



(19)

(11) *Número de Publicação:* PT 645451 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6 )  
C12N015/18 A C07K014/50 B

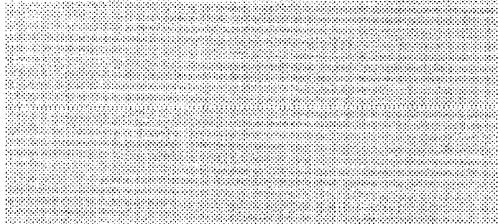
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1994.09.09	(73) <i>Titular(es):</i> AMERICAN CYANAMID COMPANY ONE CYANAMID PLAZA, WAYNE NJ 07470-8426	US
(30) <i>Prioridade:</i> 1993.09.24 US 126974		
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1995.03.29	(72) <i>Inventor(es):</i> LU-YUAN LI ANDREW PETER SEDDON YAKOV GLUZMAN PETER BOHLEN	US US US US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.08.22	(74) <i>Mandatário(s):</i> ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VITOR CORDON, Nº 14 - 3º 1200 LISBOA	PT

(54) *Epígrafe:* ANÁLOGOS ESTRUTURAIS DOS LOCAIS DE LIGAÇÃO À HEPARINA DOS FACTORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS

(57) *Resumo:*

ANÁLOGOS ESTRUTURAIS DOS LOCAIS DE LIGAÇÃO À HEPARINA DOS  
FACTORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS



## DESCRICAÇÃO

### "ANÁLOGOS ESTRUTURAIS DOS LOCAIS DE LIGAÇÃO À HEPARINA DOS FACTORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS"

#### Campo técnico do invento

Este invento está relacionado com análogos estruturais do factor de crescimento de fibroblastos, nomeadamente análogos do factor de crescimento de fibroblastos 2 (anteriormente designado factor de crescimento de fibroblastos básico), os quais possuem mutações pontuais no local de ligação à heparina, *e.g.*, um ou mais resíduos básicos substituídos por outros resíduos tais como resíduos neutros. Os análogos apresentam afinidades de ligação aos receptores da superfície celular semelhantes às do factor de crescimento nativo, mas possuem propriedades biológicas e de ligação à heparina diferentes do factor nativo.

#### Fundamento do invento

Os factores de crescimento polipeptídicos são moduladores da proliferação celular e diferenciação do tipo hormona. Os factores de crescimento são responsáveis pela regulação de uma variedade de processos fisiológicos, incluindo desenvolvimento, regeneração e reparação de feridas, e têm sido associados tanto a processos normais assim como patofisiológicos. Foram identificados numerosos factores de crescimento em vários tecidos e células e os nomes que foram aplicados a estes factores incluem factor de crescimento epidérmico, factor de crescimento derivado de plaquetas, factor de crescimento

das células nervosas, factor de crescimento hematopoiético e factor de crescimento de fibroblastos.

O factor de crescimento de fibroblastos (FGF) foi descrito pela primeira vez como uma actividade, derivada de tecido de cérebro bovino ou de tecido pituitário, mitogénica para fibroblastos e células endoteliais. Mais tarde encontrou-se que o mitogénio primário do cérebro era diferente do isolado a partir de pituitária. Estes dois factores foram designados FGF ácido e básico, respectivamente. FGF ácido e básico são proteínas contendo aproximadamente 154 aminoácidos. As suas sequências de aminoácidos apresentam entre elas uma homologia de aproximadamente 55%.

Sabe-se que os factores de crescimento de fibroblastos ácido e básico são membros de uma família maior de factores de crescimento de ligação à heparina, que colectivamente estimulam uma variedade de respostas biológicas em muitos tipos celulares, incluindo os originários da mesoderme e da neuroectoderme, tais como células endoteliais, células do músculo liso, células do cortex adrenal, células epiteliais da próstata e da retina, oligodendrócitos, astrócitos, condrócitos, mioblastos e osteoblastos. Como membros da família original, FGF ácido e básico são agora designados FGF-1 e FGF-2, respectivamente. Sete outros membros da família foram identificados com base na sua modulação da proliferação celular e diferenciação e homologia de sequências com outros FGFs.

Para além de induzirem uma resposta mitogénica que estimula o crescimento celular, os factores de crescimento de fibroblastos podem estimular um grande número de tipos celulares para responderem de forma não mitogénica. Estas actividades incluem a promoção da migração celular em áreas de feridas (quimiotaxia), iniciação da formação de novos vasos sanguíneos (angiogénesis),

modulação da regeneração e sobrevivência das células nervosas (neurotrofismo), modulação das funções endócrinas e estimulação ou supressão da expressão de proteínas celulares específicas, produção da matriz extracelular e sobrevivência celular (Baird, A., e Böhlen, P. *Handbook of Exp. Pharmacol.* 95(1):369-418, Springer, 1990). Estas propriedades proporcionam uma base para a utilização de factores de crescimento de fibroblastos em abordagens terapêuticas para acelerar a cicatrização de feridas, formação de vasos sanguíneos colaterais e similares. Por exemplo, foi sugerido que os factores de crescimento de fibroblastos minimizem a destruição do miocárdio em doença e cirurgia cardíaca (e.g., Pat. U.S. Nº 4 378 347 de Franco).

Assim, a pesquisa actualmente realizada, relativamente a FGF-2 e a outros FGFs, centra-se nos detalhes moleculares das vias mediadas por receptores através das quais são expressas as diferentes actividades fisiológicas dos factores, como meio de obter informação para a projecção de agentes úteis do ponto de vista terapêutico, que possam mimetizar ou inibir a acção dos factores. As respostas biológicas de FGF são mediadas pela ligação, dependente de sulfato de heparina, do factor de crescimento aos receptores da superfície celular, no entanto ainda se desconhece as interacções moleculares da heparina e do receptor com FGF e a natureza exacta dos acontecimentos da via de transdução de sinal. Uma vez que é conhecida a estrutura primária de FGF-2 isolado a partir de uma variedade de fontes e FGF-2 bovino e humano tenham sido clonados e expressos em *E. coli* e *S. cerevisiae*, recentemente focou-se a atenção na elucidação da estrutura secundária e terciária e na actividade dos análogos estruturais.

Presta e colaboradores encontraram que a substituição da arginina-118, lisina 119, lisina 128 e arginina-129 do FGF-2 com glutamina, por mutagénese dirigida, conduz a um mutante designado pelos investigadores como M6B-bFGF que apresentou ligação ao receptor e actividade mitogénica

semelhantes ao factor de crescimento nativo, mas uma afinidade reduzida para os locais de ligação de baixa afinidade do tipo heparina na superfície celular, uma actividade quimiotáctica reduzida e uma capacidade reduzida para induzir a produção de activador do plasminogénio tipo urocinase nas células endoteliais em cultura (Presta, M., et al., *Biochem. Biophys. Res. Com.* 185:1098-1107 (1992)). Ainda, o mutante não possui uma actividade angiogénica significativa *in vivo*. A substituição da lisina-128 e arginina-129 de FGF-2 pelos mesmos investigadores, por outro lado, deu um mutante designado M6A-bFGF que apresentou diferentes propriedades, i.e., uma inibição de 79% da ligação a receptores celulares (Eur. Pat. Ap. Pub. Nº 363 675 de Bergonzoni, L., et al.).

Os estudos que empregaram peptídeos sintéticos relacionados com a sequência de FGF mostraram que FGF-2 (33-77) e (102-129) se ligam a heparina e actuam como agonistas parciais fracos e antagonistas num ensaio mitogénico de actividade de FGF (Baird, A., et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85:2324-2328 (1988)). O mesmo estudo identificou uma sequência, FGF-2 (115-124), envolvida na ligação a receptores. A partir da estrutura cristalina de FGF-2, um conjunto de resíduos básicos parece desempenhar um papel na ligação do sulfato de heparina aniónico à molécula (Zhan, J., et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88: 3446-3450 (1991) e Eriksson, E.A., et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88: 3441-3445 (1991)). Encontrou-se que dois pares de resíduos básicos, lisina-128 e lisina-138 e arginina-129 e lisina-134, (respectivamente designados pelos investigadores lisina-119 e lisina-129 e arginina-120 e lisina-125 uma vez que empregaram uma forma activa truncada do polipeptídeo correspondendo aos resíduos 9-154 da sequência completa), formam contactos iónicos com dois iões sulfato na estrutura cristalina (Zhang, referido atrás). Estes podem simular grupos sulfato de heparano. Assim é possível que os dois locais de ligação estejam envolvidos na ligação da heparina ao FGF.

Sumário do invento

Constitui um objectivo do presente invento proporcionar novos análogos estruturais dos factores de crescimento de fibroblastos, especialmente análogos do factor de crescimento de fibroblastos humano 2.

Constitui um outro objectivo ainda mais específico do presente invento proporcionar análogos estruturais do factor de crescimento de fibroblastos que apresentam, relativamente ao factor nativo, ligação semelhante aos receptores da superfície celular mas actividades biológicas diferentes, tais como menor actividade mitogénica, proporcionando antagonistas do factor de crescimento de fibroblastos. Os antagonistas do factor de crescimento de fibroblastos são úteis como potenciais agentes antiangiogénese, anticancro, antitumorais e antiproliferativos.

Estes e outros objectivos foram atingidos de acordo com as reivindicações. O presente invento proporciona análogos estruturais do factor de crescimento de fibroblastos, que possuem pelo menos uma mutação pontual num local putativo de ligação à heparina, *i.e.* substituição de um resíduo básico com um resíduo neutro específico. Algumas realizações possuem pelo menos uma mutação pontual num local da ligação ao sulfato de heparina e nenhuma mutação num outro local de ligação à heparina. Os análogos preferidos apresentam ligação à heparina e actividade biológica diferentes do factor de crescimento nativo; os análogos especialmente preferidos apresentam uma afinidade menor relativamente à heparina e uma capacidade menor da indução da proliferação celular. Algumas realizações apresentam uma angiogénese menor nos ensaios *in vitro*. Algumas realizações apresentam uma menor capacidade e outras uma maior capacidade de indução da produção de activador do plasminogénio tipo urocinase. Algumas realizações apresentam uma menor capacidade para induzir

estruturas do tipo tubo em células endoteliais em cultura comparado com o factor nativo; outros apresentam uma maior capacidade da mesma actividade. Os análogos particularmente preferidos possuem pelo menos um a dois resíduos básicos, tais como resíduos de lisina, substituídos por glutamina.

Os análogos estruturais do factor de crescimento de fibroblastos 2 do invento incluem os que possuem lisina-138 ou lisina-128 e lisina-138 substituídas por resíduos de glutamina.

O invento também proporciona DNA codificador de derivados do factor de crescimento de fibroblastos, plasmídeo circular ou vectores de DNA virais biologicamente funcionais compreendendo o DNA, e células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas, tais como *E. coli*, transformadas ou transfectadas com os vectores, de forma a permitir que a célula hospedeira expresse os novos factores.

#### Breve descrição das figuras

As Figuras 1A e 1B representam as intensidades de fluorescência de FGF-2 (1A) e gln<sup>128,138</sup>FGF-2 (1B) em função das concentrações de heparina.

A Figura 2 representa a radioactividade associada a FGF-2 marcado com <sup>125</sup>I ligada a receptores de FGF de elevada afinidade, em células de rim de hamster bêbê (BHK), em função das concentrações de FGF-2 e dos mutantes. Os círculos e quadrados abertos representam os dados de FGF-2; os quadrados fechados dizem respeito aos dados de gln<sup>138</sup>FGF-2; os círculos fechados dizem respeito aos dados de gln<sup>128,138</sup>FGF-2; e os triângulos fechados representam os dados de gln<sup>128</sup>FGF-2 como descrito a seguir.

As Figuras 3A e 3B representam as contagens celulares em função das concentrações de FGF-2 e de mutante. A Figura 3A mostra os mutantes do local 1 (resíduos lisina-128 e lisina-138) e a Figura 3B mostra os mutantes do local 2 (resíduos arginina-129 e lisina134).

A Figura 4 mostra a indução do activador do plasminogénio tipo urocinase por FGF-2 selvagem ou mutante (10 ng/ml).

A figura 5 é um gráfico de barras que descreve a potência da actividade angiogénica *in vitro* dc FGF-2 selvagem ou mutante (10 ng/ml), conforme medido pela indução da formação de estruturas do tipo tubo, em células endoteliais de aorta bovina adulta cultivadas num gel de colagénio tipo I.

#### Descrição detalhada do invento

Este invento baseia-se no facto de a substituição de certos resíduos básicos nos factores de crescimento de fibroblastos com resíduos neutros dar mutantes que apresentam, comparativamente com o factor nativo, afinidades semelhantes para os receptores da superfície celular. Alguns destes análogos apresentam ligação à heparina e actividades biológicas diferentes.

Uma proteína é aqui definida como factor de crescimento de fibroblastos (FGF) se apresentar actividade de FGF em ensaios *in vitro* ou *in vivo* e se ligar a heparina ou substâncias do tipo heparina. "Heparina" significa o polissacárido aniónico sulfatado heterogéneo composto por ácido D-glucurónico e D-glucosamina, ligado a um núcleo proteico como "proteoglicano" ou numa forma livre como "aglicano", que tem fortes propriedades anticoagulantes. Substâncias "do tipo heparina" são moléculas que possuem estruturas de oligossacárido relacionadas com as heparinas, mas que podem ou não ter

actividade anticoagulante. Qualquer tipo de factor de crescimento de fibroblastos ou factor mutante (mutéina) ou derivado está incluído neste invento, particularmente o factor de crescimento de fibroblastos humano.

Os análogos do factor de crescimento de fibroblastos deste invento são análogos estruturais do factor de crescimento de fibroblastos tendo pelo menos um resíduo de aminoácido básico substituído por um outro resíduo conforme designado pela reivindicação 1. Tipicamente, os análogos têm pelo menos uma mutação pontual num local putativo de ligação à heparina; muitos análogos não têm mutação num outro local de ligação à heparina. Por exemplo, quando certos resíduos básicos são substituídos por resíduos neutros, os análogos obtidos apresentam afinidade de ligação aos receptores de superfície celular de rim de hamster bêbê (BHK) semelhante aos do factor de crescimento nativo. Os análogos preferidos apresentam ligação e actividades biológicas que estão farmacologicamente dissociadas, de forma que a ligação à heparina e a actividade biológica são diferentes do factor nativo. Conforme descrito mais detalhadamente abaixo, em muitos casos as actividades biológicas apresentadas pelos análogos estão farmacologicamente dissociadas. Muitos mutantes apresentam actividades biológicas reduzidas, mas outros não. As realizações preferidas apresentam ligação aos receptores das células de rim de hamster bêbê (BHK) semelhante ou superior quando comparadas com o factor de crescimento de fibroblastos nativo.

Os análogos apresentam menor afinidade para a heparina relativamente ao factor nativo. Algumas realizações também apresentam uma menor capacidade para induzir a produção do activador do plasminogénio tipo urocinase e menor angiogénese, apresentada como uma menor capacidade para induzir a formação de capilares *in vitro*. As realizações apresentam uma menor actividade mitogénica apresentada como uma menor capacidade para induzir a proliferação celular. Outras diferenças na afinidade de ligação ou actividade

biológica apresentadas pelos análogos, comparativamente com o factor nativo, estão discutidas a seguir.

Os análogos estruturais de FGF-2 são preferidos em muitas realizações. "FGF-2" significa qualquer factor de crescimento de fibroblastos 2 apresentando actividade biológica, incluindo o polipeptídeo de 145 aminoácidos originalmente isolado e sequenciado, a forma de 154 aminoácidos que normalmente era considerada como o polipeptídeo completo, formas truncadas apresentando actividade biológica, formas prolongadas tais como FGF placentário, formas de maior peso molecular descritas na literatura e análogos incluindo derivados e mutéinas de qualquer um destes. O termo especificamente inclui FGF-2 natural extraído de tecido de mamífero assim como polipeptídeos recombinantes expressos a partir de DNA de qualquer espécie clonado em *E. coli* ou *S. cerevisiae* ou expresso em células de insecto ou mamífero com vectores adequados, aqui designados como FGF-2 "nativo".

Em muitas realizações é preferido FGF-2 humano. FGF-2 humano inclui FGF-2 nativo descrito atrás, assim como análogos estruturais anteriormente descritos, tais como os que têm adições de aminoácidos, substituições de aminoácidos e deleções de aminoácidos, incluindo deleções de partes do extremo amina ou carboxilo, e proteínas químéricas contendo FGF no extremo N ou C de uma outra proteína. Exemplos de FGF-2 que podem ser ainda modificados de acordo com o invento incluem aqueles que têm cisteínas substituídas com um aminoácido neutro, como seja serina, ou ácido aspártico, arginina, glicina, serina ou valina substituídos com outros aminoácidos sugeridos como tendo maior estabilidade na Publicação do Pedido de Patente Europeia Nº 281 822 de Seno *et al.*; as mutéinas formadas por substituição de pelo menos uma, e mais preferencialmente duas, das cisteínas encontradas em FGF-2 natural com um resíduo de aminoácido diferente para dar um análogo mais estável

(Publicação do Pedido de Patente Europeia Nº 320 148 de Arakawa e Fox); mutoínas sem os aminoácidos 7 a 46 do extremo carboxilo e, facultativamente, tendo substituições de aminoácidos sugeridas como dando maior estabilidade mantendo simultaneamente a actividade na Publicação do Pedido de Patente Europeia Nº 326 907 de Seno *et al.*; mutoínas tendo mutações pontuais ou uma deleção N-terminal sugerida na Publicação do Pedido de Patente Europeia Nº 298 723 de Fiddes *et al.*; as mutoínas M1-bFGF a M6-bFGF incluindo ausências e substituições de aminoácidos descritas no Publicação do Pedido de Patente Europeia Nº 363 675 de Bergonzoni, referido atrás; FGF facilmente expresso preparado pela substituição dc Ala-3 e Ser-5 de FGF recombinante com Glu como descrito em Seddon, referido atrás e seus análogos; análogos tendo uma deleção, inserção ou substituição de aminoácido na ansa de superfície que se estende desde a nona cadeia  $\beta$  até à décima cadeia  $\beta$  e tendo a estrutura secundária e terciária global do factor original como descrito em US-A-5 491 220.

Na realização deste invento, um derivado do factor de crescimento de fibroblastos deste invento, como seja um análogo estrutural de FGF-2 humano, é preparado por substituição de um resíduo de aminoácido básico com um outro resíduo. Substituições típicas envolvem a substituição de um resíduo de aminoácido lisina ou arginina com glutamina, conforme definido nas reivindicações.

A substituição decorre num resíduo básico implicado na ligação de um grupo sulfato da heparina. Preferencialmente, ocorre uma mutação pontual num sítio putativo de ligação à heparina; em muitas realizações, não existe mutação num outro sítio de ligação à heparina. A heparina, um polissacárido aniónico altamente sulfatado, protege FGF-1 e FGF-2 da inactivação pela temperatura elevada, condições ácidas e digestão com proteases, e potencia a

actividade mitogénica de FGF-1. A interacção de FGF com os proteoglicanos da superfície celular foi sugerida como sendo necessária para a ligação de FGF-2 aos seus receptores de membrana celular de elevada afinidade e portanto à modulação das actividades de FGF.

Os análogos estruturais de FGF-2 deste invento possuem pelo menos uma e preferencialmente duas mutações pontuais tais como uma substituição de uma lisina com glutamina no local 2 de ligação a sulfato descrito por Zhang, referido atrás. Os análogos estruturais de FGF-2 deste invento incluem assim FGF-2 tendo lisina-138 substituída com glutamina (aqui designado gln<sup>138</sup>FGF-2) e FGF-2 tendo lisina-128 e lisina-138 substituídas por glutamina (aqui designado gln<sup>128,138</sup>FGF-2).

Gln<sup>128,138</sup>FGF-2 constitui uma realização. As afinidades de ligação deste análogo e de outros para os receptores da superfície celular são semelhantes à de FGF-2 nativo ou selvagem, mas são também observadas alterações significativas na ligação à heparina e actividades biológicas. As constantes de dissociação para a ligação à heparina de gln<sup>128</sup>FGF-2 e gln<sup>138</sup>FGF-2, por exemplo, estão aumentadas cerca de dez vezes e a de gln<sup>128,138</sup>FGF-2 cerca de 100 vezes. A marcada redução na afinidade de ligação não parece resultar da perturbação da integridade estrutural da proteína, uma vez que a ligação aos receptores de BHK não é significativamente afectada.

A diminuição da ligação à heparina está, no entanto, associada a um declínio significativo de várias outras actividades biológicas de FGF-2 atribuíveis a respostas angiogénicas, particularmente a capacidade para induzir a formação de estruturas do tipo capilar pelas células endoteliais em cultura. As actividades mitogénicas de gln<sup>128,138</sup>FGF-2, por exemplo, são cerca de 10 vezes mais baixas do que as da proteína selvagem, enquanto que as de gln<sup>138</sup>FGF-2 permanecem

inalteradas. Ainda, a capacidade do mutante gln<sup>128,138</sup>FGF-2 para induzir o activador do plasminogénio tipo urocinase em células endoteliais de aorta bovina (ABAE) é marcadamente reduzida. Este análogo também apresenta uma menor capacidade para induzir nas células ABAE a formação de estruturas do tipo capilar num modelo de angiogénesis *in vitro* descrito mais detalhadamente abaixo. Por outro lado, gln<sup>128</sup>FGF-2 apresenta as actividades de formação de tubos e de activador do plasminogénio tipo urocinase semelhantes ao factor de crescimento de fibroblastos nativo.

Os análogos estruturais deste invento podem ser preparados usando quaisquer meios químicos ou bioquímicos conhecidos dos familiarizados com a matéria, tais como preparação por montagem de polipeptídeos a partir dos aminoácidos ou peptídeos e polipeptídeos constituintes. Como alternativa, os análogos podem ser preparados por síntese de proteína recombinante, envolvendo a preparação de DNA codificador do análogo de FGF, inserção desse DNA num vector, expressão do vector nas células hospedeiras e isolamento de FGF recombinante por elas produzido.

O DNA codificador dos análogos de FGF deste invento pode ser preparado por alteração de um gene de FGF através de eliminação de nucleótidos, adição de nucleótidos e/ou mutações pontuais produzidas por métodos convencionais. As ilustrações usando mutagénesis com cassetes são apresentadas a seguir. Devido à degenerescência do código genético, pode ser seleccionada uma variedade de combinações de codões para formar DNA codificador dos análogos de FGF, de tal modo que quaisquer deleções, adições e/ou mutações pontuais de nucleótidos que resultem num DNA codificador de uma análogo estão englobadas neste invento. Uma vez que certos codões são mais eficientes para a expressão dos polipeptídeos em certos tipos de organismos, a selecção das alterações do gene dos fibroblastos, para dar DNA que codifique os análogos

deste invento, são preferencialmente as que dão a expressão mais eficiente no tipo de organismo que vai servir como hospedeiro do vector recombinante. A selecção dos codões alterados pode também depender das considerações sobre a construção do vector.

O DNA material de partida do factor de crescimento de fibroblastos que é alterado para formar DNA codificador dos análogos de FGF do invento pode ser natural, recombinante ou sintético. Assim, o DNA material de partida é isolado a partir de tecido ou de cultura de tecidos, construído a partir de oligonucleótidos usando métodos convencionais, obtido comercialmente ou preparado, através de isolamento de RNA codificador de FGF, a partir de fibroblastos e usando o RNA assim obtido para sintetizar cDNA de cadeia simples que é usado como molde para sintetizar o correspondente DNA de cadeia dupla.

A ilustração do presente invento é feita com sequências de DNA complementares clonadas, definindo os análogos de FGF-2 tais como os construídos no Exemplo 1. Também estão incluídas sequências de DNA homólogas ou estreitamente relacionadas com o DNA complementar aqui descrito, nomeadamente sequências de DNA que hibridem, particularmente em condições restrinquentes, resultando no emparelhamento apenas entre os fragmentos de ácido nucleico que possuam uma elevada frequência de bases complementares, com o cDNA do análogo de FGF e RNA correspondente. Para além das sequências codificadoras de FGF, o DNA incluído neste invento poderá conter sequências adicionais, dependendo das sequências de construção do vector, que facilitem a expressão do gene.

O DNA codificador dos análogos FGF deste invento, ou RNA correspondente, é então inserido num vector, *e.g.* um plasmídeo das séries pBR,

pUC, pUB ou pET, e o vector recombinante usado para transformar organismos hospedeiros microbianos. Organismos hospedeiros úteis no invento são células bacterianas (*e.g.*, *E. coli* ou *B. Subtilis*), leveduras (*e.g.* *S. cerevisiae*), células de mamífero (*e.g.* fibroblastos de ratinho) ou células de insecto. Este invento também proporciona novos vectores de RNA e DNA virais e de plasmídeo circular incorporando sequências de RNA e DNA dos análogos de FGF gerados. A cultura dos organismos hospedeiros, estavelmente transformados ou transfectados com tais vectores, em condições que facilitem a expressão em larga escala das sequências do DNA ou RNA exógeno do vector, e isolamento dos polipeptídeos pretendidos a partir do meio de crescimento, lisados celulares ou fracções da membrana celular, permite obter os produtos pretendidos. No exemplo 1 está apresentado um exemplo da expressão de análogos de FGF-2 em *E. coli*.

O presente invento proporciona a produção total e/ou parcial das sequências de DNA codificadoras de análogos de FGF-2, e incluindo características vantajosas tais como incorporação de codões preferidos para a expressão por hospedeiros não mamíferos seleccionados, formação de locais de clivagem por enzimas de restrição e formação de sequências adicionais de DNA iniciais, terminais ou intermédias que facilitem a construção de vectores de expressão fácil. Assim, o presente invento proporciona a produção (e desenvolvimento por mutagénese dirigida de cDNA e DNA genómico) de sequências de DNA codificadoras da expressão microbiana de análogos de FGF, que diferem das formas aqui especificamente descritas em termos de identidade ou localização de um ou mais resíduos de aminoácidos (*i.e.*, análogos de deleção contendo um número inferior aos resíduos especificados para FGF-2 humano e/ou análogos de substituição em que um ou mais resíduos são adicionados a um fragmento terminal ou médio do polipeptídeo) e que partilham as propriedades biológicas dos análogos de FGF-2 aqui descritos.

As sequências de DNA (e RNA) deste invento codificam todas as sequências úteis para assegurar a expressão em células hospedeiras, procarióticas ou eucarióticas, dos produtos polipeptídicos tendo pelo menos uma parte da conformação estrutural primária e uma ou mais das propriedades biológicas dos análogos de FGF que incluem: (a) as sequências de DNA codificadoras dos análogos de FGF-2 como aqui descrito, ou cadeias complementares; (b) sequências de DNA que hibridam com sequências de DNA definidas em (a) ou seus fragmentos; e (c) sequências de DNA que, excepto nos casos de degenerescência do código genético, hibridem com as sequências de DNA definidas em (a) e (b) atrás. Estão especificamente incluídas sequências de DNA genómico codificadoras de formas variantes alélicas dos análogos de FGF aqui incluídos e sequências codificadoras de RNA análogo, seus fragmentos e sequências de RNA ou DNA que incorporem codões que facilitem a transcrição ou replicação de RNA do RNA mensageiro em hospedeiros não vertebrados.

O isolamento e purificação de polipeptídeos expressos em microorganismos proporcionados pelo invento são realizados por meios convencionais incluindo, por exemplo, separações cromatográficas preparativas, por exemplo como ilustrado no Exemplo 1 utilizando heparina e separações imunológicas, incluindo preparações de anticorpos monoclonais e/ou policlonais.

Uma mutação envolvendo Lis-138 apresenta menor ligação à heparina, mas sem alteração significativa na proliferação de células endoteliais comparado com o factor nativo. Estes análogos podem assim ser usados como agonistas de FGF-2. "Agonista" significa qualquer substância que tem afinidade para os receptores celulares e estimula a sua actividade fisiológica normalmente estimulada por substâncias naturais. Os análogos de FGF que são agonistas da actividade de FGF podem promover vascularização, crescimento celular e/ou sobrevivência celular, e assim têm aplicação na reparação de tecidos tais como

cicatrização de feridas, queimaduras, fracturas de ossos, abrasões cirúrgicas, úlceras e similares assim como reparação de tecidos durante isquémia e enfarte do miocárdio.

Pelo contrário, conforme resumido atrás e descrito mais detalhadamente nos exemplos abaixo, as mutações envolvendo Arg-128 e Lys-138, tais como gln<sup>128,138</sup>FGF-2, apresentam redução da ligação à heparina, redução da actividade mitogénica, redução da capacidade de indução do activador do plasminogénio do tipo urocinase e redução da angiogénesis *in vitro*. Assim, a menor ligação à heparina parece causar uma deficiência nas vias de transdução de sinal que exercem actividades de FGF-2, tais como indução de proliferação celular, produção de urocinase e formação de capilares *in vitro*. Como tal, espera-se que o análogo apresente uma actividade de antagonista.

“Antagonista” significa qualquer substância que tende a anular a acção de uma outra, como seja por exemplo por ligação a um receptor celular sem induzir uma resposta biológica. Para FGFs, os antagonistas incluem, mas não estão limitados a substâncias que se liguem aos receptores de FGF mas que não estimulem a proliferação ou migração de fibroblastos, células endoteliais e células da astrogliose. Os antagonistas de FGF são úteis no tratamento de certos neoplasmas, particularmente neoplasmas angiogénicos, como uma ferramenta importante para a inibição da angiogénesis tumoral assim como um agente anticancro e antiproliferativo. Os antagonistas actuam ainda como inibidores da angiogénesis e, portanto, são úteis para o tratamento de doenças em que a neovascularização é dominante na patologia, como sejam retinopatias do olho, glaucoma neovascular, alterações da pele, inflamação crónica, artrite reumatóide e similares. Conforme aqui é usado, os termos agonista e antagonista não são limitantes e um único factor pode apresentar antagonismo relativamente a uma função biológica mediada pelo factor nativo, e agonismo relativamente a uma

outra função. Sempre que isto acontece, as actividades biológicas do factor nativo são referidas como sendo farmacologicamente dissociadas no análogo.

Os exemplos que se seguem são apresentados para melhor ilustrar e explicar o presente invento e não deverão ser limitante em qualquer aspecto.

#### Exemplo 1

##### Construção, expressão e purificação de análogos de FGF-2 humano

Um gene codificador de glu<sup>3,5</sup>FGF-2 é primeiro preparado como descrito em Seddon, A.P., *et al.*, *Annals N. Y. Acad. Sci.* 638:98-108 (1991). Resumidamente, um gene sintético codificador da forma de 155 aminoácidos de FGF-2 humano clonado em pUC18 foi adquirido à British Bio-technology, Oxford, UK. A sequência de nucleótidos a ser alterada (2-49) foi removida de pUC18 com as endonucleases de restrição HindIII e BspMII e um fragmento sintético codificador dos 5 primeiros aminoácidos N-terminais de FGF-1 e contendo um local NdeI interno foi clonada em pUC18, dando uma construção codificadora de ácido glutâmico nas posições 3 e 5. O cDNA codificador de FGF-2 foi então removido de pUC18 com NdeI e BamHI e clonado nos locais NdeI e BamHI do vector de expressão pET-(M13)ΔPS, um derivado de pET-3A (Rosenberg, A.H., *et al.*, *Gene* 56: 125-135 (1987)).

O plasmídeo é modificado por mutagénese dirigida usando DNA de cadeia simples e duas sequências iniciadoras, 5'-GTCTAGAAAA TACACCAGTT GGTACGTAGC ACTGCAGCGA ACCGGTCAGT ATAAA-3' (SEQ ID NO 1) e 5'-CTTGGTTCCC AAACAGGGCC CGGGCAGAAA GCTA-3' (SEQ ID NO 2) para obter o gene mutante gln<sup>128</sup>FGF-2, que contem novos locais de restrição únicos introduzidos SnaB1, Pst1 e Apa1 (sublinhados), respectivamente. Estes

locais de restrição flanqueantes no plasmídeo são digeridos com as enzimas de restrição cognatas de forma a poder inserir pequenas cassetes de DNA de cadeia dupla sintético usando mutagénese dirigida com cassette como descrito por Wells, *et al.*, (*Gene* 34:315-323 (1985)).

A mutagénese dirigida com cassette deste gene variante, usando SnaBI e ApaI e duas séries de oligonucleótidos emparelhados 5'-GTAGCACTTA AGCGTACGGG GCAGTATAAG CTTGGTCCCC AACACAGGCC-3' (SEQ ID NO:3) e 5'-CTGTTGGGA ACCAAGCTTA TACTGCCCG TACGCTTAAG TGCTAC-3' (SEQ ID NO 4) e 5'-GTAGCACTGC AGCGTACGGG GCAGTATAAAG CTTGGTCCCC AACACAGGCC-3' (SEQ ID NO:5) e 5'-CTGTTGGGA ACCAAGCTTA TACTGCCCG TACGCTGCAG TGCTAC-3' (SEQ ID NO: 6), origina, respectivamente, um mutante gln<sup>138</sup>FGF-2 que possui novos sítios de restrição Afl2 e Hind3 (sublinhados) e um mutante duplo gln<sup>128,138</sup>FGF-2 que tem um novo sítio de restrição Hind3 (sublinhado).

Os mutantes foram então expressos e purificados. Os plasmídeos contendo os genes codificadores dos sete mutantes descritos atrás foram usados para transformar *E. coli* BL21 plys S competentes e cultivadas a 37°C em caldo Luria contendo 50 µg/ml de ampicilina e 30 µg/ml de cloranfenicol até se atingir uma absorbância de 0,4 a 600 nm. A expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de isopropiltiogalactósido 2 mM durante 2 horas a 37°C. As células de 1 litro de cultura foram colhidas por centrifugação, ressuspensas em 30 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo EDTA 0,1 mM e NaCl 0,6M, e rebentadas por tratamento com lisozima (10 µg/ml) durante 20 minutos a 4°C seguido de sonicação (6 x pulsos de 30 seg). Os lisados foram clarificados por centrifugação (10 000 xg, 20 minutos) e as soluções de sobrenadante incubadas com 5 ml de heparina Sepharose (Pharmacia/LKB) hidratada a 4°C, durante 1 hora com rotação constante. A resina foi isolada por filtração num sistema de

filtração de 0,8  $\mu$  (Nalgene), lavada extensivamente com Tris-HCl 10 mM pH 7,4, contendo NaCl 0,6 M e a proteína ligada foi eluída com tampão Tris contendo NaCl 3M (25 ml). O eluente de NaCl 3M foi diluído 6 vezes com tampão Tris e aplicado numa coluna de heparina 5PW TSK (0,21 x 15 cm; Nest Group, MA) e a coluna foi eluída usando um gradiente linear (0,6-2M de NaCl) em 90 minutos a um fluxo de 3 ml/minuto.

Estirpes de *E. coli* (BL21 plys S) portadoras dos mutantes foram depositadas na American Type Culture Collection (A.T.C.C.). Uma estirpe portadora de  $gln^{138}$ -FGF-2 tem o número de acesso A.T.C.C. 69420 e uma estirpe portadora de  $gln^{128,138}$  FGF-2 tem o número de acesso A.T.C.C. 69418.

### Exemplo 2

Obtenção das constantes de dissociação termodinâmica para a ligação da heparina e da estequiometria da ligação da heparina aos análogos de FGF-2 do exemplo 1.

FGF-2 contém um único resíduo triptofano na posição 123. Os dados cristalográficos sugerem que este resíduo de triptofano esteja situado perto de um conjunto de resíduos básicos implicados na ligação à heparina (Zhang, referido atrás), sugerindo que a emissão de fluorescência do resíduo de triptofano possa ser usada para registar as alterações na conformação da proteína quando da ligação dos vários ligandos. Assim, as propriedades de fluorescência de FGF-2 e dos mutantes de FGF-2 na presença e ausência de heparina e de um simulador de heparina, tetradecassulfato de  $\beta$ -ciclodextrano (BCDS), foram avaliados neste exemplo.

As medições de titulação da fluorescência foram realizadas num

fluorospectrômetro LS-5 Perkin-Elmer usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 290 nm e 350 nm, respectivamente. Dois mililitros de solução de FGF em Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, contendo ditiotreitol 2 mM foram colocados numa cuvete. Uma pequena quantidade (~2-5 µl) de heparina (Hepar Industries, Franklin, OH) ou BCDS (American Maize-Products, Hammond, IN) foi adicionada à cuvete de cada vez, antes de ser lida a intensidade de fluorescência da solução contra uma solução de triptofano, que dá intensidade de fluorescência comparável, e à qual uma quantidade idêntica de heparina ou BCDS é adicionada de cada vez. As concentrações de FGF-2 e gln<sup>128,138</sup>FGF-2 são de 370 nM e 280 nM, respectivamente. Os resultados estão apresentados nas Figuras 1A e 1B, e mostram que a emissão de fluorescência do triptofano é inibida quando da adição de heparina à solução de proteína. Um resíduo de triptofano equivalente, Trp122, existe em FGF ácido (FGF-1), para o qual se obtém uma inibição da fluorescência semelhante. A adição de BCDS à solução de proteína também resulta na inibição da fluorescência de FGF-2, enquanto que a adição do composto não sulfatado (BCD) não apresenta efeitos espectrais, indicando que a sulfatação do ligando é necessária para a ligação e alteração das propriedades de fluorescência da proteína.

A constante de dissociação termodinâmica ( $K_D$ ) é obtida a partir das representações da intensidade de fluorescência em função da concentração do ligando. Os dados de intensidade de fluorescência podem ser representados por uma regressão não linear usando a equação 1 abaixo, onde  $F_0$  é a intensidade de fluorescência observada,  $F_I$  é a intensidade de fluorescência inicial,  $\Delta F$  é a diferença entre as intensidades de fluorescência final e inicial,  $C_t$  é a concentração de proteína FGF total,  $K_D$  é a constante de dissociação termodinâmica e  $L_t$  é a concentração de heparina total. Assume-se na equação 1 que a estequiometria de FGF e da heparina no complexo é de 1:1. Para trabalhar os dados usou-se um programa gráfico Kaleidagraph.

$$(1) \quad F_0 = F_I + \frac{\Delta F((C_t + K_D + L_t) - \sqrt{(C_t + K_D + L_t)^2 - 4C_tL_t})}{2C_t}$$

No entanto, nas experiências de titulação de fluorescência as curvas de titulação apresentadas na Figura 1 não podem ser ajustadas directamente usando a equação 1. Isto indica que a estequiometria do complexo proteína-ligando não é igual à unidade. Uma vez que a preparação de heparina aqui usada é composta por uma média de 20 unidades de monossacárido sulfatado por cadeia, é provável que mais de uma molécula FGF seja ligada por cadeia de oligossacárido. As cargas extensivamente positivas na superfície da proteína e as cargas negativas fortes dos ligandos sugerem que as interacções iónicas pareçam ser a principal força motriz na ligação da heparina a FGF. Ainda, é razoável assumir que, na ausência dc quaisquer dados a indicar o contrário, os locais de ligação à heparina sejam independentes e as afinidades de ligação sejam semelhantes. Pelo mesmo raciocínio BCDS é um oligossacárido cíclico de sete membros, com 14 grupos sulfato carregados negativamente, e pode possuir vários locais de ligação a FGF. Assim, a concentração efectiva do ligando necessita de ser ajustada através da multiplicação das concentrações reais pelo número de locais de ligação possível. Se n fôr a média de moléculas de FGF ligadas por oligossacárido, então a equação 1 pode ser modificada para dar

$$(2) \quad F_0 = F_I + \frac{\Delta F((C_t + K_D + nL_t) - \sqrt{(C_t + K_D + nL_t)^2 - 4nC_tL_t})}{2C_t}$$

em que a concentração efectiva do ligando é aumentada n vezes.

A equação 2 é usada para ajustar os dados apresentados na Figura 1 e os valores das duas variáveis,  $K_D$  e  $n$ , são determinados por regressão não linear de pelo menos três curvas de titulação para cada molécula. Obteve-se uma média

de quatro ( $n=4$ ) moléculas de FGF-2 que interactuam com a heparina. Quatro locais de ligação em cada molécula de heparina são assumidos para o mutante  $\text{gln}^{128,138}\text{FGF-2}$ . Uma vez que o peso molecular da heparina usada nas experiências é de cerca de 5000, o qual tem uma média de 20 unidades de monossacárido, cerca de 4 a 6 unidades de monossacárido podem interactuar com cada uma das moléculas de FGF. Duas a quatro moléculas de FGF podem ligar-se a um BCDS (o qual tem um peso molecular calculado de 2226). Esta estimativa está de acordo com a descrição de Mach, *et al.* (*Biochemistry* 32: 5480-5489 (1993)) de uma estequiometria de 1:4-6 determinada por uma variedade de abordagens diferentes, incluindo análise de dispersão da luz e ultracentrifugação analítica.

A tabela I apresenta as constantes de dissociação termodinâmicas obtidas a partir de experiências de inibição da fluorescência para FGF selvagem e mutantes usando heparina ou BCDS.

Tabela I Constantes de dissociação termodinâmica ( $K_D$ ) associadas com a ligação de heparina a FGF-2 e aos mutantes

FGF	$K_D$ heparina (nM)	$K_D$ BCDS (nM)
FGF-1	$2 \pm 0,2$	$4 \pm 2$
FGF-2	$14 \pm 6$	$14 \pm 7$
$\text{gln}^{138}\text{FGF-2}$	$126 \pm 53$	$228 \pm 23$
$\text{gln}^{128,138}\text{FGF-2}$	$1280 \pm 380$	$2700 \pm 600$

A partir dos dados pode-se observar que os valores de  $K_D$  mudam dramaticamente para os mutantes do local 1 mas não para as proteínas contendo mutações no local 2. A afinidade para a heparina diminui cerca de 10 vezes para

o mutante gln<sup>138</sup>FGF-2 e cerca de 100 vezes para o mutante duplo gln<sup>128,138</sup>FGF-

2. Resultados semelhantes foram observados com BCDS.

### Exemplo 3

Estudos de ligação e actividade biológica relevante usando os mutantes de FGF-2 isolados e purificados no Exemplo 1.

As proteínas mutantes foram testadas quanto à sua capacidade para competir para a ligação de <sup>125</sup>I-FGF-2 (Amersham Corp.) a células de rim de hamster bêbê (BHK), que expressam números elevados de receptores de FGF, como descrito por Moscatelli (*J. Cell Physiol.* 131:123-130 (1987)). Resumidamente, as células semeadas em placas de 24 alvéolos são incubadas com <sup>125</sup>I-FGF-2 50 pM com diluições seriadas de FGF-2 não marcado ou os mutantes à temperatura ambiente durante 1 hora. As células são então incubadas a 4°C durante 30 minutos, lavadas duas vezes com soro fisiológico tamponado com fosfatos e tratado com Hepes 20 mM, pH 7,5, contendo NaCl 2 M para remover <sup>125</sup>I-FGF-2 ligado aos locais de ligação de sulfato de heparano de baixa afinidade. FGF-2 ligado ao receptor é recuperado por tratamento das células com 0,5% de Triton X-100 em fosfato de sódio 0,1M, pH 8,0, e contado num contador gama. Os ensaios são realizados em duplicado. Os resultados estão apresentados na Figura 2. Não se observa diferença significativa para qualquer um dos mutantes de FGF-2 comparando com a molécula selvagem.

A actividade mitogénica de FGF-2 e mutantes é determinada usando células do endotélio vascular bovino, derivadas do arco da aorta adulta, como descrito por Gospardarowicz, *et al.* (*Proc. Nat. Acad. Sci.* 81: 6963-6967 (1984)). Resumidamente, as células são semeadas numa densidade inicial de 8 000 células por placa de 24 alvéolos em meio de Eagle modificação de dulbecco

(DMEM) contendo 10% de soro fetal (Hyclone, Logan, UT) suplementado com penicilina (100 unidade/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e L-glutamina (2 mM). Duas horas após sementeira, são adicionadas aliquotas de 20 µl de diluições seriadas de FGF-2 e mutantes em DMEM. Após 5 dias em cultura, placas em duplicado são tripsinizadas e as densidades celulares determinadas por contagem do número de células num contador Coulter. As determinações são realizadas em duplicado. Os resultados estão apresentados na Figura 3.

A actividade de FGF-2 e dos mutantes para induzir a proliferação de células ABAE é determinada em função das concentrações de FGF adicionadas no meio de cultura. Os valores de EC<sub>50</sub> para gln<sup>128,138</sup>FGF-2 no grupo do local 1 (Figura 3A) mostram um aumento de cerca de 10 vezes, de 0,5 ng para 5,0 ng/ml, enquanto que o mutante gln<sup>138</sup>FGF-2 e todos os mutantes do local 2 não mostram alteração significativa comparando com o valor da molécula selvagem (Figura 3B).

A indução do activador do plasminogénio tipo urocinase pelos mutantes FGF foi avaliada. As células endoteliais de aorta bovina (ABAE) foram semeadas a 20 000 células/alvéolo em placas de 96 alvéolos e mantidas em DMEM contendo 10% de soro fetal (Hyclone, Logan, UT) suplementado com penicilina (100 unidades/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e L-glutamina (2 mM) e concentrações diferentes de FGF-2 ou mutantes. Após 24 horas, as células foram lavadas com soro fisiológico tamponado com fosfatos e lisadas em Tris-HCl 60 mM, pH 8,5, contendo 0,05% de Triton X-100. A actividade de activador do plasminogénio tipo urocinase (uPA) foi medida como descrito por Presta, *et al.*, referido atrás, usando o substrato cromogénico da plasmina D-norleucil-hexahidrotirosil-lisina acetato de p-nitroanileto (American Diagnostics, Greenwich, CT). As concentrações de proteína associadas às células foram determinadas usando a ligação de azul Coomassie à proteína. Os resultados estão apresentados

na Figura 4. O mutante gln<sup>128,138</sup>FGF-2 é o único mutante que apresenta uma capacidade de indução de uPA marcadamente reduzida.

As avaliações de angiogénesis *in vitro* foram feitas através da observação da indução de estruturas do tipo capilar pelos mutantes em células ABAE cultivadas num gel de colagénio tridimensional. As placas de gel de colagénio tridimensional (24 alvéolos) foram preparadas através da adição de 0,5 ml de solução arrefecida de 0,7 mg/ml de colagénio tipo I da cauda de rato (Becton Dickinson Labwares, Bedford, MA) contendo DMEM 1X e ajustando cada alvéolo a pH neutro com NaHCO<sub>3</sub>. Após formação do gel de colagénio (cerca de 1-2 mm de espessura), as células ABAE foram semeadas a 50 000 células/alvéolo. As culturas foram mantidas a 37°C em DMEM contendo 10% de soro de vitela (Hyclone, Logan, UT) suplementado com penicilina (100 unidades/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e L-glutamina (2 mM) até as culturas atingirem a confluência, geralmente em 5 dias, altura em que as células formam uma monocamada no gel. O meio foi então substituído por meio fresco contendo concentrações diferentes de FGF-2 ou de mutantes. As culturas foram mantidas a 37°C durante 48 horas, depois tratadas com metanol frio (-20°C).

A abundância das estruturas do tipo capilar formadas pelas células ABAE foi analisada usando um Kontron IBAS Image Analyzer, tendo acoplados uma câmara de video Hamamatsu C2400 e um microscópio Zeiss Axioshop. A imagem de contraste de fase de cada campo obtido com uma câmara de video foi convertida numa imagem binária em que as áreas ocupadas por estruturas tipo capilar são brancas e o resto é um fundo escuro. O grau de angiogénesis *in vitro* foi então medido como uma percentagem das áreas brancas dividida pela área total medida. As culturas celulares de condições idênticas foram mantidas em alvéolos em duplicado. Três a quatro áreas de cada alvéolo foram examinadas por análise de imagem e determinados o valor médio e o desvio padrão. Os resultados

deste método de quantificação assistido por computador estão descritos na Figura 5. A formação de tubos induzida pelo mutante gln<sup>128,138</sup>FGF-2 é muito inferior à indicada para FGF-2 selvagem e outros mutantes.

A descrição atrás tem a finalidade de ensinar os familiarizados com a matéria a realizar o presente invento e não se destina a detalhar todas as modificações e variações óbvias dele, que serão aparentes para os familiarizados com a matéria quando da leitura da descrição. Pretende-se no entanto, incluir no âmbito do invento todas essas modificações e variações óbvias conforme definido nas reivindicações apensas.

*Alberto Cunha*

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL

(i) REQUERENTES: Lu-Yuan Li  
Andrew P. Seddon  
Yakov Gluzman  
Peter Böhlen

(ii) TÍTULO DO INVENTO: Análogos estruturais do local de ligação  
à heparina de factores de crescimento de fibroblastos

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 14

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:  
American Cyanamid Company  
Patent Law Department  
One Cyanamid Plaza  
Wayne,NJ 07470-8426

(v) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR

- (A) TIPO DE MEIO: disquete de 5,25" de 360 Kb
- (B) COMPUTADOR: IBM PC
- (C) SISTEMA OPERATIVO: MS DOS
- (D) SOFTWARE: Processador Word

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE O PROCURADOR

- (A) NOME: Estelle J. Tsevdos
- (B) NÚMERO DE REGISTO: 31145

(C) NÚMERO DE REFERÊNCIA: 854-011

- (ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES  
(A) NÚMERO DE TELEFONE: 201-831-3242  
(B) NÚMERO DE TELEFAX: 201-831-3305

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA  
(A) COMPRIMENTO: 55 bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADEIA: simples  
(D) TOPOLOGIA: linear  
(ii) TIPO DE MOLÉCULA:  
(A) DESCRIÇÃO: oligonucleótido  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: DNA sintético  
(ix) CARACTERÍSTICA  
(D) INFORMAÇÃO: sequência iniciadora usada na preparação  
de construções  
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1

GTCTAGAAAA TACACCAGTT GGTACGTAGC ACTGCAGCGA ACCGCTCACT ATAATA

(3) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA  
(A) COMPRIMENTO: 34 bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADEIA: simples  
(D) TOPOLOGIA: linear  
(ii) TIPO DE MOLÉCULA:

- (A) DESCRIÇÃO: oligonucleótido  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: DNA sintético  
(ix) CARACTERÍSTICA  
(D) INFORMAÇÃO: sequência iniciadora usada na preparação de construções  
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2

CTTGGTTCCC AACACAGGGCC CGGGCAGAAA GCTA

- (4) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:3  
(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA  
(A) COMPRIMENTO: 50 bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADEIA: simples  
(D) TOPOLOGIA: linear  
(ii) TIPO DE MOLÉCULA:  
(A) DESCRIÇÃO: oligonucleótido  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: DNA sintético  
(ix) CARACTERÍSTICA  
(D) INFORMAÇÃO: sequência iniciadora usada na preparação de construções emparelhada com SEQ ID NO 4  
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3

GTAGCACTTA AGCGTACGGG GCAGTATAAG CTTGGTTCCC AACACAGGGCC

- (5) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:4  
(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA  
(A) COMPRIMENTO: 46 bases  
(B) TIPO: ácido nucleico

- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA:
  - (A) DESCRIÇÃO: oligonucleótido
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: DNA sintético
- (ix) CARACTERÍSTICA
  - (D) INFORMAÇÃO: sequência iniciadora usada na preparação de construções emparelhada com SEQ ID NO: 3
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4

CTGTTGGGA ACCAAGCTTA TACTGCCCG TACGCTTAAG TGCTAC

- (6) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:5
  - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
    - (A) COMPRIMENTO: 50 bases
    - (B) TIPO: ácido nucleico
    - (C) TIPO DE CADEIA: simples
    - (D) TOPOLOGIA: linear
  - (ii) TIPO DE MOLÉCULA:
    - (A) DESCRIÇÃO: oligonucleótido
  - (v) TIPO DE FRAGMENTO: DNA sintético
  - (ix) CARACTERÍSTICA
    - (D) INFORMAÇÃO: sequência iniciadora usada na preparação de construções emparelhado com SEQ ID NO 6
  - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

GTCAGCACTGC AGCGTACGGG GCAGTATAAG CTTGGTTCCC AAACAGGGCC

- (7) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:6

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
  - (A) COMPRIMENTO: 46 bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) TIPO DE CADEIA: simples
  - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA:
  - (A) DESCRIÇÃO: oligonucleótido
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: DNA sintético
- (ix) CARACTERÍSTICA
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6
  - (D) INFORMAÇÃO: sequência iniciadora usada na preparação de construções emparelhada com SEQ ID NO:5

CTGTTGGGA ACCAAGCTTA TACTGCCCG TACGCTGCAG TGCTAC

- (8) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:7
  - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
    - (A) COMPRIMENTO: 28 bases
    - (B) TIPO: ácido nucleico
    - (C) TIPO DE CADEIA: simples
    - (D) TOPOLOGIA: linear
  - (ii) TIPO DE MOLÉCULA:
    - (A) DESCRIÇÃO: oligonucleótido
  - (v) TIPO DE FRAGMENTO: DNA sintético
  - (ix) CARACTERÍSTICA
  - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1
    - (D) INFORMAÇÃO: sequência iniciadora usada na preparação de construções emparelhada com SEQ ID NO: 8

GTAGCACTGC AGCAGACGGG GCAGTATC

(9) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:8

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
  - (A) COMPRIMENTO: 32 bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) TIPO DE CADEIA: simples
  - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA:
  - (A) DESCRIÇÃO: oligonucleótido
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: DNA sintético
- (ix) CARACTERÍSTICA
  - (D) INFORMAÇÃO: sequência iniciadora usada na preparação de construções emparelhada com SEQ ID NO: 7
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:8

AGCTGATACT GCCCCGTCTG CTGCAGTGCT AC

(10) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:9

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
  - (A) COMPRIMENTO: 50 bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) TIPO DE CADEIA: simples
  - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA:
  - (A) DESCRIÇÃO: oligonucleótido
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: DNA sintético
- (ix) CARACTERÍSTICA
  - (D) INFORMAÇÃO: sequência iniciadora usada na preparação de construções emparelhada com SEQ ID NO:10

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:9

GTAGCACTTA AGCAGACGGG GCAGTATCAG CTTGGTTCCA AAACAGGGCC

(11) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:10

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 46 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

TIPO DE MOLÉCULA:

(A) DESCRIÇÃO: oligonucleótido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: DNA sintético

(ix) CARACTERÍSTICA

(D) INFORMAÇÃO: sequência iniciadora usada na preparação de  
construções emparelhado com SEQ ID NO:9

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:10

CTGTTTGGA ACCAAGCTGA TACTGCCCG TCTGCTTAAG TGCTAC

(12) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:11

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 43 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA:

(A) DESCRIÇÃO: oligonucleótido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: DNA sintético

(ix) CARACTERÍSTICA

*Até o final*

(D) INFORMAÇÃO: sequência iniciadora usada na preparação de construções emparelhado com SEQ ID NO: 12

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:11

TTAAGCAGAC GGGGCAGTAT AAGCTTGTTT CCAAAACAGG GCC

(13) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:12

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 35 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA:

(A) DESCRIÇÃO: oligonucleótido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: DNA sintético

(ix) CARACTERÍSTICA

(D) INFORMAÇÃO: sequência iniciadora usada na preparação de construções emparelhada com SEQ ID NO:12

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:12

CTGTTTGGA ACCAAGCTTA TACTGCCCG TCTGC

(14) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:13

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 43 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA:

(A) DESCRIÇÃO: oligonucleótido

- (v) TIPO DE FRAGMENTO: DNA sintético
- (ix) CARACTERÍSTICA
  - (D) INFORMAÇÃO: usada na preparação de construções
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 13:

TTAACCGTAC GGGCAGTAT CAGCTTGGTT CCAAAACAGG GCC

(15) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:14

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
  - (A) COMPRIMENTO: 35 bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) TIPO DE CADEIA: simples
  - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA:
  - (A) DESCRIÇÃO: oligonucleótido
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: DNA sintético
- (ix) CARACTERÍSTICA
  - (D) INFORMAÇÃO: usada na preparação de construções
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:14

CTGTTTGGA ACCAAGCTGAT ACTGCCCGT ACGC

BIBLIOGRAFIA

- Arakawa, T. and Fox G.M., *Eur. Pat. Ap. No. 320,148* (1989).
- Baird, A., and Böhlen, P., *Handbook of Exp. Pharmacol.* 95(1): 369-418, Springer, 1990.
- Baird, A., et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85: 2324-2328 (1988).
- Bergonzoni, L., et al., *Eur. Pat. Pub. No. 363,675*, 18 April 1990.
- Eriksson, E.A., et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88: 3441-3445 (1991).
- Fiddes, J.C., et al., *Eur. Pat. Pub. No. 298,723* (1989).
- Franco, W.P., U.S. Pat. No. 4,378,347, Mar. 29, 1983.
- Gospardarowicz, D., et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81: 6963-6967 (1984).
- Mach, H., et al., *Biochemistry* 32: 5480-5489 (1993).
- Moscatelli, D., *J. Cell. Physiol.* 131: 123-130 (1987).
- Presta, M., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 1098-1107 (1992).
- Rosenberg, A.H., et al., *Gene* 56: 125-135 (1987).
- Seddon, A.P., et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 638: 98-108 (1991).
- Seno, M., et al., *Eur. Pat. Pub. Nos. 281,822* (1988) and 326,907 (1989).
- Wells, J.A., et al., *Gene* 34: 315-323 (1985).
- Zhang, J., et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88: 3446-3450 (1991).

Lisboa, 28 de Setembro de 2001

*Alberto Canelas*

ALBERTO CANELAS  
Agente Oficial da Propriedade Industrial  
RUA VICTOR CORDON, 14  
1200 LISBOA

## REIVINDICAÇÕES

1. Um antagonista do factor de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), compreendendo um análogo estrutural de FGF-2 seleccionado entre  $\text{Gln}^{138}\text{FGF-2}$  e  $\text{Gln}^{128,138}\text{FGF-2}$ , em que o referido análogo estrutural de FGF-2 apresenta afinidade de ligação aos receptores da superfície celular aproximadamente igual ou superior ao FGF-2 nativo, menor afinidade para a heparina ou polissacáridos do tipo heparina comparado com FGF-2 nativo e menor actividade mitogénica comparado com FGF-2 nativo.
2. Uma sequência de DNA codificadora do análogo estrutural de FGF-2 da reivindicação 1.
3. Utilização do antagonista de FGF-2 da reivindicação 1, que compreende o análogo estrutural, para a produção de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de neoplasmas angiogénicos num mamífero.
4. Uma célula hospedeira codificadora de  $\text{Gln}^{138}\text{FGF-2}$  depositada na ATCC com o número de acesso 69420.
5. Uma célula hospedeira codificadora de  $\text{Gln}^{128,138}\text{FGF-2}$  depositada na ATCC com o número de acesso 69418.

Lisboa, 28 de Setembro de 2001

*Alberto Canelas*

ALBERTO CANELAS  
Agente Oficial da Propriedade Industrial  
RUA VICTOR CORDON, 14  
1200 LISBOA

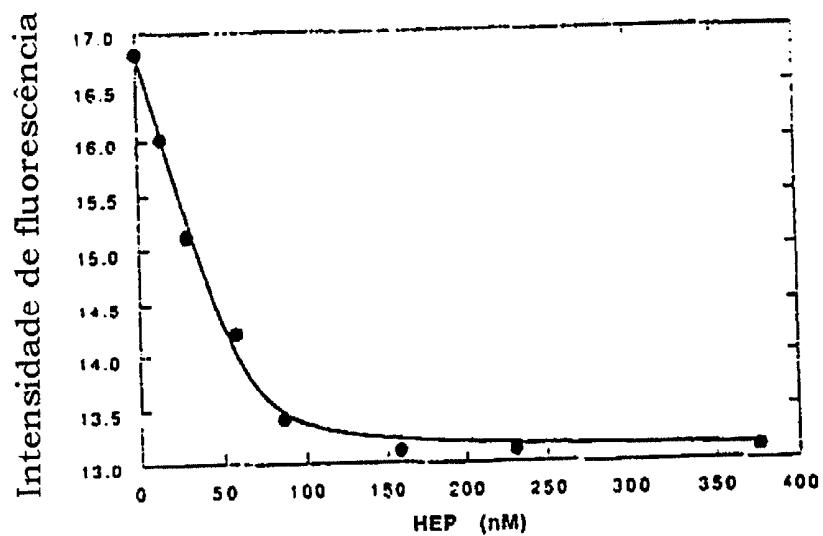


Figura 1A

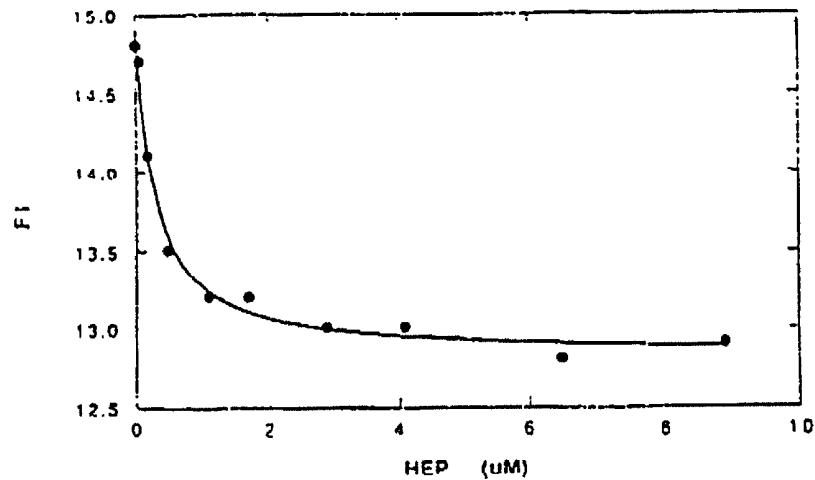


Figura 1B

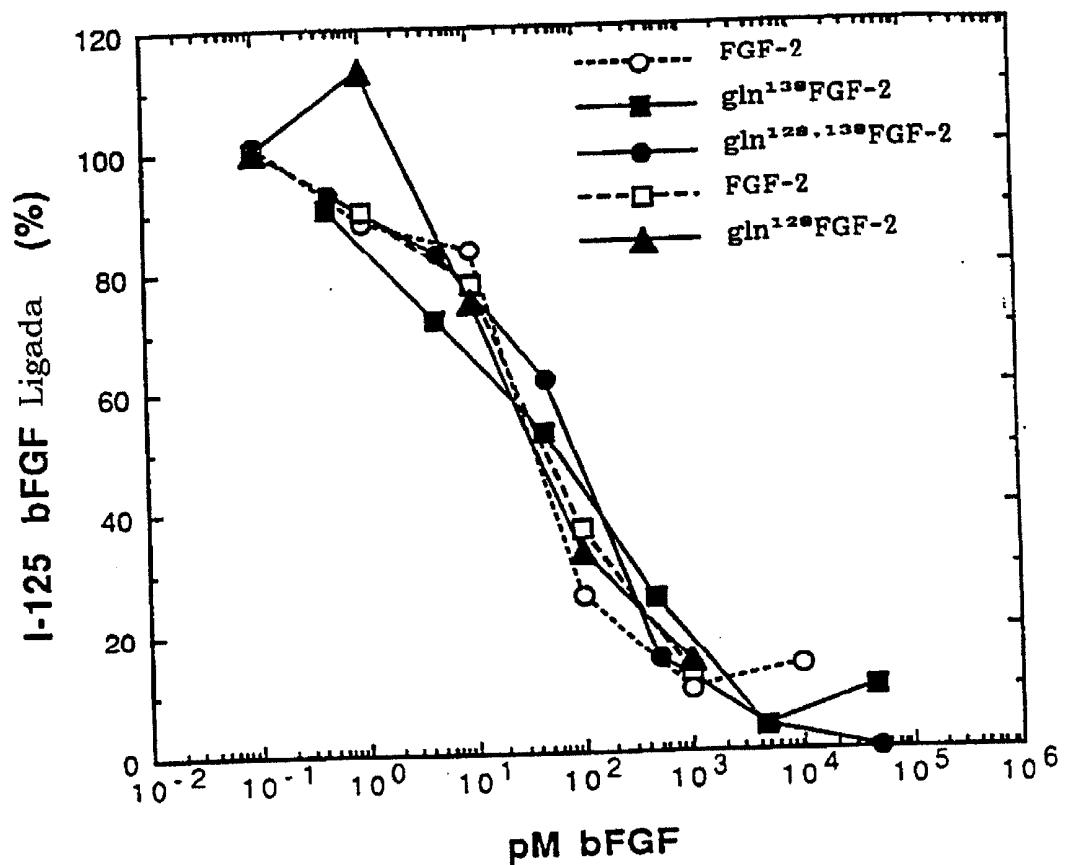


Figura 2

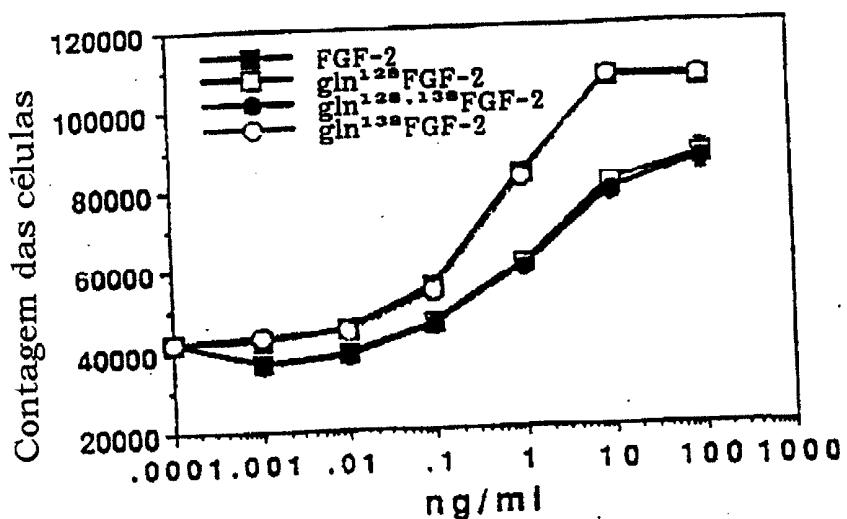


Figura 3A

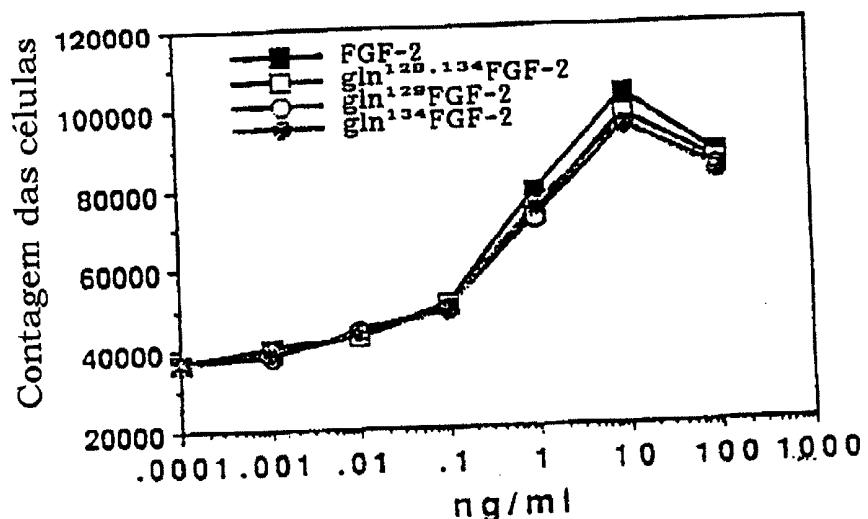


Figura 3B

4/5

Alberto Cunha

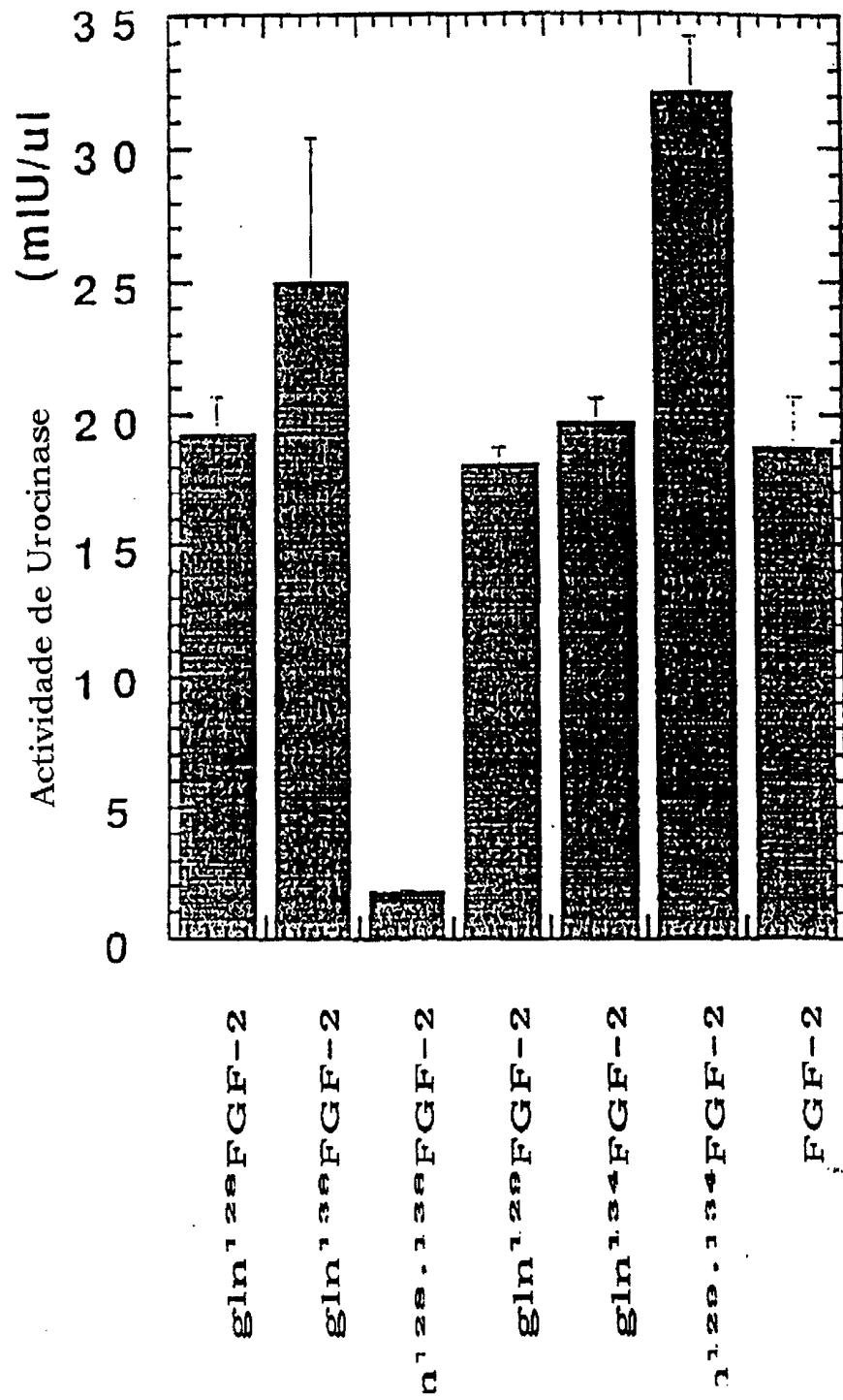


Figura 4

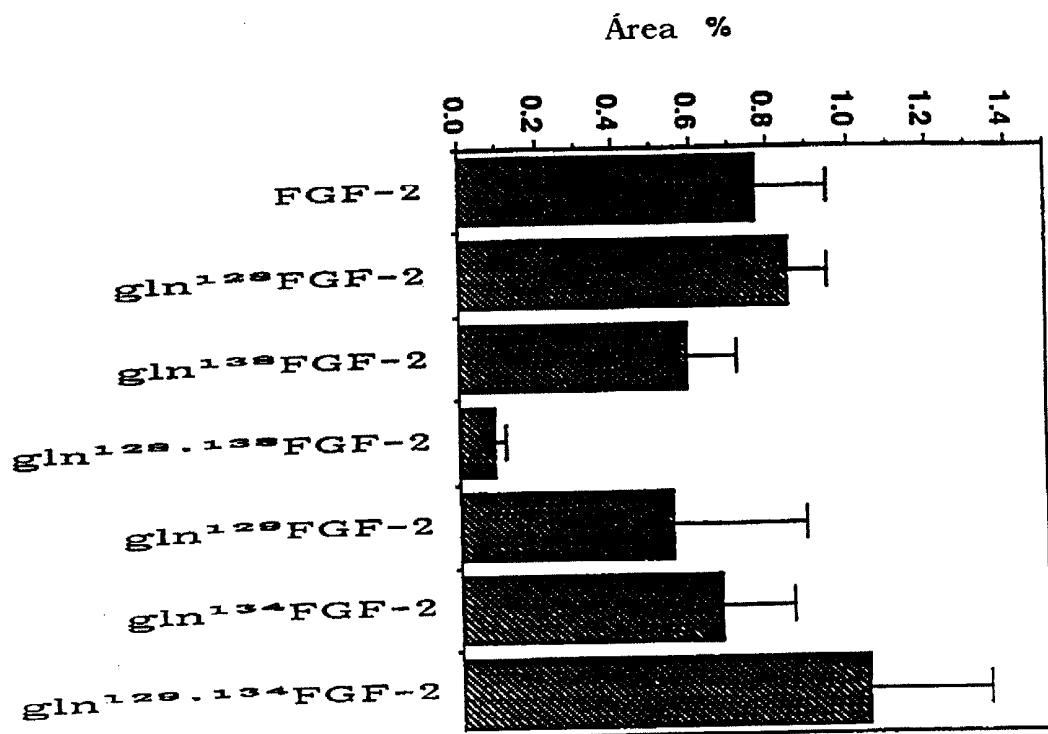


Figura 5