

(11) *Número de Publicação:* PT 89362 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C12N015/00 A

C12P021/08 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) *Data de depósito:* 1988.12.29

(30) *Prioridade:* 1987.12.31 DE 3744595

(43) *Data de publicação do pedido:*
1989.12.29

(45) *Data e BPI da concessão:*
02/93 1993.02.01

(73) *Titular(es):*

ANDREAS PLUECKTHUN
VEITH-LUNG-STRASSE 6 D-8033 PLANEGG DE
ARNE SKERRA
CHERUSKERWEG 6 D-6200 WIESBADEN DE

(72) *Inventor(es):*

(74) *Mandatário(s):*
JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA
RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO POR MANIPULAÇÃO GENÉTICA DE ANTICORPOS

(57) *Resumo:*

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 89 362

REQUERENTE: DR. ANDREAS PLÜCKTHUN, alemão, residente em Veith-Lung-Strasse 6, D-8033 Planegg, República Federal Alemã e ARNE SKERRA, alemão, residente em Cheruskerweg 6, D-6200 Wiesbaden, República Federal Alemã

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO POR MANIPULAÇÃO GENÉTICA DE ANTICORPOS"

INVENTORES:

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

República Federal Alemã em 31 de Dezembro de 1987,
sob o No. P 37 44 595.2.



Descrição referente à patente de invenção de Dr. Andreas Plückthun, alemão, químico, residente em Veith-Lung-Strasse 6, D-8033 Planegg, República Federal Alemã e de Arne Skerra, alemão, químico, residente em Cheruskerweg 6, D-6200 Wiesbaden, República Federal Alemã, para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO POR MANIPULAÇÃO GENÉTICA DE ANTICORPOS"

D E S C R I Ç Ã O

A expressão de anticorpos em leveduras foi descrita (C.R. Wood, M.A. Boss, J.H. Kenten, J.E. Calvert, N. A. Roberts e J.S. Emtage, Nature 314, 446 (1985)), mas só uma fracção muito pequena da proteína expressa provou ser funcional. Até agora só foi possível obter em E.coli as proteínas de anticorpos de forma desnaturada ((M.A. Boss, J.H. Kenten, C.R. Wood e J.S. Emtage, Nucleic Acids Res. 12, 3791 (1984); S. Cabilly, A.D. Riggs, H. Pande, J.E. Shively, W.E. Holmes, M. Rey, L.J. Perry, R. Wetzelschaeffer e H.L. Heyneker, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 3273 (1984))). A purificação de anticorpos activos ou de fragmentos de anticorpos a partir de leveduras ou de outros microorganismos ainda não é conhecida. Até agora experiências de enrolamento de proteínas têm conduzido só até uma pequena percentagem a proteínas de anticorpos recombinantes enroladas de forma conveniente.

Além disso, é difícil separar as proteínas funcionais desejadas das proteínas não funcionais indesejadas, o que dificulta a medição exacta das constantes de ligação, dos rendimentos no enrolamento, das características espectrais e de características semelhantes bem como a utilização emprego na terapia e na técnica. A optimização das condições de enrolamento é, por isso, extraordinariamente difícil, tanto mais que não existem quaisquer processo de medição do grau de enrolamento experimentados.

A expressão de anticorpos funcionais completos ou de domínios de ligação funcionais de anticorpos em sistemas de expressão bacterianos não é até agora conhecida e as perspectivas para a sua realização foram encaradas com pessimismo (S.L. Morrison, Science 229, 1202 (1985), M.A. Bos e C.R. Wood, Immunol. Today 6, 12 (1985)).

Um tal sistema seria muito desejável, uma vez que os processos de manipulação genética especialmente para E. coli foram bem trabalhados e são facilitados em virtude do rápido crescimento da produção em massa, o que do ponto de vista económico tem um importante significado.

A presente invenção refere-se por conseguinte à preparação de anticorpos funcionalmente aptos, dos seus fragmentos funcionais ou de proteínas de fusão a partir de domínios de anticorpos e de outras proteínas em bactérias, de preferência em bactérias Gram-negativas, em especial em E. coli. O processo de acordo com a presente invenção caracteriza-se precisamente por se acoplar o gene para a cadeia simples da molécula do anticorpo ou fragmentos a uma sequência de sinal, que acciona o transporte das cadeias de polipeptídeos através da membrana citoplasmática e que pode ser cindida, provocar a expressão da estrutura genética e isolar a proteína funcional a partir do espaço periplasmático ou do meio. As formas de concretização preferidas da presente invenção são em seguida esclarecidos mais em pormenor ou são definidas nas reivindicações.

A acoplagem do gene para as cadeias simples providas com sequências de sinal é levada a efeito com vantagem de acordo com a técnica de um sistema de operação

regulável que efectua a expressão simultânea através de uma região de controle conjunta. Deste modo as cadeias de proteínas foram expressas conjuntamente em proporções estequiométricas aproximadas e transportadas para os espaços periplasmáticos onde se efectua a ligação à molécula funcional. O transporte de proteínas a partir do citoplasma realiza-se por métodos conhecidos em si, tal como são descritos, por exemplo, na EP-B 0 006 694.

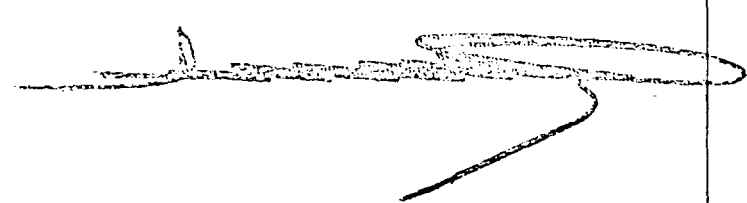
Como região de comando interessa cada região de regulação de gene regulável apropriada, por exemplo lac, tac, trp, ou sequências sintéticas. São especialmente preferidas as regiões de regulação que seguramente se podem interromper.

O isolamento da proteína a partir do espaço periplasmático é realizado com vantagem por produção nas células separadas de um choque osmótico suave e por concentração da fase líquida assim obtida por meio de ultrafiltração ou de precipitação, por exemplo com sais como por exemplo o sulfato de amónio.

Um choque osmótico "suave" provoca a saída do periplasma mantendo-se no entanto intacta a membrana citoplasmática.

O concentrado de proteínas é, após uma diálise, de modo conveniente feito passar através de um adsorvente, vantajosamente sob a forma de uma coluna de afinidade carregada com o antigene ou hapteno correspondente. Através de diluição apropriada, de modo vantajoso com o antigéne ou hapteno, obtêm-se então o anticorpo ou o fragmento de anticorpo funcional.

Nas células eucarióticas foram construídos anticorpos no espaço do retículo endoplasmático - provavelmente sob a acção de isomerase de dissulfureto, de isomerase de prolina-cis-trans e possivelmente de outras enzimas ou proteínas. Foi surpreendente que as células bacterianas também possuam a capacidade de produzir as duas cadeias nas quantidades estequiométricas aproximadamente iguais, de transportar ambas as proteínas precursoras no espaço periplasmático ou no seu


meio envolvente, de cindir correctamente a sequência de sinal, de fazer enrolar correctamente os domínios globulares e solúveis, de construir as ligações de dissulfureto intramoleculares e de associar ambas as cadeias a um heterodímero porque é considerado como inverosímil que a célula da bactéria disponha destas enzimas ou de outras de actuação idêntica. Verificou-se também surpreendentemente que no caso de bactérias Gram-negativas o periplasma bacteriano é a este respeito um equivalente funcional do espaço do retículo endoplasmático eucariótico.

O processo de acordo com a presente invenção possui uma série de vantagens abstraindo da fermentação bacteriana em massa já referida foram construídas proteínas imediatamente funcionais, evitando-se deste modo a cisão de proteínas de fusão com isolamento posterior da proteína desejada ou de fragmentos de proteína, a respectiva oxidação ou a dobragem in-vitro.

Segundo o processo da presente invenção também não se verificaram quaisquer problemas com proteases celulares. Como se sabe, por causa destas proteases celulares, as proteínas são expressas em bactérias normalmente sob a forma de proteínas de fusão, especialmente como corpos de inclusão insolúveis, o que no entanto implica a realização dos referidos passos de pos-processamento. Em oposição a isto a separação e a purificação até à homogeneidade segundo os processos de acordo com a presente invenção são rápidas e simples.

A presente invenção permite assim um acesso fácil aos anticorpos, aos seus fragmentos funcionais e a anticorpos modificados que se diferenciam dos anticorpos nativos através de inserção, de eliminação e/ou de intercâmbio de ácidos aminados. Assim pode-se, por exemplo, eliminar uma cisteína ou substituí-la por outros ácidos aminados, para se suprimir um enrolamento indesejada. Da mesma forma pode-se introduzir um anticorpo murino num anticorpo humano ou realizar outras mutações. Junto das possibilidades de uso farmacológico e técnico existe assim uma utilização na facilitação

da investigação da estrutura dos anticorpos e da sua função e dos princípios de catálise enzimática (V. Raso e B.D. Stollar, Biochemistry 14, 591 (1975); A. Tramontano, K.D. Janda e R.A. Lerner, Scienc 234, 1566 (1986); S.J. Pollack, J.W. Jacobs e P.G. Schultz, Science 234, 1570 (1986); J. Jacobs, P.G. Schultz, R. Sugawara e M. Powell, J. Am. Chem. Soc. 109, 2174 (1987)).

A presente invenção permite ainda o emprego de sistemas de ensaio (análises) imediatos para a célula bacteriana em que foi construído o anticorpo funcional e deste modo uma investigação rápida do anticorpo eventualmente mutado.

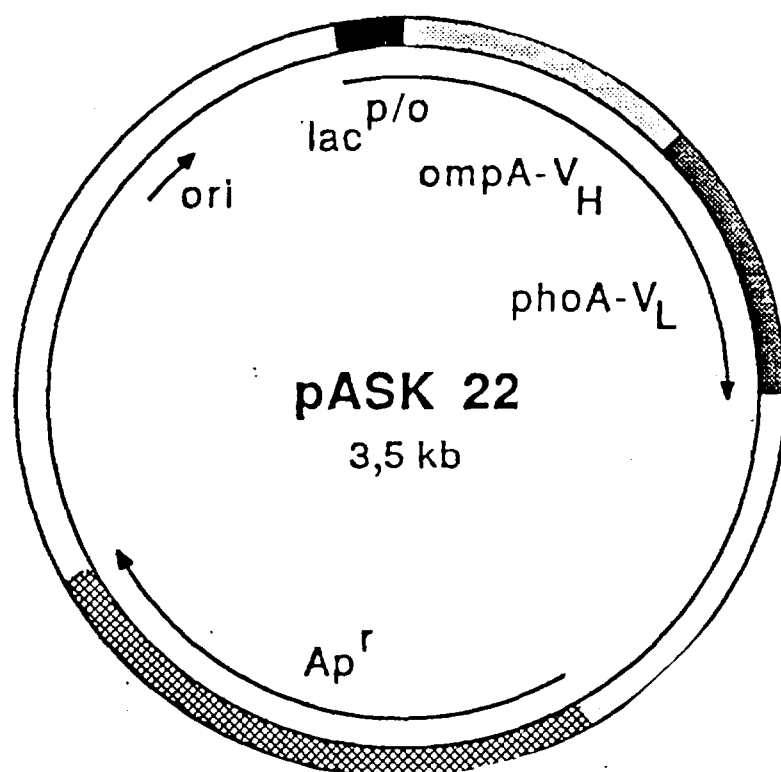
Além das referidas variações das moléculas dos anticorpos através da variação de um único ou de poucos ácidos aminados podem ser inseridas no gene do anticorpo ainda outras regiões genéticas ou podem ser trocadas por regiões genéticas não críticas. Podem-se assim acoplar enzimas de marcação (M.S. Neuberger, G.T. Williams e R.O. Fox, Nature 312, 604 (1984)), Toxinas (G. Moller (ed.) "Antibody carriers of drugs and toxins in tumor therapy", Immunol. Rev. 62, Munksgaard, Copenhaga (1982)) ou regiões de imunoglobulina de uma classe diferente (M.S. Neuberger, G.T. Williams, E.B. Mitchell, S.S. Jouhal, J.G. Flanagan, e T.H. Rabbitts, Nature 314, 268 (1985)) ou uma espécie diferente (P.T. Jones, P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger, e G. Winter, Nature 321, 522 (1986) na molécula de anticorpo.

O processo da presente invenção é esclarecido em seguida por meio de exemplos dos diversos domínios das proteínas de mieloma de anticorpos McPC603 ligadas por fosforilcolina. A estrutura tridimensional desta imunoglobulina A de rato é conhecida (D.M. Segal, E.A. Padlan, G.H. Cohen, S. Rudikoff, M. Potter e D.R. Davies, Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 4298 (1974)). Foram inseridos genes sintéticos para a cadeia V_L leve e para a cadeia V_H pesada variáveis. Estes genes sintéticos são apresentados nas publicações de pedidos das Patentes Alemãs 37 15 033 ou EP-A 0 290 005 e AU-A 15631/88 (nos Quadros 1 e 2). Os Quadros mostram uma forma de realização especialmente oportuna destes genes sintéticos,

na qual se apresenta a sequência de ADN dos plasmídeos de expressão conjuntos, encontrando-se os genes para as duas cadeias sublinhados pela indicação dos ácidos aminados. Na construção destas sequências de ADN foram evitados os codões, que raramente são empregues por E. coli. Para além disso foram construídos locais de corte de enzimas de restrição e teve-se em atenção a estrutura secundária do ADN.

No fragmento de anticorpo funcional que serve como modelo cada domínio tem uma ponte de dissulfureto intramolecular (de Cys 23 a Cys 94 em V_L de Cys 22 a Cys 98 em V_H). Não existe qualquer ponte de dissulfureto entre as cadeias e também não existe qualquer cisteína livre.

O vector de expressão pASK 22 inserido é reproduzido em esquema na seguinte fórmula.

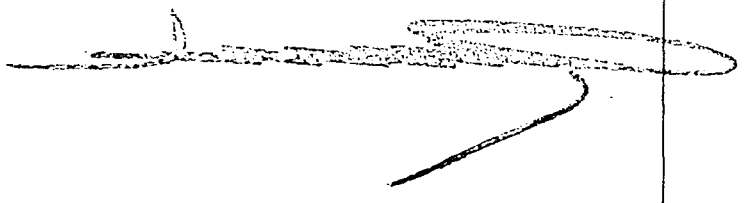


Nesta fórmula encontram-se acoplados os genes sintéticos para os domínios V_L e V_H em fragmentos de genes para a sequência de sinal bacteriana da membrana proteica A (ompA) por um lado e a fosfatase alcalina (phoA) por outro.

Os genes para ambas as proteínas precursoras estão ordenados numa estrutura do tipo de operação artificial por detrás do promotor: lac, garantindo-se deste modo a indução, a co-expressão e a co-secreção simultâneas de ambos os genes.

Após a indução dos genes de expressão as células foram separadas e expostas a um choque osmótico suave. A fase líquida assim obtida que contém as proteínas periplasmáticas foi concentrada através de ultrafiltração, foi dialisada e aplicada directamente numa coluna de afinidade que contém um derivado de fosforilcolina (B. Chesebro e H. Metzger, *Biochemistry* 11, 766 (1972)) como ligante de afinidade. Através de eluição com fosforilcolina obtém-se um fragmento F_V homogêneo que é uniforme por electroforese de gel. A partir do gel de poliacrilamida SDS verifica-se que as duas cadeias do fragmento F_V purificado estão presentes numa proporção molar de 1:1 e que os pesos molares esperados da proteína madura são (V_H : 13600 D, V_L : 12400 D). Para verificação da cisão correcta das duas sequências de sinal foram sequenciados os seis ácidos aminados N-terminais das duas cadeias. Verificou-se que as duas cadeias apresentavam as terminações N correctas para as proteínas maduras. Assim ambas as pré-proteínas heterólogas foram correctamente cindidas através da peptidase de sinal bacteriana sem que seja possível reconhecer qualquer ponto de referência de que se seguiu um processamento impreciso ou uma reacção de desintegração N-terminal.

A constante de afinidade dos fragmentos F_V recombinantes de McPC603 foi medida com diálise equilibrada. Para este fim foram empregues as mesmas condições que foram utilizadas na determinação da constante de afinidade dos anticorpos nativos McPC603 isolados a partir de ascite de rato. O valor encontrado para o tratamento F_V de $1,21 + 0,06 \times 10^{-5} M^{-1}$ é, dentro da precisão de experiência, idêntico ao valor relatado para o anticorpo nativo de $1,6 + 0,4 \times 10^5 M^{-1}$. A curva de ligação segundo Scatchard (Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660 (1949)) é linear e a extrapolação indica que se encontram ligados aproximadamente 1 mol de hapteno por mol de fragmento F_V .



Deste modo, foi confirmado que só existe uma forma de locais de ligação por fragmento F_V e que na proteína isolada não estão presentes quaisquer componentes inactivos.

Mostrou-se assim surpreendentemente que se pode preparar o fragmento F_V no anticorpo McPC603 sob a forma de uma proteína completamente funcional e estável em E. coli. Deste modo foi provada a equivalência funcional do transporte no espaço do retículo endoplasmático da célula eucariótica. Esta equivalência é desconhecida e também insuspeitada uma vez que a proteína bacteriana até agora melhor caracterizada, a qual poderia ser definida como uma proteína heterodímera solúvel em periplasma, a penicilina-acilase de E. coli, é produzida através de processamento proteolítico em periplasma a partir de um precursor de cadeia simples (G. Schumacher, D. Sizmann, H. Hang, P. Buckel e A. Bock, Nucleic Acids Res. 14, 5713 (1986)). Além disso foi já chamada a atenção de que segundo os conhecimentos actuais as bactérias não possuem enzimas ou proteínas que em eucariontes poderiam participar no enrolamento.

Foi também surpreendente o facto de que o fragmento F_V de McPC603 possui sensivelmente a mesma constante de afinidade para fosforilcolina que o próprio anticorpo McPC603 intacto. Este resultado é inesperado visto que a funcionalidade dos fragmentos F_V é muito discutida na literatura (J. Sen e S. Beychok, Proteins 1, 256 (1986)). Por aqui se mostra que uma modificação ou mesmo uma supressão completa dos domínios constantes permitem conservar a funcionalidade.

Em oposição aos métodos até agora únicos para a preparação de fragmentos F_V , nomeadamente através de proteólise de um anticorpo, os processos da presente invenção não apresentam qualquer problema com a proteínas não funcionais, incorrectamente enroladas, incorrectamente reassociadas ou modificadas quimicamente. Em geral o processo de isolamento preferido também é próprio para, com a ajuda de um adsorvente carregado de antigene ou de hapteno, purificar os fragmentos F_V obtidos de acordo com os processos conhecidos, uma vez que tais impurezas não foram ligadas ou não foram eluídas.



Exemplo 1:

Preparação do plasmídeo pASK 22

O plasmídeo de expressão pASK22 foi construído a partir do fragmento maior EcoRI-HindIII de pUC12 (C. Yanisch-Perron, J. Vieira e J. Messing, Gene 33, 103 (1985)), a partir de fragmentos dos vectores pIN III-OmpA1 (Y. Masui, J. Coleman e M. Inouye em "Experimental manipulation of gene expression", M. Inouye ed. Academic Press (1983)) e pH161 (H. Inouye, W. Barnes e J. Beckwith, J. Bacteriol. 149, 434 (1982)) bem como de diversos fragmentos de ADN sintéticos em várias fases com o auxílio de métodos conhecidos em si (T. Maniatis, E.F. Fritsch e J. Sambrook, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor (1982)). A sequência de ADN completa do vector pASK22 obtido desta forma é apresentada no quadro.

Com a mistura de ligação foram transformadas células de E.coli competentes, que em seguida foram seleccionadas por resistência à ampicilina. Os plasmídeos com a estrutura genética desejada foram caracterizados através de análises de restrição bem como de sequenciação das passagens críticas.

Exemplo 2:

Preparação dos fragmentos f_V .

Uma cultura de estirpe de E.coli W3110 transformada com pASK22 foi cultivada em meio LB com 100 mg/l de ampicilina até uma DO_{555} de 0,5. A expressão foi induzida através de adição de IPTG até uma concentração final de 1 mM. Após 45 minutos as células foram recolhidas por meio de centrifugação a 4 000g (10 minutos a 4°C). Por meio da ressuspensão dos agregados celulares em tampão de TES (Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0 ; EDTA 0,5 mM; sacarose 0,5 M) em 10 ml/l da cultura original foi efectuada uma fraccionação das células. As células foram expostas a um choque osmótico suave através de adição de 15 ml/l da cultura original de tampão TES, o qual foi diluído com 1:4 de água e continha fosforilcolina 2 mM. Após 30 minutos de incubação sobre o gelo, a suspensão foi centrifugada durante 10

minutos a 5000 g e o sobrenadante foi centrifugado novamente durante 15 minutos a 48 000 g. O sobrenadante assim obtido, que contém todas as proteínas periplasmáticas solúveis, foi concentrado por meio de ultrafiltração (membrana ^(R)AMICON YM5) até um volume de cerca de 2,5 ml/l da cultura original e foi dialisado contra tampão de BBS (borato 0,2 M/NaOH, pH 8,0; NaCl 0,16 M). Esta solução concentrada foi feita passar através de uma coluna de afinidade (1 a 4 ml de solução por ml de volume de leito) carregada com um derivado de fosforilcolina (B. Chesebro e H. Mezger, supra), foi lavada com tampão de BBS e o fragmento F_V foi eluído com uma solução de de fosforilcolina 1 mM em tampão BBS.

Exemplo 3:

Diálise equilibrada

Numa câmara de diálise com 100 µl de volume de cada lado da membrana carregaram-se de um lado 500 µl de fragmento F_V purificado em tampão BBS e do outro lado uma solução de 50 µl de fosforil(metil)-¹⁴Ccolina (50 mCi/mMol) em tampão de BBS. Para uma DO₂₀₅ de 6,85 foi determinada para o fragmento F_V uma concentração de 0,22 mg/ml (R.K. Scopes, Protein purification principles and practice, Springer-Verlag, New York, 1982, p. 241). Após um equilíbrio de 22 horas à temperatura ambiente foram analisadas amostras de 20 µl de cada solução num contador de cintilação (Beckman LS 1801) e os dados foram aplicados segundo Scatchard (supra). A partir do aumento da linha obtida resultou uma constante de afinidade $K_a = 1,21 \pm 0,06 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

TABELA

DNA-Sequenc. von pASK22 mit Aminosäure-Sequenzen
von ompA-V_H und phoA-V_L

1	GCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCA	60
	CGCGGGTTATGCGTTTGGCGGAGAGGGGCGCGCAACCGGCTAAGTAATTACGTGACCGT	
61	CGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCT	120
	GCTGTCCAAAGGGCTGACCTTTCGCCCGTCACTCGCGTTGCGTTAATTACACTCAATCGA	
121	CACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT	180
	GTGAGTAATCCGTGGGCTCCGAAATGTGAAATACGAAGCCGAGCATACAACACACCTTA	
181	TGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTTCTAGA	240
	ACACTCGCCTATTGTTAAAGTGTGTCCTTTGTGATACTGGTACTAATGCTTAAAGATCT	
241	TAACGAGGGCAAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTC	300
	ATTGCTCCCGTTTTTTACTTTTTCTGTCGATAGCGCTAACGTCACCGTGACCGACCAAAG	
MetLysLysThrAlaIleAlaIleAlaValAlaLeuAlaGlyPhe -		
301	GCTACCGTAGCGCAGGCCGAAGTTAAACTGGTAGAGTCTGGTGGTGGTCTGGTACAGCCG	360
	CGATGGCATCGCGTCCGGCTTCAATTTGACCATCTCAGACCACCACCAGACCATGTCCGC	
AlaThrValAlaGlnAlaGluValLysLeuValGluSerGlyGlyGlyLeuValGlnPro -		
361	GGTGGATCCCTGCGTCTGTCTTGCGCTACCTCAGGTTTCACCTTCTCTGACTTCTACATG	420
	CCACCTAGGGACGCAGACAGAACGCGATGGAGTCCAAAGTGGAAGAGACTGAAGATGTAC	
GlyGlySerLeuArgLeuSerCysAlaThrSerGlyPheThrPheSerAspPheTyrMet -		
421	GAGTGGGTACGTCAGCCCCGGGTAAACGTCTCGAGTGGATCGCAGCTAGCCGTAACAAA	480
	CTCACCCATGCAGTCGGGGGCCCATTTGCAGAGCTCACCTAGCGTCGATCGGCATTGTTT	
GluTrpValArgGlnProProGlyLysArgLeuGluTrpIleAlaAlaSerArgAsnLys -		
481	GGTAACAAGTATAACCACCGAATACAGCGCTTCTGTTAAAGGTCGTTTCATCGTTTCTCGT	540
	CCATTGTTTCATATGGTGGCTTATGTGCGGAAGACAATTTCCAGCAAAGTAGCAAAGAGCA	
GlyAsnLysTyrThrThrGluTyrSerAlaSerValLysGlyArgPheIleValSerArg -		
541	GACACTAGTCAATCGATCCTGTACCTGCAGATGAATGCATTGCGTGCTGAAGACACCGCT	600
	CTGTGATCAGTTAGCTAGGACATGGACGTCTACTTACGTAACGCACGACTTCTGTGGCGA	
AspThrSerGlnSerIleLeuTyrLeuGlnMetAsnAlaLeuArgAlaGluAspThrAla -		

~~CONFIDENTIAL~~

601 ATCTACTACTGCGCGCGTA ACTACTATGGCAGCACTTGGTACTTCGACGTTTGGGGTGCA 660
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TAGATGATGACGCGCGCATTGATGATACCGTCGTGAACCATGAAGCTGCAAACCCACGT
 IleTyrTyrCysAlaArgAsnTyrTyrGlySerThrTrpTyrPheAspValTrpGlyAla -
 661 GGTACCACCGTTACCGTTTCTTCTTGATAACATGGAGAAAATAAAGTGAAACAAAGCACT 720
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCATGGTGGCAATGGCAAAGAAGAACTATTGTACCTCTTTTATTTCACTTGTTCGTGA
 GlyThrThrValThrValSerSerEnd MetLysGlnSerThr -
 721 ATTGCACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACCCCTGTGACAAAAGCCGATATCGTTATG 780
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TAACGTGACCGTGAGAATGGCAATGACAAATGGGGACACTGTTTTCGGCTATAGCAATAC
 IleAlaLeuAlaLeuLeuProLeuLeuPheThrProValThrLysAlaAspIleValMet -
 781 ACCCAGTCTCCGAGCTCTCTGTCTGTATCTGCAGGTGAACGTGTTACCATGTCTTGCAAA 840
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGGGTTCAGAGGCTCGAGAGACAGACATAGACGTCCACTTGCACAATGGTACAGAACGTTT
 ThrGlnSerProSerSerLeuSerValSerAlaGlyGluArgValThrMetSerCysLys -
 841 TCTTCTCAGTCTCTGCTGAACCTCTGGTAACCAGAAAACTTCCTGGCGTGGTATCAGCAA 900
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AGAAGAGTCAGAGACGACTTGAGACCATTGGTCTTTTGAAGGACCGCACCATAGTCGTT
 SerSerGlnSerLeuLeuAsnSerGlyAsnGlnLysAsnPheLeuAlaTrpTyrGlnGln -
 901 AAGCCTGGCCAACCGCCGAACTGCTGATCTACGGTGGCTCGACCCGTAATCTGGTGT 960
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTCGGACCGGTTGGCGGCTTTGACGACTAGATGCCACGCAGCTGGGCACTTAGACCACAA
 LysProGlyGlnProProLysLeuLeuIleTyrGlyAlaSerThrArgGluSerGlyVal -
 961 CCGGACCGTTTTACCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTTCACTCTGACCATCTCTTCTGTA 1020
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGCCTGGCAAATGGCCATCGCCATCGCCATGGCTGAAGTGAGACTGGTAGAGAAGACAT
 ProAspArgPheThrGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerSerVal -
 1021 CAGGCTGAAGATCTGGCTGTTTACTACTGTCAAACGACCACTCTTACCCGCTGACCTTT 1080
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTCCGACTTCTAGACCGACAAATGATGACAGTTTTGCTGGTGAGAATGGGCGACTGGAAA
 GlnAlaGluAspLeuAlaValTyrTyrCysGlnAsnAspHisSerTyrProLeuThrPhe -
 1081 GGCGCCGGCACCAAACTGGAAGCGCGCTTGATAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTT 1140
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCGCGGCCGTGGTTTGACCTTGACTTCGCGCGAACTATTGGAACCGTGACCGGCAGCAA
 GlyAlaGlyThrLysLeuGluLeuLysArgAlaEnd
 1141 TACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGACGACATC 1200
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATGTTGCAGCACTGACCCTTTTGGGACCGCAATGGGTTGAATTAGCGGAACGTCGTGTAG
 1201 CCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGT 1260
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGGGAAAGCGGTGACCGCATTATCGCTTCTCCGGCGTGGCTAGCGGGAAGGGTTGTCA

1261 TGC GCAG CCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCG 1320
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACGCGT CGGACTTACCGCTTACCGCGGACTACGCCATAAAAGAGGAATGCGTAGACACGC

 1321 GTATTTTACACCCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAA 1380
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CATAAAGTGTGGCGTATACCACGTGAGAGTCATGTTAGACGAGACTACGGCGTATCAATT

 1381 GCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGG 1440
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGGT CGGGCTGTGGGCGGTGTGGGCGACTGCGCGGGACTGCCCGAACAGACGAGGGCC

 1441 CATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTTAC 1500
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTAGGCGAATGTCTGTTTCGACACTGGCAGAGGCCCTCGACGTACACAGTCTCCAAAAGTG

 1501 CGTCATCACC GAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTA 1560
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCAGTAGTGGCTTTGCGCGCTCTGCTTTCCCGGAGCACTATGCGGATAAAAATATCCAAT

 1561 ATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCG 1620
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TACAGTACTATTATTACCAAAGAATCTGCAGTCCACCGTGAAAAGCCCCTTTACACGCGC

 1621 GAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAAT 1680
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTGGGGATAAACAAATAAAAAGATTTATGTAAGTTTATACATAGGCGAGTACTCTGTTA

 1681 AACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCC 1740
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTGGGACTATTTACGAAGTTATTATAACTTTTTCTTCTCATACTCATAAGTTGTAAAGG

 1741 GTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCAGAAA 1800
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CACAGCGGGAATAAGGGAAAAAACGCCGTAAACGGAAGGACAAAAACGAGTGGGTCTTT

 1801 CGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAAC 1860
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCGACCACTTTTCATTTTCTACGACTTCTAGTCAACCCACGTGCTCACCCAATGTAGCTTG

 1861 TGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGA 1920
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACCTAGAGTTGTCGCCATTCTAGGAACTCTCAAAGCGGGGCTTCTTGCAAAGGTTACT

 1921 TGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAG 1980
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACTCGTGAAAATTTCAAGACGATACACCGCGCCATAATAGGGCATAACTGCGGCCCGTTC

 1981 AGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCA 2040
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCGTTGAGCCAGCGGCGTATGTGATAAGAGTCTTACTGAACCAACTCATGAGTGGTCAGT

CAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCA
 2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100
 GTCTTTTCGTAGAATGCCTACCGTACTGTCATTCTCTTAATACGTCACGACGGTATTGGT

TGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAA
 2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
 ACTCACTATTGTGACGCCGGTTGAATGAAGACTGTTGCTAGCCTCCTGGCTTCCTCGATT

CCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGC
 2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220
 GGCGAAAAAACGTGTTGTACCCCTAGTACATTGAGCGGAAGTAGCAACCCTTGGCCTCG

TGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAA
 2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280
 ACTTACTTCGGTATGGTTTGCTGCTCGCACTGTGGTGCTACGGACATCGTTACCGTTGTT

CGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAG
 2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340
 GCAACGCGTTTGATAATTGACCGCTTGATGAATGAGATCGAAGGGCCGTTGTTAATTATC

ACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCGAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCT
 2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
 TGACCTACCTCCGCTATTTCAACGTCCTGGTGAAGACGCGAGCCGGGAAGGCCGACCGA

GGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCAC
 2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460
 CCAAATAACGACTATTTAGACCTCGGCCACTCGCACCCAGAGCGCCATAGTAACGTCGTG

TGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAA
 2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520
 ACCCCGGTCTACCATTCCGGAGGGCATAGCATCAATAGATGTGCTGCCCCCTCAGTCCGTT

CTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGT
 2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580
 GATACCTACTTGCTTTATCTGTCTAGCGACTCTATCCACGGAGTGACTAATTCGTAACCA

AACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTAAAACTTCATTTTAAAT
 2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
 TTGACAGTCTGGTTCAAATGAGTATATATGAAATCTAACTAAATTTGAAGTAAAAATTA

TTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTG
 2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
 AATTTTCCTAGATCCACTTCTAGGAAAACTATTAGAGTACTGGTTTTAGGGAATTGCAC

AGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATC
 2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
 TCAAAAGCAAGGTGACTCGCAGTCTGGGGCATCTTTTCTAGTTTCCTAGAAGAACTCTAG

CTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGG
 2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820
 GAAAAAAGACGCGCATTAGACGACGAACGTTTGTTTTTTGGTGGCGATGGTCGCCACC

2821 TTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAG 2880
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAACAAACGGCCTAGTTCTCGATGGTTGAGAAAAAGGCTTCATTGACCGAAGTCGTCTC

 2881 CGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACT 2940
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCGTCTATGGTTTATGACAGGAAGATCACATCGGCATCAATCCGGTGGTGAAGTTCTTGA

 2941 CTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTG 3000
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GACATCGTGGCGGATGTATGGAGCGAGACGATTAGGACAATGGTCACCGACGACGGTCAC

 3001 GCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCCGAGC 3060
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGCTATTTCAGCACAGAATGGCCCAACCTGAGTTCTGCTATCAATGGCCTATTCCGCGTCG

 3061 GGTCCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCG 3120
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCAGCCCGACTTGCCCCCAAGCACGTGTGTGGGTGGAACCTCGCTTGGCTGGATGTGGC

 3121 AACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGG 3180
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTGACTCTATGGATGTGCGCACTCGATACTCTTTCGCGGTGCGAAGGGCTTCCCTCTTTCC

 3181 CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAG 3240
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCCTGTCCATAGGCCATTCGCCGTCCAGCCTTGTCTCTCGCGTGCTCCCTCGAAGGTC

 3241 GGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTC 3300
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCCCTTTGCGGACCATAGAAATATCAGGACAGCCCAAAGCGGTGGAGACTGAACTCGCAG

 3301 GATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCT 3360
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTAAAAACACTACGAGCAGTCCCCCGCCTCGGATACCTTTTTGCGGTCGTTGCGCCGGA

 3361 TTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCCTGCGTTATCCC 3420
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAAATGCCAAGGACCGGAAAACGACCGGAAAACGAGTGTACAAGAAAGGACGCAATAGGG

 3421 CTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCC 3480
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GACTAAGACACCTATTGGCATAATGGCGGAACTCACTCGACTATGGCGAGCGGCGTCGG

 3481 GAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGA 3523
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CTTGCTGGCTCGCGTCGCTCAGTCACTCGCTCCTTCGCCTTCT

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

- 1ª -

Processo para a preparação de anticorpos funcionais, de fragmentos de anticorpos funcionais ou de proteínas de fusão no domínio dos anticorpos e de outras proteínas caracterizado por se acoplarem os genes para cada uma das cadeias de cada sequência de sinal que realizam o transporte das cadeias de polipeptídeos através da membrana citoplasmática de uma célula bacteriana e que em seguida se cindem, se provocar a expressão das estruturas gênicas numa bactéria e se isolarem as proteínas funcionais a partir do espaço periplasmático ou a partir do meio.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a bactéria ser uma bactéria Gram-negativa.

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por a bactéria ser E. coli.

- 4ª -

processo de acordo com qualquer das reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizado por se acoplarem os genes para ambos os pré-peptídeos sob a forma de um sistema de operações regulável.

- 5ª -

Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações anteriores, caracterizado por se submeterem as bactérias separadas a um choque osmótico a fim de se isolar a proteína funcional a partir do espaço periplasmático de tal modo que o periplasma seja feito sair da célula mas que o citoplasma fique intacto, se enriquecer a fase líquida obtida deste modo por centrifugação e se obter a proteína pretendida a partir deste concentrado.

- 6a -

Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações anteriores, caracterizado por se adicionar a solução contendo a proteína funcional sobre um absorvente carregado com um antígeno ou um hapteno correspondente e se eluir a proteína pretendida por isolamento com uma solução contendo um dos antígenos ou dos haptenos referidos.

Os requerentes declaram que o primeiro pedido desta patente foi apresentado na República Federal Alemã em 31 de Dezembro de 1987, sob o nº.P 37 44 595.2.

Lisboa, 29 de Dezembro de 1988.

o AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and strokes, positioned below the text of the official agent.



R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO POR MANIPULAÇÃO GENÉTICA DE ANTICORPOS"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de anticorpos funcionais, de fragmentos de anticorpos funcionais ou de proteínas de fusão no domínio dos anticorpos e de outras proteínas que compreende acoplarem-se os genes para cada uma das cadeias de cada sequência de sinal que realizam o transporte das cadeias de polipeptídeos através da membrana citoplasmática de uma célula bacteriana e que em seguida se cindem, se provocar a expressão das estruturas genéticas numa bactéria e se isolarem as proteínas funcionais a partir do espaço periplasmático ou a partir do meio.

.
.
.