

TCTWCTCTGATGAGTCARTGACCAAAAMACGAGGCAGCCAGGCCGGTGTATCCTCCCCATGAAGGAAGAGAA
ATCCCCACCCCCGARCCTTTAAAAGTTACTTTTAAATCTCAGGTGAAAGTAGAGGATGATGAATCTCTTTTG
GTTAGATTTAAAGCACTCATCGTAAAGAGGGAATTAAGTATATCCTAAATATGAATCTCCTAATCATGCAGT
TTTAGTTTGAATAGTGTAGTCGTCYACATTTCTGTGCCATGTAGGAAAACATAAATGTAATTTTTTTCTTAT
ATTTAAAATCTTGAAGATAATATAAATATTATTATCACTCTTTCTCATGGCAGCTGTGGATTTTTTAGTTCC
TTTCTCTTGTCCACCAGAAAAATAGTTTCCTAGGTTGGGCCAGTTACGTGTTTGGTAAGGGCAACTTTGCGS
CCGTCATTTGCAGGAGAACTCTAAATATTGGTTAGGATTAATATTGTGGCCASCCTCMAAGGGGAATAACTC
ATGTGTGGGTTATATCGTCCAGATGTTCAGATCAACAGATTTGTTAGTAAATTAGCAGTCACACCCCTTTTT
TGATGCTTTCACATTAAAAAATTGAAGTTTTGGACTTGAGCATTTGGCTCTAGTATCATAGCTTTACTTAAA
AGAAAACCCTGGSCAAGTCATCTGCTTATTCTCATCAGTAAAAATGGAGAGGGTTGGCCTCTSCTKCCTGCC
TCAGAGGACTGTTGTGATGATCAAAGGAAATGGTACACATTCTGGGGGAACAAGAAGCACACCCAGAGAAAA
CAARCCTCATCAGTTCCTCCCAAACAGAATGGAAAGAGTTACACCTTCTGAWAAGCCCTCAGCACCAATCAG
TAAGGTCCTAGGTTGGAGAGAAACTAAAGCTGGTCTTCAGAARCCTTTTCACAGAATCAAGAGTGAAAAATA
AGTAAATGTTTGGGTGWCCACTTTTTCATCAGACTAACTATATCTTGGGTTTTAGTTGGGTCCAAATGTTCC
CCAGCCAGACCCTTTCTAATTTCCTTTTGATTAAGATCTTTGGTGGACTATAGCACNTAAATTGTGTTAAGC
AGTATGAGGCATAAAATTGTGACTATGTTTCTAAAGTCGGCCCTGATGCATTGGGTTTGGAAATGACCACCA
ATATTCCTGTTTTCCTGAGTGTACCCTTCAGGGTCCAGCTGTCCAAAACAGTGTTGATAGGAGTTCATCATA
CCTCCTTTGGGAGGAAGCCAAGATTCTCCTTATCTTTTAGCTTTAAGATCCGTGGAATCCAGGAAGAGAACA
ATGTCTATTGTTGCTAAAGAAAGAAAGAAATGGGCCGGGTGTGGTGGCTCACGGGGAGTAATCCCAGCACTT
TGCGAGGCCGAGGTGGGTGAATCACCTGAGGTCAGAAGTTCACGACCAGCCTGACCAACATGGCGAAACCCT
GACTCTACTGAAAAAACCAAAATTACTGGGCATGGTGGCATGCGCCTGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGA
CAGGAGAATTGCTTGAACCCAGGAGGCGGAGGTTCAGTGAACCGAGATTGTTCCACTCACTCAAGCCTGGGC
CAAAGAGCCAGACTCTGTTTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAG

pos. 3 286

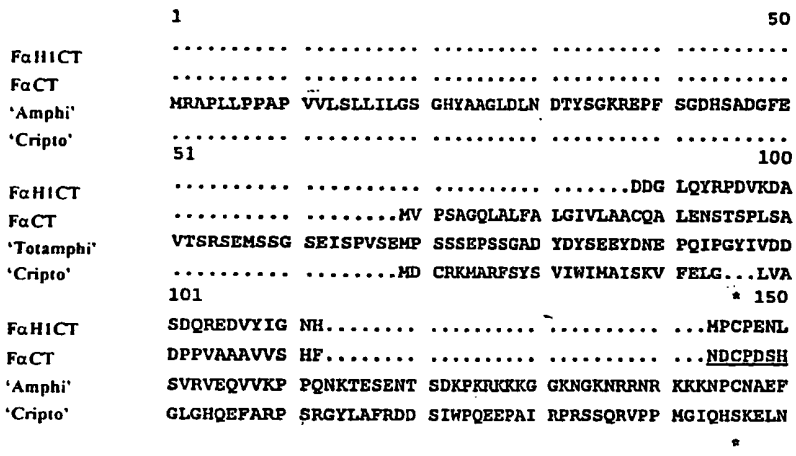



FIG. 3A

EM CORRESPONDÊNCIA COM A FIG. 3B

758



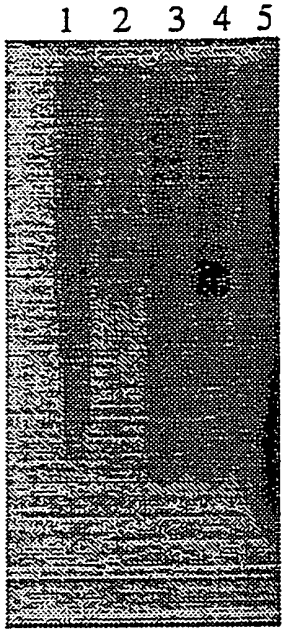
EM CORRESPONDÊNCIA COM A FIG. 3A

```
                151*   *            *  *         *                  200
FαH1CT          NGYCIHGKCE FIYSTQKASC RCESGYTGQH CEKTD.FSIL  YVV......P
FαCT            TQFCFHGTCR FLVQEDKPAC VCHSGYVGAR CEHADLLAVV  AAS......Q
'Totamphi'      QNFCIHGECK YIEHLEAVTC KCQQEYFGER CGEKSMKTHS  MID......S
'Cripto'        RTCCLNGGTC MLGSF....C ACPPSFYGRN CEHDVRKENC  GSVPHDTWLP
                   *    *            *  *         *

                201                                                250
FαH1CT          SRQKLTHVLI AAIIG.AVQI AIIVAIVMCI TRKCPKNNRG ...RRQKQNL
FαCT            KKQAITALVV VSIVALAVLI ITCVLIHCCQ VRKHCEWCRA LICRHEKPSA
'Amphi'         SLSKIALAAI AAFMS.AVIL TAVAVITVQL RRQYVRKYEG EAEERKKLRQ
'Cripto'        KKCSLCKCWH GQLRCFPQAF LPGCDGLVMD EHLVASRTPE LPPSARTTTF

                251          266
FαH1CT          ...GHFTSDT SSRMV*
FαCT            LLKGRTACCH SETVV*
'Amphi'         ENGNVHAIA* ......
'Cripto'        MLVGICLSIQ SYY*..
```

FIG. 3B

Z5

AUTORRADIOGRAFIA À NORTHEN QUE MOSTRA O PADRÃO DE EXPRESSÃO DE ARN




Legendas da Figura

1. 2 µg poli A+ ARN de rim
2. 2 µg poli A+ ARN de fígado
3. 2 µg poli A+ ARN de pulmão
4. 2 µg poli A+ ARN de cérebro
5. 2 µg poli A+ ARN de ovação

FIG. 4