



INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação:* PT 657536 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6 )

C12N015/57 A C12N009/64 B  
C12N001/21 B C12N005/10 B  
A61K038/48 B C07K014/415 B

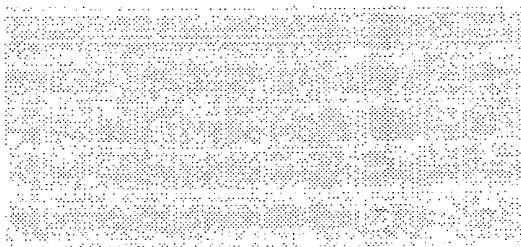
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1994.10.11	(73) <i>Titular(es):</i> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD. P.O. BOX 95 REHOVOT 76100 IL
(30) <i>Prioridade:</i> 1993.10.12 IL 10726893	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1995.06.14	(72) <i>Inventor(es):</i> DAVID WALLACH CORD BRAKEBUSCH EUGENE VARFOLOMEEV WEIZMANN MICHAEL BATKIN IL DE IL IL
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.07.18	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* INIBIDORES DE UMA PROTEASE QUE É CAPAZ DE CLIVAR O RECEPTOR SOLÚVEL P55 DE FNT SEPARANDO-O DO RECEPTOR DE FNT LIGADO ÀS CÉLULAS

(57) *Resumo:*

INIBIDORES DE UMA PROTEASE QUE É CAPAZ DE CLIVAR O RECEPTOR SOLÚVEL P55 DE FNT SEPARANDO-O DO RECEPTOR DE FNT LIGADO ÀS CÉLULAS



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.: H 518 EP



FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. <input checked="" type="checkbox"/>		MOD. UTI. <input type="checkbox"/>	MOD. IND. <input type="checkbox"/>	DES. IND. <input type="checkbox"/>	TOP. SEMIC. <input type="checkbox"/>	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º 657.536		(11)	N.º Objectos <input type="checkbox"/>	N.º Desenhos <input type="checkbox"/>	DATA DO PEDIDO ___/___/___ (22)	
REQUERENTE (71) <b>YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD., israelita, industrial, com</b> (NOME E MORADA) <b>sede em P.O. Box 95, Rehovot 76100, Israel</b> CÓDIGO POSTAL _____						
INVENTOR(ES)/AUTOR(ES) (72) <b>WALLACH, DAVID; BRACKEBUSCH, CORD; VARFOLOMEEV, EUGENE e BATKIN, MICHAEL.</b>						
REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)			FIGURA ( para interpretação do resumo)			
DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO				
EPÍGRAFE (54) <b>"INIBIDORES DE UMA PROTEASE QUE É CAPAZ DE CLIVAR O RECEPTOR SOLÚVEL p55 DE FNT SEPARANDO-O DO RECEPTOR DE FNT LIGADO ÀS CÉLULAS"</b>						
RESUMO (max. 150 palavras) (57) A invenção diz respeito a moléculas que influenciam a clivagem do receptor p55 do factor de necrose tumoral ligado às células (R-p55-FNT), conjuntamente com métodos para a sua produção. Mais particularmente, a invenção diz respeito a proteases que clivam o R-p55-FNT ligado às células, criando assim o receptor solúvel, e diz respeito aos inibidores para essas proteases que compreendem a sequência asn-172 até thr-182 do R-p55-FNT ou as suas muteínas.						

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

258  
1

## Descrição

### **“Inibidores de uma protease que é capaz de clivar o receptor solúvel p55 de FNT separando-o do receptor de FNT ligado às células”**

A presente invenção diz respeito a moléculas que influenciam a clivagem do receptor do factor de necrose tumoral p55 ligado às células (R-p55-FNT, em inglês p55-TNF-R) e à sua preparação. Mais particularmente, a invenção diz respeito a inibidores de uma protease que cliva o R-p55-FNT ligado às células, criando assim um receptor solúvel, e também diz respeito à sua utilização.

Sabe-se que há muitas proteínas da superfície das células que ocorrem também em formas solúveis. Algumas dessas moléculas solúveis são criadas tal qual *in vivo* a partir dos distintos ARNm e são transcritas por mecanismos de junção alternativos a partir dos mesmos genes que codificam as proteínas das superfícies das células. Há outras que são obtidas a partir de proteínas das superfícies das células, presumivelmente por clivagem proteolítica ou então, no caso das proteínas fixadas aos lípidos, pela clivagem do seu fixador lipídico. A clivagem das proteínas das superfícies das células pode ocorrer espontaneamente e a título de exemplo refere-se que presumivelmente as células cancerosas têm propensão para fazerem o mesmo. A separação também pode ser induzida por diversos agentes estimuladores.

O conhecimento dos mecanismos implicados na separação das proteínas das superfícies das células e na sua regulação é bastante limitado. Até ao momento presente ainda não foi identificada nenhuma protease ou lipase que faça parte desse mecanismo. Não há também nenhuns sinais evidentes respeitantes ao local subcelular em que isso ocorre - sobre a superfície

da célula ou no interior de quaisquer outros compartimentos intracelulares, tais como os lisozomas para onde são transportadas às proteínas das superfícies das células.

Estamos agora habilitados a esclarecer os mecanismos pelos quais uma proteína da superfície celular, que serve de receptor para uma citocina, o receptor p55 de FNT, é clivada pelas células. Há dois receptores distintos, os receptores p55 e p75, através dos quais o FNT, que é uma citocina produzida fundamentalmente pelos fagócitos mononucleares, inicia os seus efeitos múltiplos sobre a actividade celular. Os dois receptores são expressos em muitos tipos de células, ainda que em quantidades e proporções diferentes. A variação das suas quantidades parece afectar significativamente a natureza e a intensidade da resposta celular ao FNT. Uma das formas pela qual a sua expressão é regulada é através de uma clivagem induzida dos receptores. Estes podem ser clivados em resposta a tipos diferentes de agentes indutores, dependendo disso do tipo de células. Por exemplo, os granulócitos clivam os dois receptores em resposta ao péptido quimiotáctico fMLP (formil-metionil-leucil-fenilalanina) e clivam especificamente o seu receptor p75 quando tratado pelo FNT, ao passo que a clivagem do receptor p75, que é a espécie predominante de receptor de FNT nessas células, ocorre por estimulação com antigénios.

A clivagem dos dois receptores também pode ser induzida eficientemente pelo AMF (em inglês PMA) (acetato do miristato de forbol), pelo inibidor do fosfato de serina conhecido por ácido ocadeico e pelo ionóforo do cálcio A23187. Poder-se-ia demonstrar que o efeito do AMF reflecte a activação da proteína cinase C, ao passo que o efeito do ácido ocadeico parece envolver a função de outras cinases da serina. As sequências de aminoácidos das formas solúveis dos dois receptores que haviam sido isolados a partir da urina, correspondem a sequências de um módulo rico em cisteína que se prolonga ao longo de uma parte substancial do domínio

extracelular dos dois receptores das superfícies celulares. O terminal C da forma solúvel, obtida a partir da urina (Nophar Y. *et al.*, EMBO J., Vol. 9, Nº 10, págs. 3269-3278 (1990)) dos receptores p55, foi definida inicialmente como sendo Asn 172 que está localizada 11 resíduos a montante do domínio transmembranar deste receptor, ao passo que o terminal C da forma solúvel do receptor p75 corresponde ao resíduo localizado 44 aminoácidos a montante do domínio transmembranar deste receptor. No entanto, foi revelado posteriormente que também há na urina uma forma solúvel algo comprida do receptor p55, que se prolonga por mais 2 aminoácidos para jusante, no sentido do domínio intracelular (Wallach D. *et al.*, Tumor Necrosis Factor III, (Eds. T. Osawa e B. Bonavida) S. Karger Verlag (Basel) págs. 47-57 (1991)). Ainda não se sabe se estes terminais C correspondem aos locais onde o receptor havia sido inicialmente clivado após a sua libertação da superfície da célula ou se reflectem alguma outra clivagem da forma solúvel, que tenha ocorrido no soro ou na urina.

Para além do impacto da clivagem dos receptores do FNT sobre as quantidades dos receptores expressos nas superfícies das células, presume-se que este processo também contribua para o controlo da função do FNT através dos efeitos das formas solúveis dos receptores que conservam a capacidade para se ligarem ao FNT e que ao fazê-lo podem afectar a sua actividade de duas maneiras praticamente opostas. Por um lado, inibem a função do FNT ao competirem por ele com os receptores das superfícies celulares e, por outro lado, têm também um efeito estabilizador sobre o FNT e por tal motivo podem prolongar os seus efeitos. As formas solúveis das duas espécies dos receptor de FNT ocorrem no soro humano em concentrações que são normalmente muito baixas, ainda que aumentem extraordinariamente em diversas situações patológicas, aparentemente devido a uma maior clivagem dos receptores, atingindo níveis em que podem modular eficientemente a função do FNT.

258

Para se adquirir conhecimento sobre os mecanismos de clivagem dos receptores de FNT, temos procurado identificar os elementos estruturais no interior dos receptores que estão implicados na sua clivagem. Examinámos previamente o efeito das supressões citoplásmicas sobre a actividade e a clivagem do R-p55-FNT. Concluimos que a actividade sinaladora do receptor depende de algumas funções da parte do terminal C do domínio intracelular. No entanto, a sua clivagem e a intensificação da clivagem pelo AMF ocorre mesmo na ausência total deste domínio ((Brakebusch C. *et al.*, EMBO J., Vol. 11, págs. 943-950 (1992)).

Foi desvendada a existência de uma protease que é capaz de clivar o R-FNT solúvel a partir do R-FNT ligado às células, em que o R-FNT é preferencialmente o R-p55-FNT.

É possível preparar uma protease capaz de clivar o R-FNT solúvel, a partir do R-FNT ligado às células, por meio de um método que compreende os passos seguintes:

- a) preparação de um arquétipo que possui uma sequência de aminoácidos que inibe a protease,
- b) fixar o referido arquétipo a uma coluna de cromatografia por afinidade,
- c) fazer passar pela coluna uma amostra biológica que contenha a protease e
- d) recuperar a protease a partir da coluna.

Após o isolamento purifica-se a protease por métodos convencionais.

O arquétipo anteriormente referido pode ser preparado por métodos recombinantes conhecidos.

O arquétipo pode conter um péptido sintético.

A presente invenção diz respeito a inibidores de uma protease capaz de clivar o R-p55-FNT solúvel a partir do R-FNT ligado às células, que consiste de uma sequência que compreende os resíduos aminoácidos, indicados na figura 5, dos arquétipos seguintes:

288

- a)  $\Delta$  172-173
- b)  $\Delta$  173-174
- c)  $\Delta$  174-175
- d)  $\Delta$  173
- e) V 173 P
- f) K 174 P
- g) G 175 P
- h) V 173 D
- i) V 173 G.

Tais inibidores também podem ser muteínas dos arquétipos referidos antes.

A figura 1 ilustra a sequência de nucleótidos e de aminoácidos do R-p55-FNT, em que a região transmembranar está assinalada por um rectângulo de extremidades arredondadas, os resíduos cisteínas estão enquadrados por rectângulos e os locais de glicosilação putativa estão sobrelinhados. O sobrelinhado a traço interrompido indica o terminal N do R-p55-FNT solúvel e as setas indicam os terminais C principal e secundário do R-p55-FNT solúvel.

A figura 2 é uma representação diagramática das moléculas quiméricas do receptor de FCE (em inglês EGF) dos murinos e de R-p55-FNT dos seres humanos, utilizadas para se estudar o envolvimento dos domínios transmembranar e intracelular do R-p55-FNT na sua clivagem.

A figura 3 mostra o resultado de um teste sobre a capacidade do AMF para induzir a clivagem de moléculas quiméricas da figura 2, isto em termos da capacidade de as células as exprimirem para se ligarem ao FNT marcado radioactivamente após o tratamento com AMF.

A figura 4 mostra os resultados do teste, tal como na figura 3, mas em termos da quantidade de R-p55-FNT solúvel clivado pelas células.

258  
6

A figura 5 mostra os mapas de diversos mutantes de R-p55-FNT testados no estudo das exigências estruturais para a separação.

A figura 6 mostra os resultados de um teste sobre a capacidade do AMF para induzir a clivagem de alguns dos mutantes da figura 5, em termos da capacidade de as células A9 os exprimirem para se ligarem ao FNT marcado radioactivamente após o tratamento com AMF.

A figura 7 mostra os resultados de um teste sobre a capacidade do AMF para induzir a clivagem de alguns dos mutantes da figura 5, em termos das quantidades de R-p55-FNT solúvel separado pelas células.

A figura 8 mostra os resultados de um teste sobre a capacidade do AMF e do pervanadato para induzirem a clivagem de alguns dos mutantes das figuras 2 e 5, em termos da capacidade das células COS-7 os exprimirem transitoriamente para se ligarem ao FNT marcado radioactivamente após o tratamento com AMF.

A figura 9 mostra os resultados de um teste sobre a capacidade do AMF e do pervanadato para induzirem a clivagem de alguns dos mutantes das figuras 2 e 5, em termos das quantidades de R-p55-FNT solúvel separado pelas células.

Conforme aqui descrito, utilizámos agora uma metodologia diferente para a determinação do papel dos diferentes domínios do R-p55-FNT sobre a sua clivagem. Para o efeito, substituímos diferentes partes do R-p55-FNT com as partes correspondentes do receptor de FCE que não é clivado em resposta a agentes que induzam a clivagem do R-p55-FNT. O estudo da separação destas moléculas quiméricas indicou que essa separação (clivagem) e a sua intensificação por meio de agentes indutores não são afectadas pela estrutura das regiões da molécula receptora que estão inseridas na célula - tanto os domínios intracelular como transmembranar - nem pela parte do receptor que é clivada, designadamente o módulo rico em resíduos cisteína no seu domínio extracelular. A única região cuja estrutura afecta a separação é a que está localizada

258

junto àquilo que parece ser o local de clivagem do receptor, designadamente a região separadora no domínio extracelular que liga o módulo rico em resíduos cisteína ao domínio transmembranar. Num esforço para se definir ainda melhor as exigências estruturais da clivagem, estudos minuciosos sobre a clivagem por acção das mutações na região separadora revelaram que a clivagem depende da sequência de uma forma bastante complicada e com base nisso deve ser possível conceber agentes farmacêuticos que permitam controlar a actividade da protease.

Para se esclarecer as exigências estruturais da clivagem dos R-p55-FNT, fez-se uma avaliação dos efeitos de diversas mutações do receptor sobre a sua clivagem. Numa primeira fase, tivemos como objectivo a ideia geral da relação das necessidades estruturais para a clivagem do receptor e para a sua sinalização. Assim, efectuámos a expressão dos diversos mutantes constitutivamente em células A9 do murganho que são sensíveis ao efeito citocida do FNT, tendo então sido determinada a sua clivagem por essas células. No entanto, uma vez que a variação interclonal indígena desta forma de proceder não permitiu uma avaliação suficientemente sensível dos efeitos parciais das mutações sobre a clivagem dos receptores, considerou-se que era preferível determinar a clivagem dos mutantes receptores pela sua expressão transiente em células COS-7 do macaco. Este ensaio de expressão transiente também obviou a necessidade de se efectuar o isolamento tedioso de clones de células que exprimem os receptores transfectados.

Embora as células aplicadas em sistemas de ensaio de expressão constitutiva e transiente tivessem sido diferentes, a clivagem do receptor p55 por meio delas ocorreu de maneiras semelhantes e foi afectada igualmente por um conjunto de mutações diferentes. Nos dois sistemas de ensaio, o acetato do miristato de forbol (AMF), que é um activador da cinase C da serina das proteínas, e também o ortovanadato e com menor significado o peroxivanadato, que facilita os efeitos da cinase da tirosina, provocaram um aumento nítido da clivagem, manifestado por uma maior velocidade de aparecimento de receptores solúveis nos meios de crescimento

das células, concomitantemente com uma diminuição da quantidade dos receptores expressos à superfície das células. Este efeito foi rápido, atingindo uma intensidade significativa em menos de um minuto. A sua velocidade inicial foi pouco afectada pelo agente CHI que bloqueia a síntese de proteínas, ou pelo cloreto de amónio que inibe as actividades lisozómicas. Observou-se uma diminuição significativa da velocidade de clivagem também no caso em que as células ficaram a incubar a uma temperatura baixa. No entanto, em incubação prolongada foi possível observar um certo grau de clivagem, mesmo a 0°C.

Também foi possível observar um certo grau de clivagem dos receptores na ausência de qualquer agente indutor. A velocidade desta clivagem espontânea variou de um mutante receptor para outro, proporcionalmente às suas velocidades de clivagem induzida. Nas células COS-7 de expressão transitória, a velocidade de clivagem espontânea foi bastante elevada, daí resultando a acumulação de quantidades significativas dos receptores solúveis nos meios de crescimento, já antes da aplicação de quaisquer agentes indutores; pareceu suficientemente elevada para afectar o nível do estado estacionário dos receptores das superfícies celulares, uma vez que se concluiu que os receptores que podiam ser eficazmente clivados era expressos pelas células COS-7 em quantidades significativamente mais pequenas do que os receptores mutacionados, de uma forma que diminuiu a sua clivagem. Para levar em consideração esta diferença na expressão dos diversos mutantes receptores, optámos por comparar a eficácia da clivagem dos diversos mutantes, procurando relacionar a proporção quantitativa entre a quantidade de receptores solúveis que se acumularam nos meios de crescimento durante o período de indução da clivagem e a quantidade dos receptores das superfícies celulares no início do período de indução.

Concluimos que a clivagem do R-p55-FNT ocorre independentemente das propriedades das sequências do domínio intracelular ou transmembranar do receptor, ou independentemente da

estrutura da parcela do domínio extracelular que é clivada. A única região cuja sequência de aminoácidos afecta a clivagem do receptor é aquela em que ocorre a clivagem, designadamente a região separadora que une o módulo rico em resíduos cisteína no domínio extracelular com o domínio transmembranar. Parece que no interior desta região, não só os resíduos que se encontram imediatamente adjacentes ao local de clivagem mas também alguns dos outros resíduos afectam este processo.

A clivagem do receptor p55 foi induzida utilizando agentes que reforçam a fosforilação das proteínas. O envolvimento da fosforilação induzida, em termos de indução deste processo, é o de ser provavelmente responsável, pelo menos parcialmente, pela sua dependência energética. Aparentemente, a clivagem pode ser induzida pelos efeitos de diversas cinases diferentes, incluindo outra cinase C das proteínas, distinta (Brakebusch *et al.*, 1992, ver *supra*), a cinase da serina e conforme se descortinou agora, também as cinases da tirosina. No entanto, não observámos nenhuma diferença nítida na forma pela qual as mutações no R-p55-FNT afectam a clivagem induzida pelo AMF, que é um activador da cinase C das proteínas, ou pelo pervanadato, que facilita a actividade das cinases da tirosina, sugerindo isso que estas diferentes cinases activam o mecanismo comum de clivagem.

É improvável que a proteína cuja fosforilação tem como resultado a indução da clivagem do receptor possa ser o próprio receptor. O facto de a clivagem não ser evitada pela substituição dos domínios do R-p55-FNT que são inseridos no interior da célula, com as correspondentes partes do R-FCE, que é um receptor que não é clivado, parece comandar um envolvimento da fosforilação do receptor, ou de qualquer outra alteração nele induzida, no mecanismo de clivagem. A respeito disso, há um interesse particular, para além da falta de um efeito sobre a clivagem, no facto de as regiões da molécula do R-FCE que foram introduzidas na quimera com o R-p55-FNT não imporem a incorporação do receptor, o que parece excluir um papel

258  
10

para a incorporação induzida na clivagem. A resistência da clivagem ao cloreto de amónio e à cloroquina, que são agentes sobre os quais se sabe que inibem os processos degradativos no interior dos compartimentos acídicos intracelulares, e tendo em conta o facto de ocorrer um certo grau de clivagem mesmo quando a incubação das células é feita a 0°C, o que deveria evitar qualquer incorporação de proteínas, exclui a existência de outro papel da incorporação dos receptores no processo.

Os requisitos das sequências para a clivagem do R-p55-FNT nas células A9 do murganho e nas células COS-7 do macaco são muito semelhantes, talvez idênticos, sugerindo isso que participam na clivagem proteases iguais ou semelhantes, nestas células diferentes. Dito de forma mais concreta, os resultados obtidos, de acordo com a presente invenção, indicam que a sequência curta de aminoácidos no R-p55-FNT é essencial e suficiente para a sua clivagem. Esta sequência está situada na chamada sequência separadora entre a região transmembranar e a região do domínio extracelular rico em Cis pertencente ao receptor, sendo mais importantes os resíduos aminoácidos Asn 172, Val 173, Lis 174 e Gli 175 e em particular o resíduo Val 173. De forma interessante, a clivagem do receptor é geralmente independente da identidade da cadeia lateral dos resíduos anteriormente referidos, com a excepção de uma dependência relativa da identidade de Val 173 (v.g., a substituição de Asn 172, Lis 174 e Gli 175 por Ala) não ter afectado prejudicialmente a clivagem do receptor. No entanto, as mutações que alteram a conformação da proteína (v.g., a substituição de qualquer dos resíduos anteriores com Pro) afectou prejudicialmente o processo de clivagem. Este atributo da sequência é bastante diferente de qualquer atributo da sequência para a actividade de proteases conhecidas e até ao momento descritas.

A identificação e a purificação da protease, apesar de não haver um conhecimento minucioso sobre as suas propriedades bioquímicas específicas, podem ser conseguidas, v.g.,

por cromatografia de afinidade. Para o efeito, os arquétipos que comprovem que actuam como inibidores da protease são acoplados a uma coluna convencional de cromatografia por afinidade, (isto é, carregada com 'Affi-Gel 10'). Também é possível utilizar outros suportes sólidos conhecidos, tais como outras geloses, resinas ou plásticos.

Há inúmeros materiais biológicos disponíveis como fontes de actividade das proteases. Entre estes estão compreendidos tecidos, células, extractos ou fluídos àqueles associados que sejam preferencialmente, mas não necessariamente, de origem imunológica. Também podem ser utilizadas linhagens de células bem definidas. Em geral, é possível utilizar todas as células que exprimam os R-FNT, enquanto fontes de proteases.

As células podem ser utilizadas como na purificação por afinidade ou podem ser estimuladas para produzirem níveis mais elevados de proteases, sendo para tal usados activadores conhecidos para as células particulares utilizadas.

É possível utilizar uma protease, tal como aqui descrita, ou qualquer molécula dela derivada e que aumente a actividade da protease, para fazer diminuir a quantidade dos R-FNT ligados às células e consequentemente para conferir protecção contra uma resposta excessiva aos FNT.

Assim sendo, estas proteases são indicadas para o tratamento de doenças provocadas por um excesso de FNT, quer sejam administradas por via exógena quer sejam produzidas endogenamente.

Pelo contrário, é possível utilizar os inibidores de proteases para evitar a clivagem dos R-FNT, v.g. nos casos em que seja necessário reforçar as actividades benéficas dos FNT, v.g., no tratamento de células tumorais utilizando os FNT. Isto irá levar a um aumento da eficácia da actividade antitumoral.

238  
12

Seguidamente ilustrar-se-á a invenção por meio de exemplos não limitativos adiante descritos.

#### Materiais e procedimentos gerais

##### a) **Construção dos mutantes de R-p55-FNT e das quimeras de R-p55-FNT-R-FCE**

Fez-se digerir o ADNc do R-p55-FNT-hu (em inglês hu-p55-TNF-R) (Nophar Y. *et al.*, EMBO J., Vol. 9, págs. 3269-3278 (1990)) com BanII e NheI, daí resultando a remoção da maior parte das sequências não codificadoras em 5' e 3'. Os mutantes R-p55-FNT foram gerados por mutação dirigida pelos oligonucleótidos, tendo para tal sido utilizado o estojo de mutagénese 'Altered Sites' (Promega, Madison, WI). As mutações foram confirmadas por sequenciação das regiões relevantes. Os fragmentos dos ADNc do R-p55-FNT-hu e do receptor de FCE (R-FCE), utilizados para a criação das quimeras de receptores, foram produzidos por RCP, utilizando a polimerase de ADN 'Vent' (New England Biolabs, Beverly, MA). Algumas das quimeras (designadas por C3, C4, C5 e C6 na figura 2) foram construídas utilizando ADNc de R-FCE de murganho (Avivi A. *et al.*, Oncogene, Vol. 6, págs. 673-676 (1991)), gentilmente fornecido pelo Dr. D. Givol do Instituto Weizmann em Rehovot, Israel, e outras quimeras (v.g., a designada por C9 na figura 2) foram construídas utilizando ADNc de R-FCE (Merlino G.T. *et al.*, Mol. Cell. Biol., Vol. 5, págs. 1722-1734 (1985)), gentilmente fornecidas pelo Dr. G. Merlino e pelo Dr. I. Pastan, NIH, Bethesda, MD. Para a expressão constitutiva dos receptores de tipo natural ou mutacionados, em células A9, aqueles foram introduzidos no interior do vector de expressão eucariótica pMPSVEH (Artelt P. *et al.*, Gene, Vol. 68, págs. 213-219 (1988)), gentilmente fornecido pelo Dr. H. Hauser, GBF, Braunschweig, Alemanha), o qual contém o promotor do vírus do sarcoma mieloproliferativo. Para a expressão transiente dos receptores em células

COS-7, aqueles foram introduzidos no interior do vector pEXV1 (Miller, J. e Germain, R.N., J. Exp. Med. Vol. 164, págs. 1478-1489 (1986), o qual contém o promotor antecipativo e o intensificador do vírus VS40. Em todos os arquétipos de R-p55-FNT-hu expressos em células COS-7, os receptor foi citoplasmicamente truncado a partir do resíduo 207 a jusante (para além das outras mutações especificadas).

**b) Expressão constitutiva e transiente dos receptores de tipo natural e mutantes**

Criou-se em cultura células A9 (Littlefield, J.W., Nature, Vol. 203, págs. 1142-1144 (1964)) e células COS-7 (Gluzman, Y., Cell, Vol. 23, págs. 175-182 (1981)) em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (MEMD) que continha 10% de soro fetal de vitelo (SFV), penicilina na concentração de 100 unidades/mL e estreptomycin na concentração de 100 µg/mL (meio de crescimento). As células A9 foram transfectadas com os arquétipos de expressão pMPSVEH conjuntamente com o plasmídeo pSV2neo e as colónias de células que exprimem de forma constitutiva estes arquétipos foram isoladas conforme já descrito previamente (Brakebusch C. *et al.*, EMBO J., Vol. 11, págs. 943-950 (1992)). A expressão transiente dos arquétipos pEXV1 em células COS-7 foi realizada do modo seguinte: um dia depois de as células COS-7 terem sido utilizadas como inóculos, segundo uma densidade celular de 60%, foram transfectadas aplicando-lhes o ADN dos arquétipos durante 4 horas, segundo uma concentração de 3 µg/mL em MEMD (4 mL/prato de 10 cm, 10 mL/prato de 15 cm) contendo DEAE-dextrano (200 µg/mL, Pharmacia, Uppsala, Suécia). As células foram então enxaguadas com MEMD e ficaram a incubar durante 2 minutos em STP (cloreto de sódio 0,154 M + fosfato de sódio 10 mM a pH 7,4) contendo CaCl<sub>2</sub> 1 M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM e 10% (v/v) de DMSO. Enxaguou-se as células que ficaram outra vez a incubar durante 10 horas em meio de crescimento e depois foram separadas

por tripsinização e usadas como inóculos quer em pratos de cultura de 1,5 cm ( $10^5$  células/prato) quer em pratos de 15 cm (para se avaliar a clivagem do R-FCE marcado metabolicamente), à razão de  $1,2 \times 10^6$  células/prato. A expressão e a eficácia da clivagem dos receptores codificados pelos arquétipos transfectados foram avaliadas 48 horas mais tarde.

c) **Determinação da ligação do FNT e do FCE às células**

Utilizou-se F- $\alpha$ NT (em inglês TNF $\alpha$ ) humano recombinante (FNT,  $6 \times 10^7$  U/mg de proteína, Genetech Co., San Francisco, CA, gentilmente fornecido pelo Dr. G. Adolf do Instituto Boehringer, Viena de Áustria) que foi marcado radioactivamente com cloramina T até se obter uma radioactividade específica de 500 Ci/mmol (Israel, S. *et al.*, Immunol. Lett., Vol. 12, págs. 217-224 (1986). O FCE ( $\beta$ -urigastrona, Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Mannheim, Alemanha) foi marcado com [ $^{125}$ I] até se obter uma radioactividade específica de 300 Ci/mmol utilizando o reagente 'IODOGEN' (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, E.U.A), em conformidade com as instruções do fabricante. A ligação do FNT e do FCE, marcados radioactivamente, às células foi determinada aplicando-os às células sobre gelo, para uma concentração de 1 nM, quer por si sós quer com um excesso 100 vezes superior de citoquinas não marcadas, conforme já previamente descrito (Brakebusch *et al.* (1992), *supra*).

d) **Medição da clivagem das formas solúveis de R-p55-FNT-hu e de R-FCE**

Com as células A9 que exprimem constitutivamente os arquétipos transfectados inoculou-se, 24 horas antes da experiência, placas de cultura de tecidos de 1,5 cm, segundo uma densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/placa. Com as células COS-7 que exprimem transientemente os arquétipos transfectados inoculou-se placas de cultura de tecidos de 1,5 cm, 48 horas antes

258

da experiência, conforme descrito *supra*. No instante 0, colocou-se algumas placas sobre gelo para se determinar a ligação dos FNT ou FCE, marcados radioactivamente, às células, antes da indução da clivagem. O meio existente nas outras placas foi substituído por MEMD recente (200  $\mu$ L/placa), quer na ausência de soro (para os testes em que se utilizou PV como agente para induzir a clivagem) quer com 10% de SFV (para os outros testes). Salvo quando indicado de outro modo, aplicou-se AMF (20 ng/mL), preparado conforme descrito por Fantus, I.G. *et al.*, *Biochemistry*, vol. 28, págs. 8864-8871 (1989)) às células durante 1 hora. A aplicação de cloroquina (50  $\mu$ g/mL), cloreto de amónio (10 mM) ou ciclo-heximida (50  $\mu$ g/mL) às células foi feita 30 minutos antes da aplicação de AMF ou PV, a que se seguiu um período de incubação com estes agentes durante 20 minutos após a adição dos últimos reagentes. Depois de terminada a incubação com os agentes indutores da clivagem, transferiu-se as placas para gelo para se determinar a ligação do FNT ou do FCE, marcados com radioisótopos, às células. Determinou-se as quantidades da forma solúvel do R-p55-FNT-hu nos meios de crescimento das células, após a centrifugação a 3000 x g durante 5 minutos para se remover as células destacadas e os resíduos celulares, seguindo-se uma concentração dos meios para um valor 5 vezes superior, tendo para tal sido utilizado o concentrador 'SpeedVac' (Savant, Farmingdale, NY). Efectuou-se a determinação por meio de um protocolo de EISLE de captura em dois locais, utilizando um anticorpo monoclonal de murganho e o anti-soro de coelho contra esta proteína, conforme descrito (Aderka, D. *et al.*, *Cancer Res.*, vol. 51, págs. 5602-5607 (1991)).

Para se avaliar a formação da forma solúvel do R-FCE foram utilizadas célula COS-7 transfectadas com os arquétipos de R-FCE (1,2 x 10<sup>6</sup> células, utilizadas como inóculos em pratos de 15 cm, conforme descrito antes) que foram marcadas com [<sup>35</sup>S]-metionina, por incubação durante 10 horas a 37°C em MEMD (sem metionina) contendo [<sup>35</sup>S]-metionina ao valor de

70  $\mu\text{Ci/mL}$  e 2% de SFV dialisado. Depois enxaguou-se as células que ficaram outra vez a incubar durante 1 hora em meio de crescimento que continha AMF (20 ng/mL). Recolheu-se o meio, eliminou-se dele os resíduos celulares por centrifugação e depois fez-se ainda mais uma limpeza para lhe retirar as proteínas que se ligam de forma não específica à proteína A, isto por incubação do meio 2 vezes a 4°C durante 4 horas com proteína A imobilizada (Repligen Inc., Cambridge, MA; 100  $\mu\text{L}/7\text{ mL}$  de meio/placa), uma vez por si só e uma vez na presença de 10  $\mu\text{g}$  de anticorpos monoclonais irrelevantes de murganho. Depois efectuou-se uma imunoprecipitação por incubação de amostras do meio a 4°C durante 2,5 horas com um anticorpo monoclonal contra o R-FCE humano ou então, como contraprova, utilizando um anticorpo monoclonal contra o R-p55-FNT-hu, em cada caso à razão de 5  $\mu\text{g}/\text{amostra}$ , seguindo-se outra incubação durante 2,5 horas com proteína A imobilizada (40  $\mu\text{L}$ ). As esférulas de proteína A foram lavadas três vezes com STP que continha 0,2% de desoxicolato de sódio e 0,2% de NP-40 e depois as proteínas que lhe ficaram acopladas foram analisadas por EGPA-DSS em condições redutoras (7,5% de acrilamida). Foram obtidas autorradiografias após o tratamento do gel com o reagente intensificador 'Amplify' (Amersham International plc, Amersham, UK).

e) **Apresentação dos resultados**

Todos os resultados sobre a clivagem dos receptores, apresentados nos exemplos 1 a 3 subsequentes e nas figuras anexas, isto é, figuras 3, 4 e 6 a 9, são exemplos representativos correspondentes pelo menos a 4 experiências com resultados qualitativamente semelhantes, em que cada arquétipo foi testado em triplicado. Faz-se observar que a eficácia da expressão dos arquétipos variou de forma bastante intensa (na sua expressão constitutiva entre diferentes

clones de células e na sua expressão transiente entre arquétipos diferentes). Os resultados sobre a intensidade da clivagem foram pois normalizados mediante a determinação da sua relação com os níveis iniciais de receptores nas células, antes da indução da clivagem. As quantidades de receptores ligados às superfícies das células, obtidos após a indução, são apresentadas em termos de percentagens das suas quantidades iniciais (ver as figuras 3, 6 e 8) e portanto, as formas dos receptores que são clivados revelam uma percentagem menor de receptores remanescentes nas superfícies das células do que as formas que não são clivadas. As quantidades de receptores solúveis formados em consequência da clivagem são apresentadas em unidades relativas (ver as figuras 4, 7 e 9), isto é, a quantidade dos receptores solúveis produzidos durante a indução da clivagem (em pg) por quantidade de receptores das superfícies das células imediatamente antes da indução da clivagem (em cpm x 10<sup>-3</sup> de FNT marcado radioactivamente e ligado às células), e consequentemente as formas dos receptores que são clivados revelam quantidades mais elevadas do que as dos receptores que não são clivados. A numeração dos resíduos no R-p55-FNT-hu está em conformidade com a metodologia de Schall, T.J. *et al.*, Cell, vol. 61, págs. 361-370 (1990), no R-FCE do murganho está de acordo com a metodologia de Avivi, A. *et al.*, (1991), *supra*, e no R-FCE humano está de acordo com a metodologia de Ulrich, A. *et al.*, Nature, Vol. 309, págs. 418-425 (1984).

**Exemplo 1: utilização de quimeras do receptor p55 do FNT e do R-FCE para a avaliação do papel que têm na sua clivagem as diferentes regiões existentes no receptor de FNT**

O nosso estudo sobre trabalhos anteriores respeitantes à clivagem de mutantes do receptor p55, obtidos por supressões citoplásmicas, indicou que a clivagem e o seu reforço efectuado pelo AMF ocorrem independentemente do domínio intracelular do receptor. Para

se explorar melhor o papel dos diferentes domínios existentes no receptor sobre a sua clivagem, procurámos substituí-los com a região correspondente num receptor que não é clivado. O receptor para o factor de crescimento epidermal (FCE) pareceu-nos ser adequado para esse fim. O AMF induz uma diminuição da expressão deste receptor, ainda que aparentemente não pela sua clivagem mas pela indução da incorporação deste receptor no interior da célula. Esta incorporação foi relacionada com a fosforilação induzida do seu domínio intracelular. Foi criado um conjunto de quimeras (ver a figura 2 para as diversas quimeras designadas por C3, C4, C5, C6 e C9) entre o R-p55-FNT e o mutante do R-FCE obtido por supressões citoplásmicas, tendo sido testadas essas quimeras com o intuito de se pesquisar a intensidade da clivagem das quimeras em resposta ao AMF e ao pervanadato (ver o capítulo respeitante a procedimentos gerais, *supra*). O R-FCE mutacionado não foi clivado nem incorporado pelas células em resposta ao AMF, nem em resposta ao pervanadato (resultados não apresentados). Os dois agentes induziram realmente a clivagem de um receptor quimérico constituído pela parte restante do domínio intracelular e do domínio transmembranar do receptor do FCE e pelo domínio extracelular do receptor p55 do FNT (figura 2, quimeras C5 e C6). No entanto, os receptores quiméricos em que foi suprimida a região “separadora” no domínio extracelular do R-p55-FNT, que liga o módulo rico em cisteína com o domínio transmembranar (figura 2, quimeras C3 e C4) ou em que essa região foi substituída com a região correspondente no R-FCE (figura 2, quimera C9), não puderam ser clivados. Estes resultados indicam que os requisitos estruturais para a clivagem do receptor p55 do FNT e para o seu reforço pelo AMF e pelo pervanadato estão totalmente confinados à região separadora.

Conforme se observa nas figuras 3 e 4, que apresentam os resultados de um teste sobre a clivagem das quimeras de receptores p55 FNT/FCE ilustradas na figura 2, expressas

constitutivamente em células A9, as quimeras que contêm a região separadora do R-p55-FNT (quimeras C5 e C6) são clivadas ao passo que as que não contêm essa região (quimeras C3 e C4) não são clivadas em resposta ao AMF. Conforme se observa nas figuras 8 e 9, o mesmo é válido para a clivagem destes arquétipos em resposta quer ao AMF quer ao pervanadato (PV) pelas células COS-7 que os exprimem transientemente.

### **Exemplo 2: efeitos das supressões de aminoácidos na região separadora, sobre a clivagem**

Demonstrámos anteriormente que os mutantes de R-p55-FNT dos quais foi suprimida a maior parte da região separadora não clivam nem espontaneamente nem em resposta ao AMF (Brakebusch D. *et al.*, Tumor Necrosis-Factor IV (Ed. W. Fiers) S. Karger, Verlag (Basel) págs. 191-198 (1993)). Para se definir melhor quais os resíduos aminoácidos cuja supressão é importante para a inexistência de clivagem dos receptores, criámos formas mutantes de receptores em que foram suprimidos diversos pares de aminoácidos consecutivos no interior das regiões separadoras e examinámos a sua clivagem (ver o capítulo respeitante a procedimentos gerais, *supra*). Os diversos mutantes obtidos por supressões, que foram estudados, estão representados na parte superior da figura 5 em que o símbolo "Δ" indica a supressão e o(s) número(s) a seguir ao símbolo "Δ" indicam os resíduos aminoácidos que foram suprimidos.

Conforme se observa nas figuras 8 e 9, qualquer supressão de dois ou mais aminoácidos no interior da região separadora tem como resultado uma certa diminuição da eficiência da clivagem do receptor a partir das células COS-7 que os exprimem transientemente, em resposta ao AMF ou ao pervanadato. No entanto, a diminuição mais extraordinária de eficiência ocorre na supressão de Val 173 ou do par 173-174. Foi observada uma diminuição um pouco menos eficaz ao suprimir os pares 172-173 e 174-175. Os dados que constam das figuras 6 e 7, sobre

a clivagem a partir de células que exprimem constitutivamente os mutantes dos receptores, revelam que as supressões 172-173 e 173-174 também têm um efeito redutor extraordinário sobre a clivagem dos receptores a partir das células A9 que os exprimem constitutivamente. Estes dados demonstram que os resíduos 173, 174 e 175 têm um papel importante na determinação da especificidade da protease que cliva o R-p55-FNT. Além disso, fica implícito que há também outros parâmetros restritivos estruturais na região separadora que afectam a sua clivagem.

### **Exemplo 3: efeitos das substituições de aminoácidos na região separadora, sobre a clivagem**

Para se definir melhor quais os resíduos aminoácidos no interior da região separadora que afectam a clivagem dos receptores, substituímo-los, um por um, com alanina (para os mutantes por substituição com alanina veja-se a secção média da figura 5 em que o resíduo aminoácido que ocorre normalmente está identificado à esquerda dos números correspondentes e a alanina (A) que substitui esse resíduo está indicada à direita desses números, representando tais números a posição da substituição). A avaliação da clivagem destes receptores mutacionados, depois de terem sido expressos constitutivamente em células A9, ou depois de terem sido expressos transientemente em células COS-7, não permitiu concluir se havia um efeito de qualquer destas mutações, conforme ilustrado nas figuras 6 e 7 (células A9) e nas figuras 8 e 9 (células COS-7), em que os mutantes por substituição com alanina estão identificados por um "A" antes do número do resíduo da substituição.

No entanto, a substituição dos resíduos 173, 174 e 175 por prolina (P) teve como resultado uma diminuição extraordinária da clivagem dos receptores pelas células A9 que os

exprimem transientemente. Além disso, outras substituições determinadas de aminoácidos na posição 173 também tiveram como resultado uma diminuição significativa da eficiência da clivagem (figuras 6 a 9). Estes dados permitem concluir mais uma vez que os resíduos 173-175 têm um papel importante na restrição da actividade da protease que cliva o R-p55-FNT (para os mutantes por substituições com prolina (P) e com outros aminoácidos veja-se a secção inferior da figura 5 em que as denotações das mutações são como se disse antes).

#### **Exemplo 4: purificação da protease por afinidade**

Liga-se de forma covalente um péptido, cuja estrutura corresponde à da região separadora do R-FNT mutacionado de modo a interferir com a sua clivagem, ainda que não interfira com o seu reconhecimento pela protease, à resina de uma coluna de purificação por afinidade. Os extractos detergentes de membranas isoladas a partir de células que exprimem a protease capaz de clivar o R-p55-FNT são obrigados a passar através da coluna e o material que não fica ligado é lavado. Depois efectua-se a eluição da protease, quer aumentando a concentração salina quer diminuindo o valor do pH, e a seguir purifica-se ainda mais.

#### **Exemplo 5: anticorpos para a protease**

São utilizados fêmeas de murganho da estirpe Balb/c (com 8 semanas de idade) que são injectadas com 1 µg de protease obtida no exemplo 4, numa emulsão de adjuvante completo de Freund, nas almofadas das patas traseiras, e decorridas cerca de 3 semanas os animais são injectados subcutaneamente no dorso, tendo sido utilizado então adjuvante incompleto de Freund. As outras injeções são administradas a intervalos semanais por via subcutânea, sendo o veículo STP. São administrados reforços estimuladores 4 dias (i.p.) e 3 dias (i.v.) antes da fusão em STP. A fusão é realizada utilizando células NSO/Mr e linfócitos preparados a partir do baço e

utilizando também linfócitos locais das patas traseiras, como parceiros de fusão. Os hibridomas são seleccionados em MEMD enriquecido com HAT, 15% de soro de cavalo e gentamicina na concentração de 2 µg/mL. Os hibridomas para os quais se conclua que produzem anticorpos contra a protease são subclonados pelo método da diluição limitada e são injectados nas fêmeas de murganho Balb/c que foram estimuladas com pristano para a produção de líquido ascítico. As imunoglobulinas são isoladas a partir do líquido ascítico pelo método da precipitação em sulfato de amónio (saturação a 50%) e depois são dialisadas em presença de STP contendo 0,02% de azida. Estima-se a pureza por análise segundo um protocolo de EGPA-DSS e por contrastação com o corante azul de Coomassie. Os isotipos dos anticorpos são definidos com o recurso à utilização de um estojo de EISLE disponível nos circuitos comerciais (Amersham, U.K.).

#### **Exemplo 6: purificação por afinidade**

Os anticorpos contra a protease podem ser utilizados para a purificação da protease por cromatografia por afinidade, de acordo com o procedimento a seguir descrito. São seleccionados anticorpos monoclonais para cromatografia por afinidade, testando a sua capacidade de ligação ao antigénio marcado com radioisótopos num radioimunoensaio em fase sólida. O líquido ascítico de todos os hibridomas é purificado por precipitação com sulfato de amónio para um valor de 50% da saturação, a que se segue uma diálise exaustiva em presença de STP. São utilizadas placas de 96 cavidades feitas de PCV (em inglês PVC), recobertas com os AcM purificados e depois de se ter bloqueado as placas com STP contendo 0,5% de ASB, 0,05% de 'Tween 20' (Sigma) e 0,02% de NaN<sub>3</sub>, deixa-se ficar as cavidades a incubar com <sup>125</sup>I-FNT a 50 000 cpm durante 2 horas a 37°C, efectuando-se depois a sua lavagem e a quantificação da radioactividade que se liga a cada cavidade, utilizando para tal um contador de raios γ. Efectua-se

um exame dos anticorpos com a mais elevada capacidade de ligação para se pesquisar o seu potencial na cromatografia por imunoafinidade.

Utiliza-se como resina gelose de hidrazida poliacrílica para a imobilização dos anticorpos. As imunoglobulinas semipurificadas são concentradas e acopladas conforme especificado por Wilchek e Miron ('Methods in Enzymology', Vol. 34, págs. 72-76 (1979)). São construídas colunas de anticorpos com um volume de leito igual a 1 mL. Antes da utilização, todas as colunas são sujeitas a 10 lavagens com tampão de eluição, seguindo-se a cada lavagem uma neutralização com STP. Carrega-se as colunas com a protease obtida no exemplo 4 em STP com 0,02% de  $\text{NaN}_3$ . Ajusta-se o caudal de escoamento das colunas para um valor entre 0,2 mL e 0,3 mL por minuto. Depois de carregadas as colunas são lavadas com 50 mL de STP e a seguir efectua-se a sua eluição com uma solução contendo ácido cítrico 50 mM a pH 2,5, NaCl 100 mM e 0,02% de  $\text{NaN}_3$ . Recolhe-se fracções de 1 mL. São tomadas amostras da protease aplicada, da última porção do fluido de lavagem (1 mL) e de cada fracção do fluido de eluição (8 fracções de 1 mL por coluna) e depois são testadas para se determinar a concentração das proteínas. Todas as medições de proteínas são efectuadas de acordo com um método de microfluorescamina por comparação com uma solução padrão que contém ASB na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  (Stein, S. E Moschera, J., Methods Enzymol., Vol. 79, págs. 7-16 (1981)).

#### **Exemplo 7: purificação cromatográfica da protease**


Neste exemplo são utilizadas preparações impuras da protease obtida por extracção das membranas das células com um meio detergente, células essas que exprimem a protease, ou então são utilizadas preparações parcialmente purificadas da protease formada no exemplo 4, as quais são submetidas a um conjunto de passos cromatográficos de fraccionamento, v.g.,

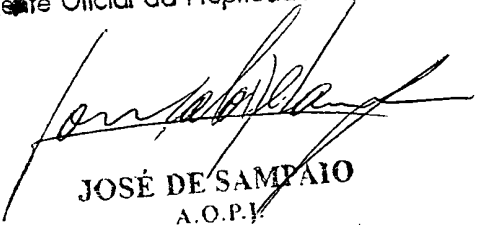
com base na carga eléctrica, tamanho, ponto isoeléctrico e hidrofobicidade das proteínas fraccionadas. Ao longo dos passos de fraccionamento foi sendo acompanhada a actividade da protease, mediante a determinação da capacidade que a fracção testada tem para provocar a clivagem do R-p55-FNT ou de um péptido dele derivado, e pelos requisitos das sequências que devem ser iguais aos observados para a clivagem do receptor nas células.

### **Exemplo 8: clonagem da protease**

As células que exibem actividade de protease (designadamente as que exibem uma clivagem induzível dos seus R-p55-FNT) são mutacionadas por mutagénios químicos. Os mutantes de células deficientes em actividade de protease são isolados por contrastação com um SCAF (em inglês FACS) para o R-p55-FNT após a indução da clivagem. Examina-se a sequência dos nucleótidos no gene R-p55-FNT, no interior das células mutacionadas, para se confirmar que a inaptidão para a clivagem é realmente devida a uma aberração do mecanismo de clivagem e não a uma mutação na região separadora no receptor. As células mutantes são depois transfectadas quer com o ADN genómico quer com um banco de ADNc proveniente das células que exprimem a protease. Os clones das células que readquiriram a capacidade para efectuar a clivagem, devido à transfecção, são isolados por análise por meio de um SCAF, conforme descrito antes, e isola-se o gene transfectado que tenha complementado os seus defeitos. Em alguns destes mutantes, antevê-se que o gene transfectado ou o ADNc que tenha complementado o defeito seja o gene para a protease.

Lisboa, 24 de Setembro de 2001

 O Agente Oficial da Propriedade Industrial

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

258

## Reivindicações

1. Inibidor de uma protease capaz de clivar o R-p55-FNT solúvel a partir do R-FNT ligado às células, constituído por uma sequência que compreende os resíduos aminoácidos indicados na figura 5, dos arquétipos seguintes:

- a)  $\Delta$  172-173
- b)  $\Delta$  173-174
- c)  $\Delta$  174-175
- d)  $\Delta$  173
- e) V 173 P
- f) K 174 P
- g) G 175 P
- h) V 173 D
- i) V 173 G.

2. Inibidor de acordo com a reivindicação 1, constituído pelos resíduos aminoácidos indicados na figura 5, dos arquétipos seguintes:

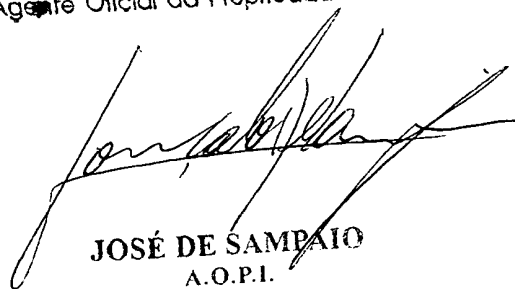
- a)  $\Delta$  172-173
- b)  $\Delta$  173-174
- c)  $\Delta$  174-175
- d)  $\Delta$  173
- e) V 173 P
- f) K 174 P

- g) G 175 P
- h) V 173 D
- i) V 173 G.

3. Inibidor de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, o qual compreende as muteínas dos arquétipos desde (e) até (i).
4. Inibidor de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3, utilizável na manutenção de efeitos benéficos prolongados do FNT em mamíferos, quando utilizado em conjunto com FNT administrado exogenamente.

Lisboa, 24 de Setembro de 2001

 O Agente Oficial da Propriedade Industrial



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

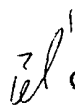
## Resumo

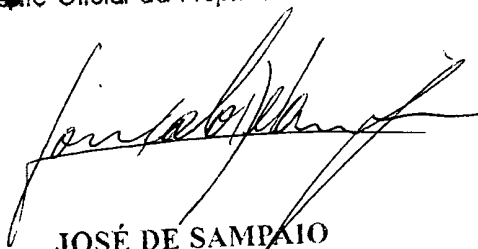
### **“Inibidores de uma protease que é capaz de clivar o receptor solúvel p55 de FNT separando-o do receptor de FNT ligado às células”**

A invenção diz respeito a moléculas que influenciam a clivagem do receptor p55 do factor de necrose tumoral ligado às células (R-p55-FNT), conjuntamente com métodos para a sua produção.

Mais particularmente, a invenção diz respeito a proteases que clivam o R-p55-FNT ligado às células, criando assim o receptor solúvel, e diz respeito aos inibidores para essas proteases que compreendem a sequência asn-172 até thr-182 do R-p55-FNT ou as suas muteínas.

Lisboa, 24 de Setembro de 2001

 O Agente Oficial da Propriedade Industrial

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



258

	R-p55-FNT hu	R-EGT mu	Clivagem induzida pelo AMF	
C3	KLCLP	SF EVWPSGPKIPS	(IAT)	-
C4	KLCLP		(FAT)	-
C5	KLCLPQIENVKGTEDSGT	SF EVWPSGPKIPS	(IAT)	+
C6	KLCLPQIENVKGTEDSGT		(FAT)	+
C9	CHLCHANCTYGCAGPGLQ	GC EVWPSGPKIPS	(IAT)	-
R-p55-FNT hu	KLCLPQIENVKGTEDSGT		(TVIL)	+

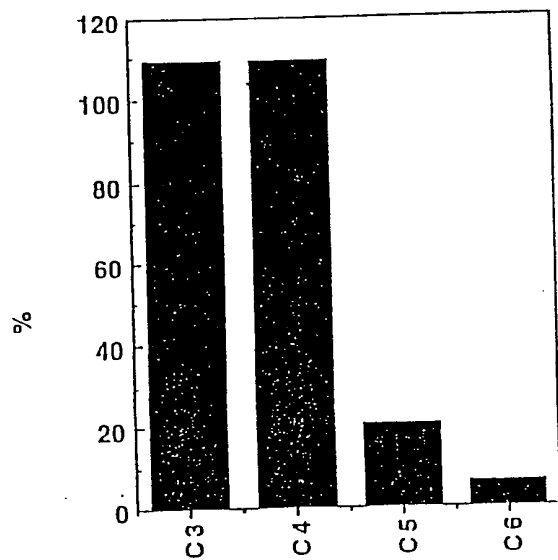
↑ ↑  
 Terminais C na  
 forma solúvel

Região  
 transmembranar

Figura 2

258

3/9



% de AS da quimera



Figura 3

258

4/9

sol/sc de quimera A9

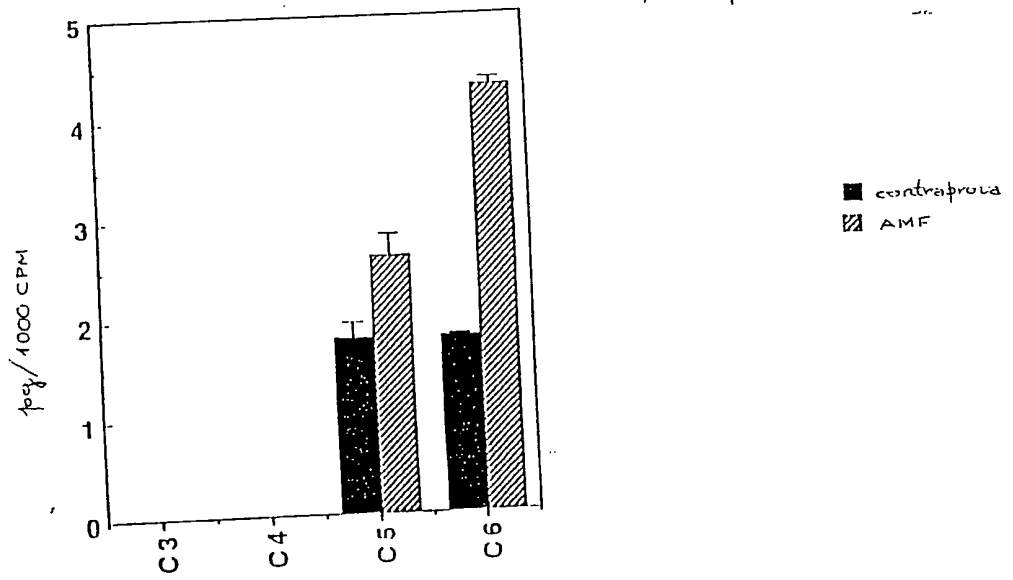


Figura 4

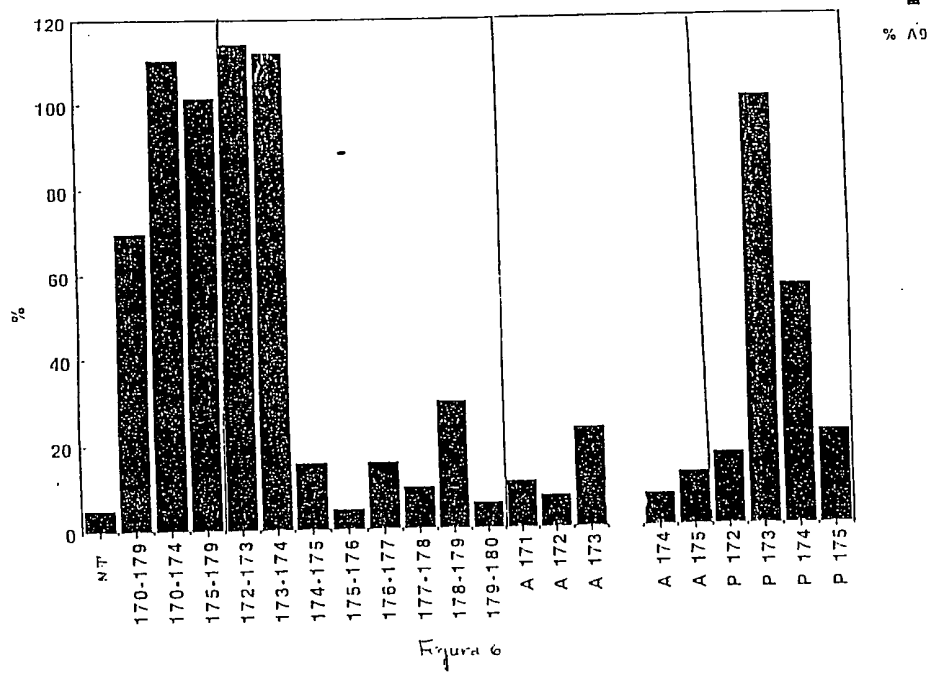
258

I	Z	N	V	K	G	F	E	D	S	G	T	T	(V)	Tipo natural (TN)
													(V)	Δ 170-179
					G	F	E	D	S	G	T	T	(V)	Δ 170-174
I	E	N	V	K									(V)	Δ 175-179
I			V	K	G	F	E	D	S	G	T	T	(V)	Δ 171-172
I	E			K	G	F	E	D	S	G	T	T	(V)	Δ 172-173
I	E	N			G	F	E	D	S	G	T	T	(V)	Δ 173-174
I	E	N	V			F	E	D	S	G	T	T	(V)	Δ 174-175
I	E	N	V	K			N	D	S	G	T	T	(V)	Δ 175-176
I	E	N	V	K	G			D	S	G	T	T	(V)	Δ 176-177
I	E	N	V	K	G	F			S	G	T	T	(V)	Δ 177-178
I	E	N	V	K	G	F	E			G	T	T	(V)	Δ 178-179
I	E	N	V	K	G	F	E	D			F	T	(V)	Δ 179-180
I	E	N		K	G	F	E	D	S	G	F	T	(V)	Δ 173
I	(A)	N	V	K	G	F	E	D	S	G	T	T	(V)	E 171 A
I	E	(A)	V	K	G	F	E	D	S	G	T	T	(V)	N 172 A
I	E	N	(A)	K	G	F	E	D	S	G	T	T	(V)	V 173 A
I	E	(A)	(A)	K	G	F	E	D	S	G	T	T	(V)	NV 172-173 AA
I	E	N	V	(A)	G	F	E	D	S	G	T	T	(V)	K 174 A
I	E	N	V	K	(A)	F	E	D	S	G	T	T	(V)	G 175 A
I	E	(B)	V	K	G	F	E	D	S	G	F	F	(V)	N 172 P
I	E	N	(B)	K	G	F	E	D	S	G	F	T	(V)	V 173 P
I	E	N	V	(B)	G	F	E	D	S	G	T	T	(V)	K 174 P
I	E	N	V	K	(B)	F	E	D	S	G	T	T	(V)	G 175 P
I	E	N	V	K	P	(B)	E	D	S	G	T	T	(V)	T 176 P
I	E	N	V	K	P	T	(B)	D	S	G	F	T	(V)	E 177 P
I	E	(C)	V	K	G	F	E	D	S	G	T	T	(V)	N 172 Z
I	E	(D)	V	K	G	F	E	D	S	G	F	T	(V)	N 172 D
I	E	(E)	V	K	G	F	E	D	S	G	T	T	(V)	N 172 H
I	E	(I)	V	K	G	F	E	D	S	G	T	T	(V)	N 172 I
I	E	N	(D)	K	G	F	E	D	S	G	F	T	(V)	V 173 D
I	E	N	(G)	K	G	F	E	D	S	G	T	T	(V)	V 173 G
I	E	N	(R)	K	G	F	E	D	S	G	F	T	(V)	V 173 R
I	E	N	V	(Z)	G	F	E	D	S	G	T	T	(V)	K 174 Z
I	E	N	V	(O)	G	F	E	D	S	G	F	T	(V)	K 174 Q
I	E	N	V	(T)	G	F	E	D	S	G	T	T	(V)	K 174 T

Figura 5

258

6/9



258

7/9

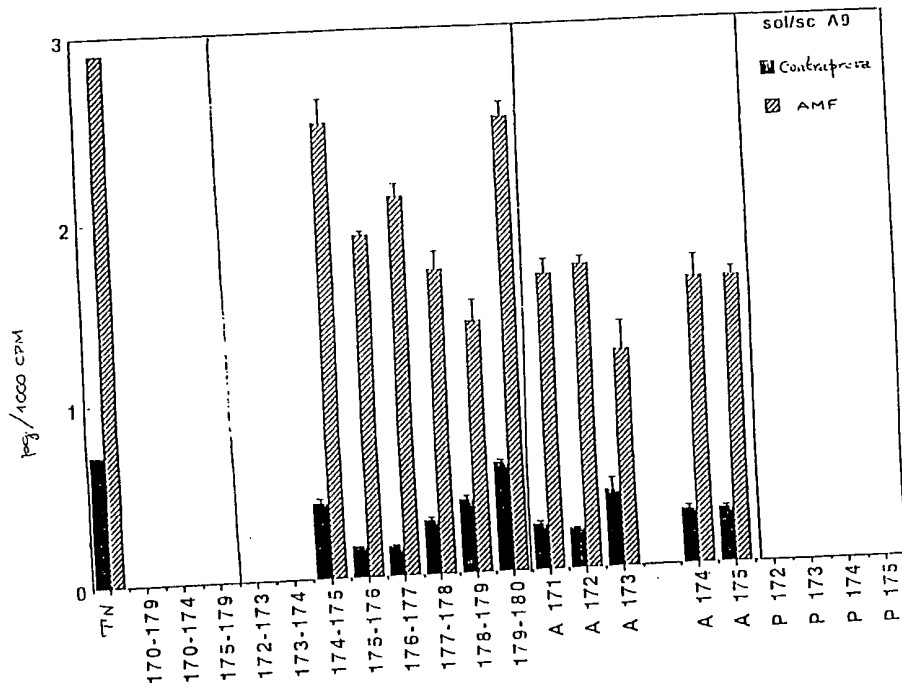


Figura 7

258

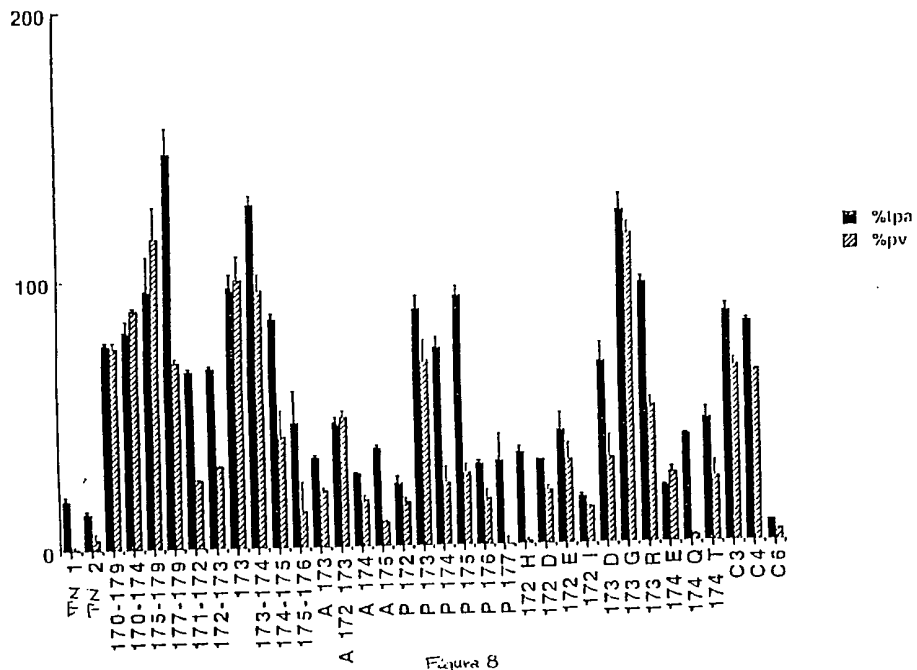


Figura 8

258

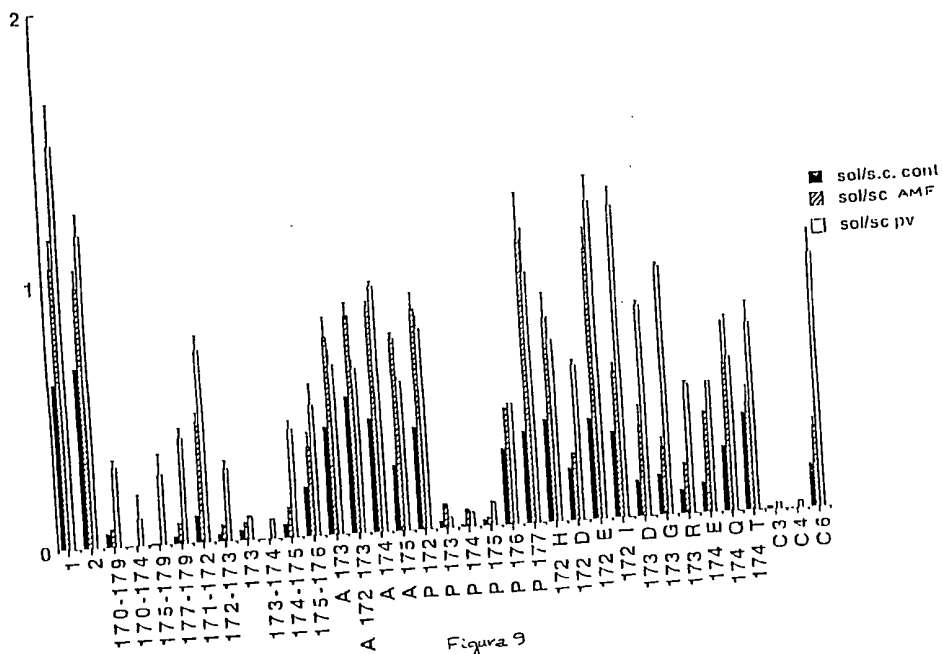


Figura 9