



(11) *Número de Publicação:* PT 725794 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C07K014/52 A C12N015/19 B
A61K038/19 B

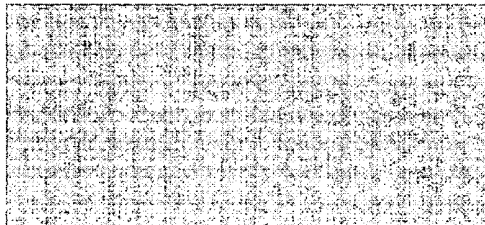
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1994.11.07	(73) <i>Titular(es):</i> DANA FARBER CANCER INSTITUTE 44, BINNEY STR. BOSTON, MASSACHUSETTS 02115 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1993.11.12 US 152301	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1996.08.14	(72) <i>Inventor(es):</i> BARRETT ROLLINS YU JUN ZHANG US US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.08.22	(74) <i>Mandatário(s):</i> MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO 50, 5º AND. 1269-163 LISBOA PT

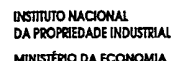
(54) *Epígrafe:* DERIVADOS DE PROTEÍNAS-1 QUIMIOATRACTIVAS DE MONÓCITOS (MCP-1)

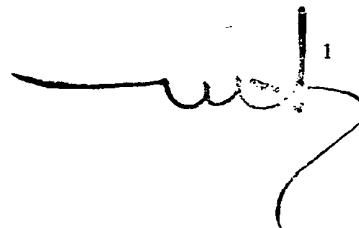
(57) *Resumo:*

DERIVADOS DE PROTEÍNAS-1 QUIMIOATRACTIVAS DE MONÓCITOS (MCP-1)



E-mail: inpi@mail.telepac.pt





DESCRIÇÃO

"DERIVADOS DE PROTEÍNAS-1 QUIMIOATRACTIVAS DE MONÓCITOS (MCP-1)"

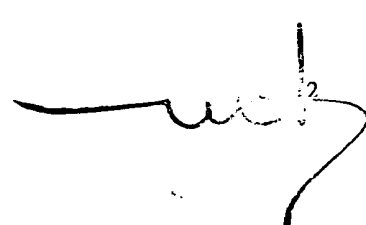
FUNDAMENTOS

As quimioquinas são citocinas pró-inflamatórias que são quimioatrativas e ativadoras de tipos específicos de leucócitos. Os membros desta família partilham motivos estruturais comuns, em particular as posições de quatro cisteínas, bem como outras zonas bem conservadas da estrutura primária. Apesar das suas similaridades, a maioria das quimioquinas têm especificidades de células alvo que não se sobrepõem. As quimioquinas podem ser agrupadas em duas sub-famílias, proteínas quimioquinas- α e proteínas quimioquinas- β , com base em critérios estruturais e genéticos.

A proteína-1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) é um membro da família quimioquinas- β das citocinas pró-inflamatórias. A sequência amino da MCP-1 humana é revelada em Rollins, *Molecular and Cell Biology*, Vol. 9, No. 11, pp. 4687-4695, Nov. 1989. A MCP-1 atrai e activa monócitos, até à exclusão de neutrófilos, a concentrações subnanomolares. A MCP-1 está estruturalmente e geneticamente relacionada com a interleucina-8 (IL-8), um quimioatractivo específico de neutrófilos, o qual é membro da família quimioquina- α .

Os monócitos são atraídos para as artérias coronárias danificadas, tais como o dano causado por angioplastia de artéria coronária, e estão envolvidos na causa de restenose.

Mutantes da MCP-1 são descritas no *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 267, No. 5, Fevereiro 15, 1992 nas páginas 3455 a 3459. Os mutantes descritos diminuíram a actividade monócita quimiotáctica, e são inertes ou menos activos que a MCP-1 endógena no ensaio de quimiotaxia de monócitos. Em contraste, a presente invenção



fornece mutante inibidor MCP-1, o qual pode inibir a MCP-1 endógena selvagem na atracção de monócitos.

RESUMO DA INVENÇÃO

A invenção relaciona-se com derivados de MCP-1 que sofreram mutação tal que os ditos derivados inibem a actividade quimioattractiva de monócitos da MCP-1 endógena, preferivelmente a MCP-1 humana, e suas composições farmacêuticas. Numa concretização preferida, o derivado da MCP-1 foi modificado na 28-tirosina, na 24-arginina, no 3-aspartato e/ou em amino-ácidos entre cerca de 2 e cerca de 8. Numa concretização, a mutação não é na 28-tirosina. Preferivelmente, o derivado de MCP-1 não é substituído no 28-tirosina por leucina e/ou substituída na 30-arginina por valina. A inibição bem sucedida da actividade é encontrada onde a MCP-1 é modificada de uma ou mais das seguintes formas: a) a 28-tirosina é substituída por aspartato, b) a 24-arginina é substituída por fenilalanina, c) o 3-aspartato é substituído por alanina, e/ou d) a sequência de amino-ácidos 2-8 é removida.

Os derivados de MCP-1 reivindicados podem ser administrados a um paciente com necessidade de inibir a actividade quimioattractiva de monócitos da MCP-1. Os derivados podem ser usados com vantagem para prevenir a restenose, tal como é típico em muitos pacientes que sofrem angioplastia de artéria coronária.

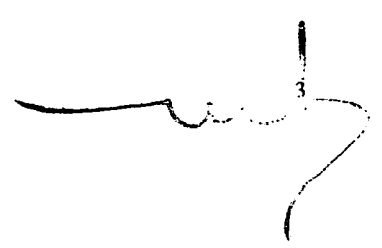
As características acima e outras características da invenção serão agora descritas mais particularmente e sublinhadas nas reivindicações. Será entendido que os derivados particulares concretizados na invenção são mostrados como meio de ilustração.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma curva de resposta de MCP-1 do tipo selvagem e proteínas MCP-1 marcadas com epitopo FLAG.

A Figura 2 é um gráfico das mutações preparadas e da actividade quimiotáctica específica dos mutantes.

A Figura 3 é uma curva de resposta de dosagem para a inibição de MCP-1 para quatro das concretizações reivindicadas.



DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção baseia-se na descoberta de que regiões da MCP-1 podem sofrer mutação para inibir a actividade endógena quimioattractiva de monócitos. Foram desenvolvidos mutantes de MCP-1 que possuíam a actividade inibidora desejada. A inibição bem sucedida da actividade é encontrada, por exemplo, onde a MCP-1 humana é modificada em um ou mais dos seguintes casos: a) a 28-tirosina é substituída por aspartato, b) a 24-arginina é substituída por fenilalanina, c) o 3-aspartato é substituído por alanina, e/ou d) a sequência de amino-ácidos 2-8 é removida. Os mutantes específicos onde apenas uma modificação das estabelecidas acima foi realizada foram designados por Y28D, R24F, D3A, e 7ND, respectivamente.

Outras mutações da MCP-1 humana que não as mutações pontuais dadas acima também são encaradas nesta invenção. É ainda possível desenvolver mutantes de MCP-1 derivados de outros mamíferos possuindo uma proteína quimioattractiva de monócitos a qual inibirá a MCP-1 endógena. O emprego das técnicas aqui descritas para o desenvolvimento de proteínas mutantes e separação dos mutantes desenvolvidos permite identificar e isolar outras proteínas mutantes equivalentes.

O termo “derivado”, tal como é empregue aqui, é definido como contendo a proteína total, qualquer sua porção activa ou qualquer produto de adição da proteína mãe.

Os derivados da invenção reivindicada podem ser feitos de acordo com métodos conhecidos na arte, incluindo a reacção em cadeia de polimerase. A reacção em cadeia da polimerase pode ser usada para criar mutações pontuais no cADN para a MCP-1 humana. R. Higuchi, “Recombinant PCR”, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, editores Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; e White, T. J.; Academic Press, NY 1990. Os cADN podem ser transfectados transientemente num sistema apropriado de expressão para produzir proteínas mutantes. Os sistemas de expressão apropriados que podem ser usados incluem procariotas e eucariotas. Para evitar problemas de indução de próprio cruzamento de proteínas bacteriologicamente induzidas, a proteína é preferivelmente expressa em células COS.

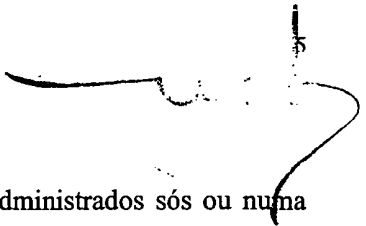
Como exemplo, a construção de MCP-1 marcada com epitopo e a mutação de MCP-1 pode ser preparada empregando a reacção em cadeia da polimerase. Qualquer fonte adequada do cADN para a MCP-1 em qualquer vector de clonagem pode ser empregue como modelo. Um vector de clonagem preferido que pode ser empregue é pGEM-hJE34 (MCP-1 humana cADN em pGEM-7 (Promega, Wisconsin)). Numa concretização, PCR recombinante foi usado para inserir 30 nucleótidos imediatamente 5' em relação ao codão de terminação (posição 366) codificando o epitopo FLAG (Prickett, Biotechniques, 7, pp 580-589, (1989)) com um espaçador de duas glicinas, O cADN assim obtido foram clonados num vector de expressão adequado, pmt21 (Genetics Institute), para dar um plasmídeo designado por pFX2.

Técnicas semelhantes foram usadas para inserir o epitopo FLAG e espaçador 3' imediatamente em relação ao codão para o 3-aspartato em MCP-1 processada (posição de nucleótido 146); este plasmídeo de expressão foi designado por pFX3. Com pFX2 como modelo, foi usado PCR recombinante para inserir codões de terminação ou modificações de amino-ácidos únicos, como desejado.

O cADN assim obtido foi clonado num vector de expressão adequado, tal como pmt21 (Genetics Institute), para dar um plasmídeo adequado.

A expressão de MCP-1 e dos seus derivados podem ser realizados por técnicas conhecidas. Uma larga variedade de veículos de expressão pode ser usada. Um veículo de expressão preferido é a linha de célula COS. A expressão da proteína pode ser determinada e quantificada por métodos de rotina da arte, tais como densiometria de laser e mancha de imunidade.

Como estabelecido acima, a MCP-1 atrai e activa monócitos. Os monócitos são atraídos para artérias coronárias danificadas, tais como o dano causado por angioplastia na artérias coronária, e estão envolvidos na causa de restenose. A administração de inibidores ao recrutamento de monócitos seria útil na prevenção de restenose, artrite reumatóide, inflamação pulmonar crónica e outras condições ligadas com o recrutamento de monócitos.



Os derivados da invenção reivindicada podem ser administrados sós ou numa composição farmacêutica adequada. Os modos de administração são aqueles conhecidos na arte, tal como a aplicação por via parentérica.

Veículos farmacêuticos adequados incluem, mas não estão limitados a água, soluções de sais, álcoois, polietileno glicóis, gelatina, hidratos de carbono tais como lactose, amilose ou amido, estearato de magnésio, talco, ácido salicílico, parafina viscosa, ésteres de ácidos gordos, hidroximetilcelulose, polivinil pirrolidina, etc. As preparações farmacêuticas podem ser esterilizadas e se desejado, misturadas com agentes auxiliares, p. ex., lubrificantes, conservantes, estabilizadores, agentes molhantes, emulsionantes, sais para influenciar a pressão osmótica, tampões, corantes, e/ou substâncias aromáticas e semelhantes que não reajam negativamente com o composto activo. Também podem ser combinados onde desejado com outros ingredientes activos, p. ex., inibidores de enzimas, para reduzir a degradação metabólica.

Para aplicação por via parentérica, são particularmente adequadas soluções estéreis injectáveis, preferivelmente soluções aquosas ou oleosas, bem como suspensões, emulsões, ou implantes, incluindo supositórios. As ampolas são dosagens unitárias convenientes.

Será notado que as quantidades reais de derivado de MCP-1 num caso específico variarão de acordo com o composto específico a ser utilizado, com a composição particular formulada, com o modo de administração e a idade, com o peso e com a condição do paciente, por exemplo. As doses para um paciente particular podem ser determinadas por alguém com a proficiência normal na arte de utilizar considerações convencionais (p. ex. por meio de um protocolo farmacêutico convencional apropriado).

A invenção é ainda ilustrada especificamente pelos exemplos seguintes.



EXEMPLIFICAÇÃO

Construção e expressão de MCP-1 marcada com epitopo e de MCP-1 de tipo selvagem:

Começando com pGEM-hJE34 (MCP-1 humana cADN em pGEM-7 (Promega, Wisconsin)) como modelo, foi usado PCR recombinante para inserir 30 nucleótidos imediatamente 5' Em relação ao codão de terminação (posição 366) codificando o epitopo FLAG (Prickett, (1989)) com um espaçador de duas glicinas. A análise da sequência de cADN resultante não revelou outras alterações de base, e o cADN inteiro foi clonado num vector de expressão pmt21 (Genetics Institute) para dar um plasmídeo designado por pFX2.

Células COS foram suspensas em meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) livre de soro a 5×10^6 células /ml. Quatro $\times 10^6$ células (0,8 ml) foram colocadas numa cuvette de electroporação com um intervalo de 0,4 cm, foram adicionados 10 μ g de cADN de plasmídeos, e as células foram electroporadas a 0,28 kV, 960 μ F (dando uma constante de tempo de 10 – 13 mseg). As células foram deixadas recuperar na *cuvette* à temperatura ambiente por 10 minutos, e depois dispostas em duas placas de 100 mm em DMEM com 10% de soro de feto de bovino. Após 24 horas, o meio foi mudado para DMEM livre de soro. Após mais 24 horas adicionais, o meio condicionado foi recolhido, as células e os detritos foram removidas por centrifugação, e o meio foi armazenado a -70°C .

MCP-1 do tipo selvagem também foi produzida por transfecção de células COS, tal como descrito acima.

CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO DE MUTAÇÕES DE MCP-1

Técnicas semelhantes às descritas por Higuchi, acima, foram usadas para inserir o epitopo FLAG e o espaçador imediatamente 3' em relação ao codão para o aspartato-3 em MCP-1 processada (posição do nucleótido 146); este plasmídeo de expressão foi designado por pFX3. Com base em considerações de modelização bem como em dados de estrutura/actividade de outras quimioquinas (em particular IL-8), foram construídas mutações em MCP-1 em três regiões: nomeadamente o terminal-N, a primeira ponte inter-cisteínas, e a hélice- α terminal-C prevista (Figuras 2 e 4). Com pFX2 como

7
modelo, foi usado PCR recombinante para inserir codões de terminação ou modificações de amino-ácidos únicos. Todas as mutações foram confirmadas por análise de sequência de ambas as cadeias de ADN.

Manchas de imunidade:

Meio condicionado de células COS transfectado foi fervido numa amostra de tampão e sujeito a electroforese através de um gel de poliacrilamida a 15% em SDS. Em alguns casos, o meio foi primeiro concentrado usando um dispositivo Centricon-10 (Amicon, Danvers, MA).

Proteínas foram transferidas electroforéticamente para nitrocelulose e colhidas quer com um anticorpo monoclonal anti-FLAG M1 (International Biotechnologies, Inc., New Haven, CT) ou com antisoro anti-MCP-1 de coelho.

Foram desenvolvidos manchas usando a solução de substrato e anticorpo secundário conjugado de peroxidase horseradish apropriada (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Quantificação de MCP-1 e dos derivados:

A MCP-1 foi expressa como uma proteína de fusão FLAG em E. Coli usando o FLAG Biosystem e foi purificada usando uma coluna de afinidade anti-FLAG (International Biotechnologies, Inc., New Haven, CT). Quantidades conhecidas de proteína de fusão FLAG-MCP-1 pura foram incluídas em todas as manchas de imunidade para MCP-1 produzida por células COS. As manchas de imunidade foram então analisados por densitometria laser (Pharmacia, Piscataway, NJ) e a massa de cada proteína produzida por célula COS foi determinada por referência ao padrão de fusão FLAG-MCP-1. A quantidade de sobrenadante de células COS carregado em cada poço gerou um sinal de mancha de imunidade dentro da gama de resposta linear do densitometro laser. Quando possível, as amostras foram quantificadas usando tanto anticorpos anti-FLAG como anticorpos anti-MCP-1. Não houve disparidades entre as quantidades de proteínas determinadas com os dois anticorpos excepto quando um dos epitopos estava ausente.

Ensaio de quimiotaxia de monócito

Células mononucleares de sangue periférico humano foram preparadas de voluntários como descrito (Rollins, Blood, 78, pp 1112-1116 (1989)). Os ensaios de quimiotaxia foram realizados usando uma câmara de multipoços ajustada com um filtro de policarbonato tendo poros de 5 μ como descrito. Cada sobrenadante de célula COS foi testado sobre uma larga gama de diluições, e a concentração de actividade quimioatractiva de monócitos (MCA) em cada sobrenadante foi definida como o inverso de diluição que dava metade da resposta máxima quimiotáctica. A MCP-1 do tipo selvagem e FX2 tiveram características de respostas a doses semelhantes, Figura 1. Usando os resultados de quantificação de manchas de imunidade, a análise das curvas de resposta de dose mostrou que a actividade específica de FX2 é 408 000 U/ml enquanto que a da MCP-1 do tipo selvagem é 442 000 U/ml. Ambos os valores se compararam favoravelmente com a actividade específica determinada para MCP-1 recombinante, produzido eucarioticamente, purificado, sugerindo que o epitopo de marcação não interfere com a capacidade da MCP-1 de atrair monócitos *in vivo*.

Cada uma das mutações construídas, ilustrada na Fig. 2, foi testada para a actividade monócita quimiotáctica da mesma forma. Como foi dito acima, as mutações foram construídas em três regiões, o terminal-N, a primeira ponte de cisteína, e o terminal -C. No terminal-N a inserção do epitopo FLAG imediatamente após a glutamina N-terminal destruiu a actividade quimioatractiva de monócitos da proteína (FX3). Consistente com essa descoberta foi o facto de a remoção de amino-ácidos 2-8 também resultou numa proteína inactiva. Numa tentativa de conseguir mapeamento mais fino, os dois amino-ácidos carregados foram mudados nesta região (3-aspartato e 6-asparagina) para alanina. A mudança de 3-aspartato reduziu significativamente a actividade da proteína, enquanto que a mudança de 6-asparagina resultou numa proteína que reteve 52,9% da actividade da MCP-1 do tipo selvagem.

Seguidamente, foram construídas quatro mutações pontuais na primeira ponte de inter-cisteína. Mutações de 24-arginina para fenilalanina, de 28-tirosina para aspartato e de 30-arginina para leucina todas produziram proteínas com actividades que eram apenas uma fracção da actividade da proteína de tipo selvagem. No entanto, a mutação

de outro amino-ácido polar na mesma região, nomeadamente 27-serina, produziu uma proteína com 60% da actividade da proteína do tipo selvagem.

Finalmente, manipulações da hélice- α terminal-C produziu proteínas que eram ainda capazes de sinalizar mas que tinham potência reduzida em comparação com a proteína do tipo selvagem. Remoções de metade (D2) ou de toda (D1) a hélice- α resultou em proteínas com 17% e 11,3% da actividade da proteína do tipo selvagem, respectivamente. Na estrutura do modelo prevista de MCP-1 dimérica, o 68-aspartato projecta para um fenda de ligação de um receptor previsto entre duas hélices- α . A mutação deste amino-ácido para leucina teve o mesmo efeito que a remoção da hélice inteira.

Competição por efeitos biológicos:

Derivados de MCP-1 que sofreram mutação foram testados para a sua capacidade de inibir quimiotaxia de monócitos *in vitro* em resposta a MCP-1 não-mutada. A uma concentração fixa de FX2, foram adicionadas quantidades crescentes de meio condicionado por células COS expressando proteínas mutantes. Apenas Y28D, R24F, 7ND e D3A demonstraram capacidade para inibir MCP-1 de tipo selvagem. A Figura 3 mostra que Y28D e 7ND foram capazes de inibir quimiotaxia de monócito para FX2 por aproximadamente 50% nas razões mais elevadas testadas. (O limite superior foi ditado pela concentração de proteína de mutação em meio condicionado). Y28D foi ligeiramente mais eficaz do que 7ND numa base molar com um ID50 correspondendo a ~ 300 ng/ml na presença de 10 ng/ml de MCP-1 de tipo selvagem. R24F reduziu o efeito quimioatractivo da MCP-1 para 69% do controlo numa razão molar de 1:1. Apesar de o próprio R24F ter actividade quimioatractiva de monócitos de apenas 5% da do tipo selvagem, a adição de mais R24F para além de uma razão molar de 1:1 com o tipo selvagem levou a um aumento da actividade quimioatractiva. D3A reduziu a actividade MCP-1 para 80% do controlo a uma razão molar de 10:1, mas visto que também tem actividade quimioatractiva, razões molares elevadas mostraram perda de inibição. A actividade inibidora foi específica para a MCP-1, visto que as mutações

não inibiram a quimiotaxia de monócito em resposta a formil-methionil-leucil-fenilalanina (FMLP).

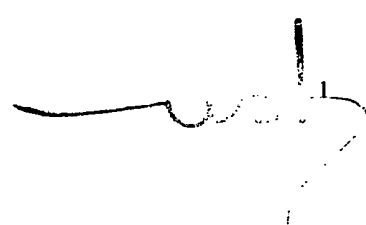
Lisboa,

22 NOV. 2001

Maria Silvina Ferreira
ADVOGADA

Agente Oficial de Propriedade Industrial
R. Castilho, 50 - 5º - 1250 - 071 LISBOA
Tel. 21 381 50 50 - Fax. 21 383 11 50





REIVINDICAÇÕES

1. Um derivado de uma Proteína-1 Quimioatrativa de Monócitos (MCP-1) mutante que inibe a actividade quimioatrativa de monócitos de MCP-1 endógena, com a reserva de que o derivado não tenha sido modificado pela substituição de 28-tirosina pela leucina e/ou pela substituição de 30-arginina pela valina.
2. Um derivado de Proteína-1 Quimioatrativa de Monócitos (MCP-1) humana que inibe a actividade quimioatrativa de monócitos de MCP-1 endógena onde a MCP-1 humana tenha sido modificada em uma ou mais das seguintes formas:
 - a) a 28-tirosina é substituída pelo aspartato;
 - b) a 24-arginina é substituída por fenilalanina;
 - c) o 3-aspartato é substituído pela alanina;
 - d) a sequência de amino-ácidos 2-8 é removida; e os seus equivalentes os quais inibem a actividade quimioatrativa de monócitos da MCP-1 endógena.
3. Um derivado de Proteína-1 Quimioatrativa de Monócitos (MCP-1) humana como reivindicado na reivindicação 2 onde:
 - a) a 28-tirosina da MCP-1 humana é substituída pelo aspartato; ou
 - b) a sequência de amino-ácidos 2-8 da MCP-1 humana é removida; ou
 - c) a 24-arginina da MCP-1 humana é substituída por fenilalanina; ou
 - d) o 3- aspartato da MCP-1 humana é substituído pela alanina.
4. O derivado da MCP-1 humana da reivindicação 1, onde:
 - a) a 24-arginina é substituída;
 - b) o 3-aspartato é substituído;
 - c) a sequência de amino-ácidos entre cerca de 2 e 8 tenha sido removida.
5. Uma composição farmacêutica compreendendo o derivado de MCP-1 e qualquer uma das reivindicações precedentes e um veículo farmaceuticamente aceitável.

- 12
6. O uso do derivado de MCP-1 de qualquer das reivindicações 1-4 para o fabrico de um medicamento para o tratamento de pacientes com restenose, artrite reumatóide ou inflamação pulmonar crónica.
 7. O uso do derivado de MCP-1 de qualquer das reivindicações 1-4 para o fabrico de um medicamento para inibir a actividade quimioattractiva de monócitos.
 8. O derivado de MCP-1 de qualquer das reivindicações 1 a 4 para o uso em terapia e profilaxia.

Lisboa,

22 NOV. 2001



Maria Silvina Ferreira
ADVOGADA

Agente Oficial de Propriedade Industrial
R. Castilho, 50 - 5º - 1250 - 071 LISBOA
Tel. 21 381 50 50 - Fax. 21 383 11 50

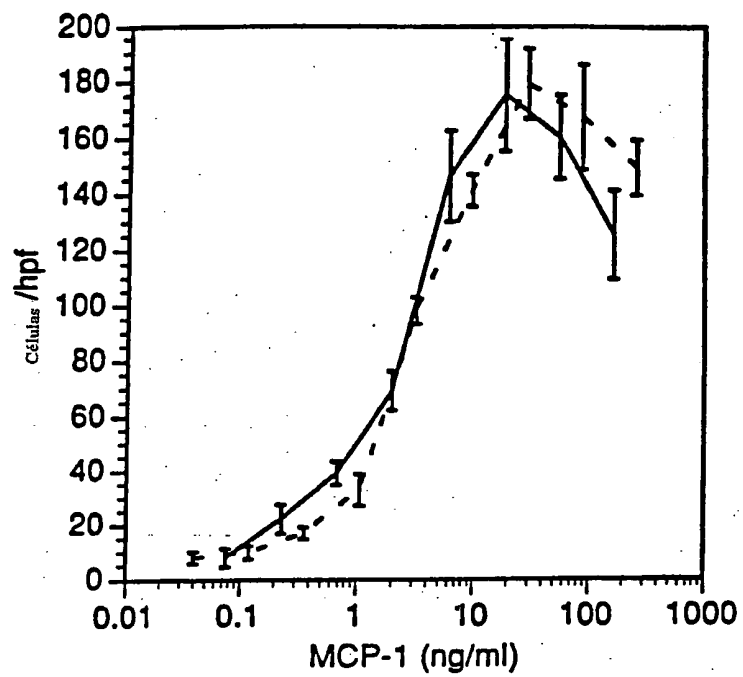


FIGURE 1

		Actividade específica	
		U/mg	%
WT		442,000	100.0
FX2		408,000	92.3
FX3		1100	0.2
7ND		38	0.009
D3A		40,000	9.0
N6A		234,000	52.9
R24F		22,300	5.0
S27Q		255,000	60.0
Y28D		1100	0.2
R30L		19	0.004
D1		50,000	11.3
D2		75,000	17.0
D68L		50,000	11.3

FIGURE 2

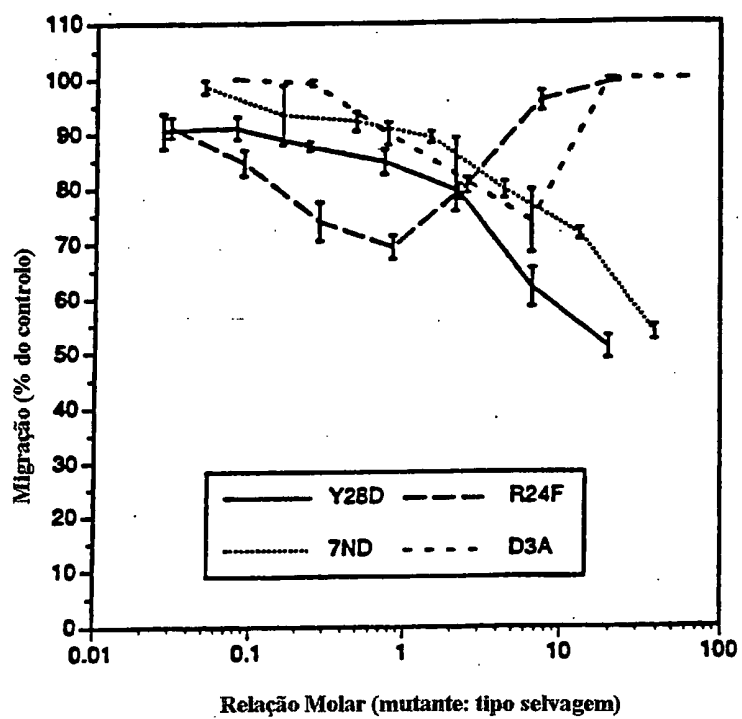


FIGURE 3