



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0614516-7 A2**

(22) Data de Depósito: 16/08/2006
(43) Data da Publicação: 29/03/2011
(RPI 2099)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/00

(54) Título: **MÉTODO PARA PRODUÇÃO EM MASSA DA REGIÃO Fc DA IMUNOGLOBULINA LIVRE DE RESÍDUOS DE METIONINA INICIAL**

(30) Prioridade Unionista: 16/08/2005 KR 10-2005-0074989

(73) Titular(es): HANMI PHARMACEUTICAL CO., LTD

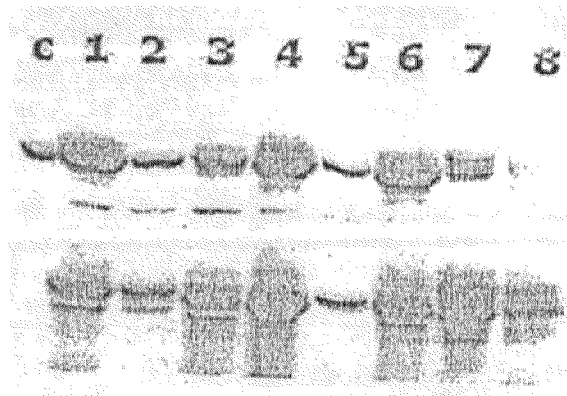
(72) Inventor(es): DAE HAE SONG, GWAN-SUN LEE, JIN HWAN SHIN, JIN SUN KIM, KI DOO CHOI, SE-CHANG KWON, SUNG YOUB JUNG, YOUNG MIN KIM

(74) Procurador(es): TAVARES PROPRIEDADE INTELECTUAL LTDA

(86) Pedido Internacional: PCT KR2006003207 de 16/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/021129 de 22/02/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUÇÃO EM MASSA DA REGIÃO Fc DA IMUNOGLOBULINA LIVRE DE RESÍDUOS DE METIONINA INICIAL. É revelado um método para a produção em massa de uma região Fc da imunoglobulina monomérica ou dimérica, livre de resíduos de metionina inicial, usando um vetor de expressão recombinante que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica para uma região Fc da imunoglobulina recombinante, a qual compreende uma região Fc da imunoglobulina ligada, em seu N-terminal, a uma região Fc da imunoglobulina via uma ligação peptídica.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção
para “MÉTODO PARA PRODUÇÃO EM MASSA DA
REGIÃO Fc DA IMUNOGLOBULINA LIVRE DE
RESÍDUOS DE METIONINA INICIAL”.

5 Campo Técnico

A presente invenção refere-se a um método para produção em grande escala de uma região Fc da imunoglobulina monomérica ou dimérica, livre de resíduos de metionina inicial, tirando proveito de um vetor de expressão recombinante que compreende uma codificação de seqüência de nucleotídeos para uma região Fc da imunoglobulina recombinante, incluindo uma região de dobradiça da imunoglobulina.

Técnica Anterior

15 Com os avanços na engenharia genética, foi desenvolvida e usada uma grande quantidade de fármacos protéicos. Entretanto, os fármacos protéicos, suscetíveis à desnaturação ou degradação proteolítica no corpo, são difíceis de serem mantidos em concentrações e títulos *in vivo* durante um
20 longo período de tempo. O aperfeiçoamento na estabilidade protéica *in vivo*, que pode levar à manutenção de concentrações *in vivo* de fármacos protéicos em níveis adequados, é importante não apenas para elevar a eficácia da terapia, mas também para
25 ajudar aos pacientes que precisam tomar injeções freqüentes de seus fármacos protéicos, em termos de custo e conveniência.

Durante muito tempo, foram realizadas várias tentativas em melhorar a estabilidade *in vivo* dos fármacos protéicos, como, por exemplo, alterando-se a formulação das proteínas, combinando uma proteína com outra proteína, ou ligando, por meios químicos ou biológicos, um polímero adequado à superfície de uma proteína.

Um exemplo dessa técnica consiste em fazer uma proteína de fusão com o fragmento Fc da imunoglobulina.

O fragmento Fc media funções efetoras, tal como citotoxicidade dependente de complemento (CDC) ou a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), bem como a capacidade de ligação ao antígeno, que é a única função das imunoglobulinas. Além disso, o fragmento Fc contém uma seqüência que participa na ligação ao receptor Fc neonatal (FcRn), que desempenha um papel na regulação dos níveis de IgG no soro, pois aumenta o transporte da IgG materna para os neonatos e a meia-vida da IgG (Ghetie and Ward, *Immunology Today* 18: 592-598, 1997), e a seqüência regula a interação entre a proteína A e a proteína G. Mediante a fusão desse fragmento Fc com uma proteína terapêutica, realizaram-se diversos estudos para melhorar a estabilidade da proteína terapêutica.

Por exemplo, a Patente Coreana Nº 249572 revela uma proteína de fusão que é preparada ligando uma região Fc de cadeia pesada da IgG1 (Fc) em uma extremidade amino-terminal dela a uma extremidade carboxila-terminal de uma proteína, tal como um receptor de IL4, um receptor de IL7, um

receptor de G-CSF ou um receptor EPO, produzindo a proteína de fusão resultante em células de mamíferos. A Patente US N^o 5.605.690 descreve uma proteína de fusão que compreende um receptor de fator de necrose tumoral, fusionada, em sua
5 extremidade carboxila-terminal, a um derivado da Fc da IgG1 humana, a proteína de fusão sendo produzida em células animais. Além disso, Tanox Inc. divulgou, na Patente US N^o 5.723.125 e 5.908.626, uma molécula híbrida compreendendo interferon alfa ou beta humano que é ligada, em sua extremidade carboxila-
10 terminal, à Fc da IgG4 humana nativa por meio de um peptídeo de ligação, e produzida em células animais. A Lexigen Inc., conforme descrito na Publicação Internacional do Pedido PCT N^o WO 00/69913, preparou um Fc de IgG1 nativa, ligado, em sua extremidade carboxila-terminal, à extremidade amino-terminal do
15 interferon humano por recombinação genética sem o uso de um peptídeo de ligação, e produziu a proteína de fusão em células animais. A Publicação de Patente US N^o 20030082679 revela uma proteína de fusão com uma meia-vida prolongada, que compreende G-CSF humano ligado, em sua extremidade
20 carboxila-terminal, à extremidade amino-terminal da Fc da IgG1, e é produzida em células animais. A Publicação de Patente US N^o 20010053539, Patente US N^o 6.030.613, Publicação Internacional de Pedido PCT N^o WO 99/02709 e WO 01/03737 e a Patente Européia N^o 0464533B1 revela uma proteína de fusão de Fc com
25 uma meia-vida em soro maior do que uma proteína nativa, que compreende uma Fc de IgG1 ou derivado de Fc ligado, em sua

extremidade amino-terminal, por meio de um peptídeo de ligação ou sem um peptídeo de ligação, à extremidade carboxila-terminal da EPO humana, TPO, hormônio do crescimento humano ou interferon beta humano, a proteína de fusão à Fc sendo produzida
5 em células animais.

Essas proteínas de fusão ao Fc, conforme descrito acima, aumentam a meia-vida em soro das proteínas-alvo, mas envolvem problemas relacionados à mediação das funções efetoras pelo fragmento Fc (Patente US Nº 5.349.053).
10 Por meio das funções efetoras do fragmento Fc, elas ajustam complementos ou ligam-se a células expressando FcγRs, levando à lise das células específicas, e induzem a produção e segregação de várias citocinas que induzem a inflamação, acarretando inflamação indesejada. Além disso, a fusão cria uma nova
15 seqüência de aminoácidos em uma região de conexão entre o fragmento Fc e a proteína parceira, o que pode induzir possivelmente respostas imunológicas em caso de administração por período prolongado.

Sob esse aspecto, foram realizadas muitas
20 tentativas em preparar uma imunoglobulina, ou fragmento de imunoglobulina, que possua uma grande meia-vida em soro, mas que seja deficiente em funções efetoras. Cole et al. relataram que, quando resíduos de aminoácidos da região CH2 nas posições 234, 235 e 237, conhecidos por terem um papel importante na ligação
25 aos receptores de Fc, são substituídos por alanina para, dessa forma, produzir um derivado de Fc com afinidade de ligação

reduzida para receptores de Fc, a atividade de ADCC é inibida (Cole et al., *J. Immunol.* 159: 3613-3621, 1997). Entretanto, em todas essas variantes, o Fc pode ter imunogenicidade ou antigenicidade aumentada se comparado ao fragmento Fc humano nativo em razão da presença de aminoácidos inadequados, e pode perder funções desejadas do Fc.

Dentre os métodos de eliminação ou redução de funções efectoras indesejadas, que mantêm altas concentrações em soro de uma imunoglobulina, um se baseia na remoção de componentes de açúcares da imunoglobulina. Conforme descrito na Patente US Nº—5.585.097, um derivado de anticorpo aglicosilado, como um anticorpo anti-CD3, pode ser preparado substituindo um resíduo glicosilado de anticorpos, o resíduo de asparagina na posição 297 do domínio CH₂, por outro aminoácido. Esse derivado de anticorpo aglicosilado exibe funções efectoras reduzidas, mas ainda mantém sua afinidade de ligação com o receptor FcR_n, sem nenhuma alteração na meia-vida em soro. Entretanto, esse derivado também é problemático em termos de ser possivelmente reconhecido como um material estranho e ser rejeitado pelo sistema imunológico em virtude da produção de uma construção recombinante contendo uma seqüência anormal. A Publicação de Patente US Nº 20030073164 revela um método de produção de um derivado de Fc usando *E. coli* livre da capacidade de glicosilação a fim de preparar um anticorpo terapêutico deficiente em funções efectoras.

A companhia americana Amgen Inc. descreveu, na Patente US Nº 6.660.843 e na Publicação de Patente US Nº 20040044188 e 20040053845, um derivado de Fc da IgG1 humana contendo deleções de aminoácidos nos primeiros cinco
5 resíduos de aminoácidos da região de dobradiça, que é fusionada à extremidade amino ou carboxila-terminal de uma proteína terapêutica ou uma proteína terapêutica imitada por um peptídeo, e sua produção usando um hospedeiro *E. coli*. Entretanto, essa proteína de fusão que não contém uma seqüência de sinais é
10 expressa como corpos de inclusão, e assim, deve ser submetida a um processo adicional de renovelamento. Esse processo de enovelamento de proteínas reduz a produção, e, principalmente em uma proteína presente como um homodímero ou um heterodímero, reduz notoriamente a produção de dímeros. Além
15 disso, quando uma proteína que não contém uma seqüência de sinais é expressa em *E. coli*, um resíduo de metionina é adicionado ao N-terminal do produto da expressão devido à característica do sistema de expressão de proteínas do *E. coli*. Os supracitados produtos de expressão da Amgen Inc. têm um
20 resíduo de metionina N-terminal, que pode induzir respostas imunológicas na ocasião de administração repetida ou excessiva ao corpo. Além disso, tendo em vista que essas moléculas de fusão são expressas em uma forma de proteína de fusão no *E. coli* pela ligação de um gene que codifica uma proteína terapêutica
25 com um gene Fc, é difícil expressá-las no *E. coli*, ou uma proteína terapêutica é difícil de ser produzida no *E. coli* caso sua expressão

no *E. coli* em uma forma fusionada resulte em uma diminuição significativa ou na perda da atividade. Além disso, uma vez que a fusão das duas moléculas cria uma seqüência de aminoácidos animal, de ocorrência não natural, na região de conexão entre duas proteínas, a proteína de fusão poderia ser possivelmente reconhecida como “não-própria” pelo sistema imunológico, com isso induzindo respostas imunológicas.

Para resolver esses problemas, os presentes inventores preparam previamente um fragmento Fc e um fármaco protéico como polipeptídeos separados, usando, em vez de um método de fusão baseado em recombinação genética, os melhores sistemas de expressão, e ligando, de maneira covalente, os dois polipeptídeos um ao outro para usar o fragmento Fc como um veículo de fármacos. Neste caso, é possível preparar um conjugado de um fármaco de polipeptídeo glicosilado e um Fc aglicosilado, que não induz respostas imunológicas indesejadas, mas possui propriedades satisfatórias de atividade de fármaco fisiológico, duração e estabilidade *in vivo*.

No caso acima, uma vez que é preferível que Fc esteja em uma forma aglicosilada, utiliza-se um sistema de expressão procariótica, tal como *E. coli*. Os métodos de produção de proteínas usando um sistema de expressão com *E. coli* apresentam muitas vantagens sobre os métodos convencionais que fazem uso de células animais, conforme mostrado a seguir. Um vetor de expressão de *E. coli* pode ser construído com facilidade, permitindo assim avaliar rapidamente a expressão protéica.

Graças a sua rápida velocidade de crescimento, o *E. coli* permite a produção em massa de uma proteína de interesse a baixo custo. Além disso, pode-se usar um processo de expressão relativamente simples. Logo, o *E. coli* é mais útil para produção comercial do
5 que outras células hospedeiras.

A maioria das regiões Fc está presente como corpos de inclusão quando ocorre a superexpressão em *E. coli*. Por esta razão, a indústria exige que as regiões Fc sejam expressas em forma solúvel em água no *E. coli*. A Patente Européia N^o
10 0227110 revela a produção da região Fc da imunoglobulina G1 usando apenas o produto (o lisado celular) que é expresso em forma solúvel em água quando ocorre a superexpressão da região Fc da imunoglobulina G1. Entretanto, apenas a imunoglobulina expressa em forma solúvel em água tem um rendimento tão baixo
15 quanto 15 mg/L, o que não tem valor em termos de utilidade industrial. O Pedido de Patente Coreano N^o 0092783, superando o problema encontrado no estado da técnica, introduz uma nova técnica de expressar uma região Fc da imunoglobulina, não como corpos de inclusão, mas em uma forma solúvel em água em *E.*
20 *coli* por meio da fusão da seqüência de nucleotídeos, que corresponde à região Fc, a uma seqüência de sinais de *E. coli*. Ao ocorrer a expressão em *E. coli*, a proteína de interesse está presente em forma solúvel, livre do peptídeo de sinal, com seu rendimento de produção aumentado tanto quanto 600 mg/L.

25 Voltando-se para a presente invenção, os presentes inventores, visando a aumentar o rendimento de

produção a um nível adequado para industrialização, realizaram uma intensa e meticulosa pesquisa de um método de produção de regiões Fc da imunoglobulina aglicosilada ativa livres de resposta imunológica, e descobriam que quando uma seqüência de nucleotídeos codificando uma região Fc da imunoglobulina é expressa em uma forma fusionada no terminal N para uma região de dobradiça específica, a região Fc da imunoglobulina é expressa como corpos de inclusão, que são, finalmente, um dímero ou um monômero da região Fc da imunoglobulina livre de resíduos de metionina inicial por meio de processos de solubilização e renovelamento.

Revelação da Invenção

Portanto, um dos objetivos da presente invenção é oferecer um método de produção em massa de uma região Fc da imunoglobulina livre de resíduo de metionina inicial, compreendendo construir um vetor que inclui uma seqüência de nucleotídeos que codifica para uma região Fc da imunoglobulina recombinante contendo uma região de dobradiça da imunoglobulina; transformar uma célula procariótica com o vetor, cultivar um transformante resultante; e isolar e purificar, do transformante, a região Fc da imunoglobulina expressa em um corpo de inclusão.

Outro objetivo da presente invenção é o de obter um dímero ou um monômero de uma região Fc da imunoglobulina preparado pelo método acima.

Breve Descrição dos Desenhos

Os referidos objetivos, aspectos e vantagens da presente invenção, e outros, serão compreendidos com mais clareza na descrição detalhada seguinte, considerada em combinação com os desenhos acompanhantes, nos quais:

5 A FIG. 1 é uma fotografia de eletroforese em gel mostrando a formação de fragmentos monoméricos e diméricos da região Fc de corpos de inclusão expressos usando um vetor de expressão contendo um nucleotídeo que codifica uma região Fc da imunoglobulina IgG4 humana;

10 A FIG. 2 ilustra os resultados da ELISA para a capacidade de ligação a C1q da região Fc da imunoglobulina IgG4 humana;

A FIG. 3 ilustra os resultados da ELISA para a capacidade de ligação a Fc γ RI da região Fc da imunoglobulina
15 IgG humana;

A FIG. 4 ilustra os resultados da ELISA para a capacidade de ligação a Fc γ RIII da região Fc da imunoglobulina IgG humana;

20 A FIG. 5 ilustra os resultados da ELISA para a capacidade de ligação ao FcRn $\alpha\beta$ 2 da região Fc da imunoglobulina IgG humana;

A FIG. 6 ilustra os resultados das meia-vidas em soro de um conjugado de EPO-PEG-Fc preparado usando uma região Fc da imunoglobulina IgG humana como um
25 veículo;

A FIG. 7 é uma fotografia de um gel SDS-PAGE a 15%, no qual, após serem misturadas com volumes iguais de um tampão de amostra de proteínas 2x, são realizadas partes das soluções fermentadas obtidas pelo crescimento dos transformantes microbianos do Exemplo 2 em fermentadores sob condição de expressão;

A FIG. 8 é uma fotografia de um gel SDS-PAGE no qual as proteínas reenvelopadas dos corpos de inclusão expressos pelos transformantes do Exemplo 2 são separadas e visualizadas como bandas;

A FIG. 9 é uma fotografia de um gel SDS-PAGE a 15%, no qual, após serem misturadas com volumes iguais de um tampão de amostra de proteínas 2x, são realizadas partes das soluções fermentadas obtidas pelo crescimento dos transformantes microbianos do Exemplo 3 em fermentadores sob condição de expressão; e

A FIG. 10 é uma fotografia de um gel SDS-PAGE a 15% no qual, após serem misturados com um tampão de amostra de proteínas livre de agente redutor, como DTT ou beta-mercaptoetanol, são realizados os respectivos produtos expressos e purificados no Exemplo 3.

Melhor Modo de Concretização da Invenção

Sob um aspecto, a presente invenção refere-se a um método de produção em massa de uma região Fc da imunoglobulina, compreendendo construir um vetor que inclui uma seqüência de nucleotídeos que codifica para uma região Fc

da imunoglobulina recombinante contendo uma região de dobradiça da imunoglobulina; transformar uma célula procariótica com o vetor; cultivar o transformante resultante; e isolar e purificar, do transformante, a região Fc da imunoglobulina expressa em uma forma de corpo de inclusão.

A presente invenção refere-se a um método de produção em massa de uma região Fc da imunoglobulina útil como um veículo para fármacos protéicos. Quando uma região Fc da imunoglobulina é fusionada no terminal N com uma região de dobradiça, a região Fc resultante recombinante da imunoglobulina Fc é encontrada expressa como um corpo de inclusão, que depois é solubilizada e reenovelada em um dímero ou monômero em uma forma ativa, livre do resíduo de metionina inicial codificado pelo códon de iniciação. A presente invenção é de grande importância em termos da descoberta de que, quando fusionada a uma região Fc da imunoglobulina, uma região de dobradiça desempenha um papel fundamental no processamento e reenovelamento da região Fc recombinante em uma seqüência nativa livre do resíduo de metionina inicial codificado pelo códon de iniciação.

A região de dobradiça capaz de permitir que uma região Fc da imunoglobulina seja produzida em massa em uma forma recombinante com ela pode ser um derivado de IgG, IgA, IgM, IgE ou IgD de humanos ou de outros animais, inclusive cabras, suínos, camundongos, coelhos, hamsters, ratos e porcos porquinhos-da-índia, tendo preferência pelos derivados de IgG,

por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, ou IgG4 (SEQ. ID. N^{os}. 14 a 17).
A região de dobradiça útil na presente invenção pode ser uma
região de dobradiça inteira ou um fragmento dela. Prefere-se um
fragmento da região de dobradiça contendo duas ou mais
5 seqüências consecutivas de aminoácidos, que são mais preferíveis
quando contendo pelo menos um resíduo de cisteína. São de uso
prático na presente invenção os fragmentos da região de
dobradiça derivados de IgG4 da SEQ. ID N^o 17, que são
representados pela SEQ. ID. N^{os} 18, 19, 20 e 21. Quando são
10 empregadas regiões de dobradiça de SEQ. ID N^o 18, 19 e 20, a
região Fc da imunoglobulina pode ser preparada em forma de
dímero ou monômero. A região de dobradiça da SEQ. ID. N^o 21
propicia a preparação eficaz de um monômero da região Fc da
imunoglobulina. Em outras implementações da presente
15 invenção, fragmentos representados pelas SEQ. ID. N^{os} 48 a 55 da
região de dobradiça, derivada da IgG1 da SEQ. ID. N^o 14, e
representadas pelas SEQ. ID. N^{os} 56 a 60, da região de dobradiça
derivada de IgG2 da SEQ. ID. N^o 15, foram usados para produzir
um dímero da região Fc da imunoglobulina.

20 A região Fc da imunoglobulina capaz de ser
produzida pela presente invenção pode ser uma forma nativa
isolada de humanos ou de outros animais, inclusive, cabras,
suínos, camundongos, coelhos, hamsters, ratos e porquinhos-da-
índia, ou pode ser um recombinante ou derivado dela, obtido de
25 células animais transformadas ou microorganismos. Pode-se dar
preferência a uma região Fc da IgG, IgA, IgM, IgE e IgD de

humanos, ou uma combinação ou híbrido delas. O termo “combinação”, conforme usado neste documento, significa que os polipeptídeos codificando fragmentos Fc da imunoglobulina de cadeia única da mesma origem são ligados a um único polipeptídeo de cadeia única de uma origem diferente para formar um dímero ou multímero. O termo “híbrido”, conforme usado neste documento, significa que as seqüências que codificam dois ou mais fragmentos Fc da imunoglobulina de diferentes origens estão presentes em um fragmento Fc de imunoglobulina de cadeia única. A imunoglobulina pode, de preferência, ser uma região Fc da IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, ou uma combinação ou híbrido destas. As seqüências de nucleotídeos que codificam regiões Fc da imunoglobulina humana e seqüências de aminoácidos limitadas a estas, úteis, na presente invenção, podem ser as codificadas por seqüências de nucleotídeos dos bancos de dados GenBank e/ou EMBL.

A região Fc da imunoglobulina da presente invenção inclui um derivado da seqüência de aminoácidos. O termo “derivado da seqüência de aminoácidos” se refere a uma seqüência em que um ou mais resíduos de aminoácidos diferem-se de uma seqüência de aminoácidos tipo selvagem, e podem ocorrer naturalmente ou serem gerados por meios artificiais. A região Fc da imunoglobulina inclui derivados que resultam de uma deleção, uma inserção, uma substituição conservativa ou não conservativa, ou suas combinações. Uma inserção é normalmente feita pela adição de uma seqüência consecutiva de aminoácidos de

cerca de 1 a 20 aminoácidos, ou pode ser feita com uma seqüência mais longa. Uma deleção está geralmente na faixa de cerca de 1 a 30 resíduos de aminoácidos. Trocas de aminoácidos em proteínas e peptídeos, que geralmente não alteram a atividade das proteínas ou peptídeos, são conhecidos na técnica (H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). As trocas de ocorrência mais comum são: Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Tre/Ser, Ala/Gli, Ala/Tre, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gli, Thy/Fen, Ala/Pro, Lis/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu e Asp/Gli, em ambas as direções. Tais derivados podem ser preparados por meio de um método de síntese química de peptídeos ou um método de recombinação baseado em seqüência de DNA, ambos os quais são conhecidos na técnica (Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2d Ed., 1989).

Além disso, a região Fc da imunoglobulina, se desejado, pode ser modificada por fosforilação, sulfatização, acrilização, glicosilação, metilação, famesilação, acetilação, amidação, entre outros.

O derivado de imunoglobulina da presente invenção é, de preferência, um equivalente funcional em relação a sua forma natural, tendo assim uma atividade biológica similar, ou, se desejado, poderia ser produzido alterando-se a propriedade da forma natural. De preferência, os derivados da região Fc da imunoglobulina são proteínas que possuem estabilidade estrutural aumentada contra calor, pH, etc., ou solubilidade, ou que possuem

características aperfeiçoadas em termos de formação de ligação de bissulfeto, compatibilidade com um hospedeiro de expressão, ligação ao complemento, ligação ao receptor Fc e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), contanto que os derivados produzidos não sejam tão diferentes das formas naturais dos humanos a ponto de induzir respostas imunológicas indesejadas em humanos e animais. Derivados preferidos são regiões Fc da IgG1 que são alterados em tal resíduo específico de modo a terem afinidade reduzida por receptores Fc mediando a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Um derivado produzido pode conter uma deleção ou uma substituição por outro aminoácido no resíduo de leucina na posição 234 de uma seqüência CH2 da IgG1 (consulte a seqüência do banco de dados Kogat para obter a numeração dos resíduos de aminoácidos). Mais preferivelmente, Leu234 é substituído por fenilalanina, um resíduo de aminoácido em uma posição correspondente em IgG4.

De acordo com a presente invenção, é preparada uma seqüência de nucleotídeos que codifica para uma região Fc da imunoglobulina recombinante na qual uma região Fc da imunoglobulina é fusionada a uma região de dobradiça da imunoglobulina. Conforme usado neste documento, o termo “região Fc da imunoglobulina recombinante” se refere a uma região Fc da imunoglobulina ligada, no terminal N, a uma região de dobradiça via uma ligação peptídica.

Dependendo da região Fc da imunoglobulina, a região de dobradiça a ser fusionada pode ser selecionada. De preferência, é uma região de dobradiça de origem igual à da região Fc da imunoglobulina. Na prática real da presente invenção, foi preparada uma seqüência de nucleotídeos que codifica para uma região Fc da imunoglobulina recombinante, consistindo de uma seqüência de aminoácidos apresentada como SEQ. ID N^{os} 7, 9, 11 ou 13, na qual uma região Fc derivada de IgG4 é fusionada a uma região de dobradiça consistindo de uma seqüência de aminoácidos apresentada como SEQ. ID N^{os} 18, 19, 20 ou 21. As seqüências de nucleotídeos que codificam para as regiões Fc da imunoglobulina recombinante são representadas pelas SEQ. ID. N^{os} 6, 8, 10 e 12, respectivamente.

Em outra implementação, foi preparada uma seqüência de nucleotídeos que codifica para uma região Fc da imunoglobulina recombinante que consiste de uma seqüência de aminoácidos apresentada como na SEQ. ID. N^o 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35 ou 37, na qual uma região Fc derivada de IgG1 é fusionada a uma região de dobradiça que consiste de uma seqüência de aminoácidos apresentada como uma das SEQ. ID. N^{os} 48 a 55. As seqüências de nucleotídeos resultantes que codificam as regiões Fc da imunoglobulina recombinante são representadas pelas SEQ. ID. N^{os} 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 e 36.

Em outra implementação, foi preparada uma seqüência de nucleotídeos que codifica para uma região Fc da imunoglobulina recombinante que consiste de uma seqüência de

aminoácidos apresentada como na SEQ. ID. N^o 39, 41, 43, 45 ou 47, em que uma região Fc derivada de IgG2 é fusionada a uma região de dobradiça que consiste de uma seqüência de aminoácidos apresentada como uma das SEQ. ID. N^{os} 56 a 60.

5 As seqüências de nucleotídeos resultantes que codificam as regiões Fc da imunoglobulina recombinante são representadas pelas SEQ. ID. N^{os} 38, 40, 42, 44 e 46.

De acordo com a presente invenção, são proporcionados vetores de expressão recombinantes aos quais as

10 seqüências de nucleotídeos que codificam as regiões Fc da imunoglobulina recombinante são operavelmente ligadas.

O termo “vetor de expressão recombinante”, conforme usado neste documento, que descreve um vetor capaz de expressar uma proteína-alvo em uma célula hospedeira

15 adequada, refere-se a uma construção genética que compreende elementos reguladores essenciais aos quais um inserto gênico é operavelmente ligado, de tal forma a ser expresso em uma célula hospedeira.

O termo “operavelmente ligado”, conforme

20 usado neste documento, refere-se a uma ligação funcional entre uma seqüência de controle de expressão de ácido nucléico e uma segunda codificação de seqüência de ácido de nucléico para uma proteína-alvo, de tal forma a permitir funções gerais. A ligação operável com um vetor recombinante pode ser preparada usando

25 uma técnica recombinante genética bem conhecida na técnica, e a clivagem e ligação do DNA em sítio específico podem ser

realizadas usando enzimas conhecidas de forma geral na técnica. Um vetor de expressão adequado inclui elementos reguladores de expressão, tal como um promotor, um códon de iniciação, um códon de parada, um sinal de poliadenilação e uma seqüência reforçadora. Os códons de iniciação e de parada são necessários para a funcionalidade em um indivíduo ao qual uma construção genética foi administrada, e devem estar em sintonia com a seqüência de codificação. O promotor do vetor pode ser constitutivo ou induzível. Além disso, os vetores de expressão incluem um marcador selecionável que permite a seleção de células hospedeiras contendo o vetor, e os vetores de expressão replicáveis incluem uma origem de replicação. Na prática da detalhada da presente invenção, os seguintes vetores de expressão recombinante são preparados: pmSCPFC, pmPSCFC, pmCPSFC, pmCPFc, pMEPKFC1, pMSCKFc1, pMDKTFc1, pMCPAFc1, pMPKSFc1, pMCPPFc1, pMPPCFc, pMPCPFc, pmPPCG2Fc, pmPCPG2Fc, pmCPG2Fc, pmCCVG2Fc e pmCVE2Fc.

Os vetores de expressão recombinante expressando as proteínas são transformados em células hospedeiras.

Com respeito ao objetivo da presente invenção, as células hospedeiras são células procarióticas em que não ocorre a glicosilação. Exemplos dessas células procarióticas incluem *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus*, dando preferência a *E. coli*. Exemplos ilustrativos, não restritivos, de linhagens de *E. coli*

incluem BL21 (DE3), JM109, série DH, TOP10 e HB101. A linhagem mais preferível é a BL21 (DE3). Por carecer de um sistema para a glicosilação protéica, o *E. coli* pode ser usado como uma célula hospedeira em que uma região Fc da imunoglobulina é produzida na forma livre de componentes de açúcar presentes em um domínio CH2 de uma imunoglobulina nativa. Os componentes de açúcar do domínio CH2 da imunoglobulina não afetam a estabilidade estrutural das imunoglobulinas, mas fazem com que as imunoglobulinas mediem a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) ao ocorrer a associação com células expressando receptores de Fc e células imunológicas, a fim de segregar citocinas para induzir a inflamação. Além disso, os componentes de açúcar ligam-se à parte C1q do primeiro componente de complemento C1, levando à fixação do complemento. Portanto, quando uma região Fc da imunoglobulina é produzida em uma forma aglicosilada e ligada a uma proteína terapêutica, a proteína terapêutica está presente no soro por um período de tempo prolongado sem as funções efetoras indesejáveis das imunoglobulinas.

A transformação dos vetores de expressão recombinantes em células procarióticas pode ser obtida por qualquer método que permita que os ácidos nucléicos sejam introduzidos nas células, e, como conhecido na técnica, podem ser realizadas escolhendo técnicas convencionais adequadas, de acordo com as células hospedeiras. Esses métodos incluem, sem a isto se limitar: eletroporação, fusão de protoplastos, precipitação

de fosfato de cálcio (CaPO_4), precipitação de cloreto de cálcio (CaCl_2), agitação com fibra de carvão de silício, e transformação mediada por PEG, sulfato de dextrano e lipofectamina.

Na prática detalhada da presente invenção, os
5 vetores de expressão recombinantes são introduzidos individualmente em *E. coli*, gerando assim os seguintes transformantes:

BL21/pmSCPFc(HM11200),
BL21/pmPSCFc(HM11201), BL21/pmCPSFc(HM11204),
BL21/pmCPAFc(HM11205), BL21/pMEPKFc1(HM11206),
10 BL21/pMSCDFc1(HM11207), BL21/pMDKTFc1(HM11208),
BL21/pMCPAFc1(HM11209), BL21/pMPKSFc1(HM11210),
BL21/pMCPPFc1(HM11211), BL21/pMPPCFc1(HM11212),
BL21/pMPCPFc1(HM11213), BL21/pmPPCPG2Fc(HM11214),
BL21/pmPCPG2Fc(HM11215), BL21/pmCPG2Fc(HM11216) e
15 BL21/pmCCVG2Fc(HM11217), BL21/pmCVEG2Fc(HM11218).

Os transformantes que ancoram os vetores de expressão recombinantes neles são cultivados por meio de um método geral.

As condições da cultura podem ser ajustadas
20 com facilidade pelos versados na técnica, de acordo com a linhagem bacteriana. Geralmente, o meio usado para a cultura deve conter todos os nutrientes essenciais para o crescimento e sobrevivência das células. O meio deve conter uma variedade de fontes de carbono, fontes de nitrogênio e microelementos.
25 Exemplos de fontes de carbono disponíveis incluem glicose, sucrose, lactose, frutose, maltose, amido, carboidratos como

celulose, gorduras como óleo de soja, óleo de girassol, óleo de rícino e óleo de coco, ácidos graxos como ácido palmítico, ácido esteárico e ácido linoléico, álcoois como glicerol e etanol, e ácidos orgânicos como ácido acético. Essas fontes de carbono
5 podem ser usadas separadamente ou em combinações de duas ou mais. Exemplos de fontes de nitrogênio disponíveis incluem fontes de nitrogênio orgânico, como peptona, extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte, água de maceração de milho (CSL) e soro de soja, e fontes de nitrogênio inorgânico como
10 uréia, sulfato de amônio, cloreto de amônio, fosfato de amônio, carbonato de amônio e nitrato de amônio. Essas fontes de nitrogênio podem ser usadas separadamente ou em combinações de duas ou mais. Uma fonte fosforosa pode ser incluída no meio, e inclui fosfato diidrogênio de potássio, fosfato hidrogênio de
15 dipotássio, e sais contendo sódio correspondentes. Além disso, o meio pode conter um sal metálico, como sulfato de magnésio ou sulfato de ferro. O meio também podem incluir aminoácidos, vitaminas, precursores adequados, entre outros. O pH da cultura pode ser ajustado pela adição de um composto à cultura, tal como
20 hidróxido de amônio, hidróxido de potássio, amônia, ácido fosfórico e ácido sulfúrico, usando um método adequado. Além disso, durante a cultura, agentes antiespumantes, como ésteres de ácido graxo de poliglicol, podem ser usados para impedir a formação de bolhas. Para manter a cultura no estado desejado,
25 introduz-se oxigênio ou gás contendo oxigênio (por exemplo, ar) na cultura. A temperatura da cultura varia geralmente de 20°C a

45°C, de preferência 25°C a 45°C. Além disso, um fermentador pode ser usado para produção de proteína em grande escala. A produção de proteínas usando um fermentador deve ser realizada levando em consideração vários fatores, inclusive a velocidade de crescimento das células hospedeiras e os níveis de expressão de proteínas. A expressão protéica pode ser induzida pela adição, por exemplo, de IPTG ao meio sob condições adequadas de cultura.

Uma região Fc da imunoglobulina, superexpressa como corpos de inclusão, pode ser purificada por meio de uma técnica geral. As regiões Fc da imunoglobulina produzidas nos transformantes podem ser obtidas rompendo as células usando uma prensa francesa, um ultrasonicador, etc., coletando apenas os corpos de inclusão insolúveis em água contendo a região Fc da imunoglobulina por meio de centrifugação, solubilização e desnaturação da fração coletada com agentes de reenovelamento, tal como uréia, guanidina, arginina, cisteína, beta-mercaptoetanol, etc. para seu reenovelamento, e purificando a proteína de fusão renovada por meio de diálise, várias cromatografias, como cromatografia por filtração em gel, troca iônica e em coluna de fase inversa, e ultrafiltração, separadamente ou em combinação. Geralmente, esse processo de reenovelamento é muito complicado e é conhecido por produzir um rendimento de reenovelamento baixíssimo e assegura a proteína renovada apenas de atividade inferior à da proteína solúvel em água.

Entretanto, o método da presente invenção pode superar os problemas mencionados acima e produzir uma região Fc da imunoglobulina ativa livre do resíduo de metionina inicial em grande escala. De modo geral, quando expressa e produzida em *E. coli*, uma proteína exógena tem um resíduo de metionina inicial codificado pelo códon de iniciação. A administração repetitiva ou excessiva do produto protéico contendo a metionina inicial a corpos humanos pode causar uma resposta imunológica suficiente para reduzir seu efeito terapêutico ou torná-lo tóxico.

Entretanto, quando a região Fc da imunoglobulina recombinante da presente invenção é expressa em *E. coli*, verifica-se que o resíduo de metionina inicial é clivado pela aminopeptidase, uma enzima citoplásmica intrínseca, conforme medido pela análise de sequenciamento N-terminal (Adams et al., J. Mol. Biol. 33:571-589, 1968, Takeda, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60:1487-1494, 1968). A atividade de tais aminopeptidases é conhecida por depender da seqüência e da estrutura da proteína de interesse (Moerschell et al., J. Biol. Chem. 265:19638-19643, 1990, James et al., Protein Expression and Purification 41:45-52, 2005). Uma região de dobradiça, quando fusionada a uma região Fc da imunoglobulina, é afetada pela aminopeptidase, de modo que a metionina inicial seja processada a um grau que depende de sua seqüência de aminoácidos.

Devido ao fato de as propriedades da região de dobradiça determinarem a modificação pós-translacional das proteases, a razão de dímeros para monômeros pode ser

controlada de maneira eficaz selecionando regiões de dobradiça apropriadas. Além disso, quando os corpos de inclusão de reenovelados, a formação de dímeros precisos é impedida pelo descompasso das cisteínas nas ligações de bissulfeto. Entretanto, o método de acordo com a presente invenção garante a formação de ligações precisas de bissulfeto, desse modo levando à formação de dímeros ativos.

Além disso, a presente invenção pode produzir regiões Fc da imunoglobulina em uma escala maior do que os métodos convencionais. Por exemplo, uma região Fc da imunoglobulina é produzida, a um rendimento de 15 mg/L de acordo com o método da Patente Européia N^oEP0227110, em que uma região Fc G1 é superexpressa e purificada apenas a partir de um lisado celular contendo sua forma solúvel em água, e a um rendimento de 50 a 600 mg/L de acordo com o método do Pedido de Patente Coreano N^o 0092783, em que uma região Fc da imunoglobulina fusionada a uma seqüência de sinais de *E. coli* é expressa em uma forma solúvel em água, mas não como um corpo de inclusão. Entretanto, a presente invenção pode produzir uma região Fc da imunoglobulina a um rendimento que chega a 3 a 6 g/L pela purificação de um corpo de inclusão de uma região Fc da imunoglobulina recombinante contendo uma região de dobradiça. Assim, o método da presente invenção assegura um sistema extremamente útil para produzir regiões Fc da imunoglobulina em escala industrial a um rendimento muito superior do que os métodos convencionais.

Em outro aspecto, a presente invenção refere-se a uma região Fc da imunoglobulina preparada de acordo com o método acima.

A região Fc da imunoglobulina produzida em células procarióticas, como *E. coli*, de acordo com o presente método, não possui aplicações industriais especificamente limitadas. Um exemplo de aplicação é o uso como um veículo para a formação de um conjugado com um certo fármaco. A construção do conjugado que compreende a região Fc da imunoglobulina para um fármaco não se limita a uma forma específica. Por exemplo, a região Fc da imunoglobulina e o fármaco podem ser ligados um ao outro a variadas razões, e a ligação pode ser mediada, por exemplo, por meio de um ligante.

O fármaco inclui polipeptídeos, compostos, extratos e ácidos nucléicos. É preferível um fármaco de polipeptídeo (usado com um significado idêntico ao da palavra “proteína”). Exemplos do ligante úteis na presente invenção incluem ligantes não peptídicos, com preferência por um ligante não peptídico, e ainda mais preferência por um polímero não peptídico. Um exemplo preferido da cadeia pesada da imunoglobulina é o Fc.

Se a meia-vida em soro precisar ser aperfeiçoada, qualquer polipeptídeo fisiologicamente ativo pode ser usado, sem limitação específica, como uma proteína parceira da região Fc da imunoglobulina preparada de acordo com o presente método para formar um conjugado. Tais polipeptídeos

fisiologicamente ativos incluem os usados para o tratamento ou prevenção de doenças humanas, que incluem citocinas, interleucinas, proteínas de ligação à interleucina, enzimas, anticorpos, fatores de crescimento, fatores reguladores de transcrição, fatores de coagulação, vacinas, proteínas estruturais, proteínas ou receptores de ligantes, antígenos de superfície celular, antagonistas de receptores, e seus derivados e análogos.

Em detalhes, exemplos não restritivos do polipeptídeo fisiologicamente ativo incluem o hormônio do crescimento humano, o hormônio de liberação do hormônio de crescimento, o peptídeo de liberação do hormônio de crescimento, interferons e receptores de interferon (por exemplo, interferon- α , β , γ e δ , receptor de interferon tipo I solúvel em água, etc.), fatores estimulantes de colônias (por exemplo, interleucina-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, etc.) e receptores de interleucina (por exemplo, receptor de IL-1, receptor de IL-4, etc.), enzimas (por exemplo, glicocerebrosidase, iduronato-2-sulfatase, alfa-galactosidase-A, agalsidase alfa e beta, alfa-L-iduronidase, butirilcolinesterase, quitinase, glutamato decarboxilase, imiglucerase, lipase, uricase, fator ativador de plaquetas, acetilidrolase, endopeptidase neutra, mieloperoxidase, etc.), proteínas de ligação à interleucina e citocina (por exemplo, IL-18bp, proteína de ligação ao TNF, etc.), fator ativador de macrófagos, peptídeo de macrófago, fator de células B, fator de células T, proteína A, inibidor alergênico, glicoproteínas de

necrose celular, imunotoxina, linfotóxina, fator de necrose tumoral, supressores tumorais, fator de crescimento da metástase, antitripsina alfa-1, albumina, alfa-lactalbumina, apolipoproteína-E, eritropoietina, eritropoietina altamente glicosilada, angiopoietinas, hemoglobina, trombina, peptídeo ativador do receptor de trombina, trombomodulina, fator VII, fator VIIa, fator VIII, fator IX e fator XIII, fator ativador de plasminogênio, peptídeo de ligação à fibrina, urocinase, estreptoquinase, hirudina, proteína C, proteína reativa C, inibidor de renina, inibidor de colagenase, superóxido dismutase, leptina, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento epitelial, fator de crescimento epidérmico, angioestatina, angiotensina, fator de crescimento ósseo, proteína estimuladora óssea, calcitonina, insulina, atriopeptina, fator de indução de cartilagem, elcatonina, fator ativador do tecido conjuntivo, inibidor da via do fator tecidual, hormônio estimulante folicular, hormônio, luteinizante, hormônio de liberação do hormônio luteinizante, fatores de crescimento nervoso (por exemplo, fator de crescimento nervoso, fator neurotrófico ciliar, fator de axogênese-1, peptídeo natriurético cerebral, fator neurotrófico, neuturina, etc.), hormônio paratireóide, relaxina, secretina, somatomedina, fator de crescimento semelhante à insulina, hormônio adrenocortical, glucagon, colecistoquinina, polipeptídeo pancreático, peptídeo de liberação de gastrina, fator de liberação de corticotropina, hormônio estimulador tireóide, autotaxina, lactoferrina, receptores de mioestatina (por exemplo, TNFR(P75), TNFR(P55), receptor

de IL-1, receptor de VEGF, receptor do fator de ativação de células B, etc), antagonistas de receptores (por exemplo, IL1-Ra, etc.), antígenos de superfície celular (por exemplo, (e.g., CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69, etc.), anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, fragmentos de anticorpos, por exemplo, (e.g., scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ e Fd), e antígenos de vacina derivados de vírus. O polipeptídeo fisiologicamente ativo útil na presente invenção pode ser uma forma nativa, pode ser produzido por recombinação genética usando células procarióticas, tal como *E. coli*, ou células eucarióticas, como células de levedura, células de inseto e células animais, ou pode ser um derivado contendo uma ou mais mutações de aminoácidos, mas apresentando atividade biológica idêntica à da forma nativa.

Em uma concretização preferida da presente invenção, um fragmento da região Fc da imunoglobulina produzida usando o transformante HM11201 foi ligado à eritropoietina humana (EPO) usando polietileno glicol, formando assim um conjugado de proteína da região Fc da imunoglobulina – EPO-PEG. Verificou-se que esse conjugado de proteína apresenta meia-vida em soro prolongada quando comparado não apenas ao EPO nativo, mas também ao Aranesp (Amgen), conhecido como um EPO de segunda geração com meia-vida em soro aperfeiçoada. Assim, a região Fc da imunoglobulina livre do resíduo de metionina inicial, obtido a partir de corpos de inclusão usando uma região de dobradiça de acordo com a presente

invenção, pode ser usada para aperfeiçoar a meia-vida em soro e a atividade fisiológica do polipeptídeo fisiologicamente ativo ligado a ela, sem nenhum risco de indução de resposta imunológica.

5 Será possível entender melhor a presente invenção por meio dos exemplos a seguir, apresentados apenas para ilustrar a presente invenção, sem ter a intenção de limitá-la.

EXEMPLO 1: Construção do Vetor de Expressão da Região Fc da Imunoglobulina Humana IgG4, Expressão e Purificação da Região Fc da IgG4 e Análise da
10 Sequência N-Terminal

<1-1> Construção do vetor de expressão da região Fc da IgG4

Para clonar uma região Fc de cadeia pesada incluindo a região de dobradiça da imunoglobulina humana IgG4,
15 o RT-PCR foi realizado com o RNA de células sanguíneas humanas servindo como modelo, como segue. Em primeiro lugar, o RNA foi isolado de cerca de 6 ml de sangue usando um kit de sangue de RNA Quiamp (Quiagen), efetuando-se a amplificação gênica usando o RNA total como modelo com o
20 auxílio de um kit One-Step RT-PCR (Qiagen). Para amplificar genes contendo seqüências N-terminais diferentes, foram usados pares de oligonucleotídeos iniciadores representados pelas SEQ. ID. N^{os} 1 e 2, 3 e 2, 4 e 2, e 5 e 2. Para facilitar o procedimento de clonagem gênica subsequente, um sítio de reconhecimento Nde
25 I e o códon de iniciação ATG, necessários para a expressão protéica, foram introduzidos em 5' oligonucleotídeos de SEQ. ID.

Nº 1, 3, 4 e 5, e um sítio de reconhecimento BamHI contendo um códon de parada nos '3 oligonucleotídeos iniciadores de SEQ. ID. Nº 2. Os produtos da região Fc amplificada foram digeridos com Nde I e Hind III, e inseridos em um pET22b (Novagen) tratado com a mesma enzima de restrição, obtendo assim os respectivos plasmídeos recombinantes. Esses plasmídeos foram projetados para terem partes da seqüência total de aminoácidos Glu-Ser-Lis-Tir-Gli-Pro-Pro-Cis-Pro-Ser-Cis-Pro da região de dobradiça da IgG4, como segue.

10 O plasmídeo que continha um gene amplificado com as SEQ. ID. Nºs 1 e 2 foi chamado de pmSCPFC e foi ancorada a ele uma seqüência DNA que codifica para uma seqüência de aminoácidos N-terminal iniciando com Met-Ser-Cis-Pro, que foi determinada, pelo sequenciamento de bases, como tendo o SEQ. ID. Nº 6, que corresponde à seqüência de aminoácidos do SEQ. ID. Nº 7. O plasmídeo que continha um gene amplificado com as SEQ. ID. Nºs 3 e 2 foi chamado de pmPSCFC e foi ancorada a ele uma seqüência de DNA que codifica para uma seqüência de aminoácidos N-terminal iniciando com Met-Pro-Ser-Cis-Pro, que foi determinada, pelo sequenciamento de bases, como tendo o SEQ. ID. Nº 8, que corresponde à seqüência de aminoácidos do SEQ. ID. Nº 9. Um plasmídeo que continha um gene amplificado com as SEQ. ID. Nºs 4 e 2 foi chamado de pmCPSFC e foi ancorada a ele uma seqüência de DNA que codifica para uma seqüência de aminoácidos N-terminal iniciando com Met-Cis-Pro-Ser-Cis-Pro,

15

20

25

que foi determinada, pelo sequenciamento de bases, como tendo o SEQ. ID. N^o 10, que corresponde à seqüência de aminoácidos do SEQ. ID. N^o 11. Um plasmídeo que continha um gene amplificado com as SEQ. ID. N^{os} 5 e 2 foi chamado de pmCPFc e foi ancorada a ele uma seqüência de DNA que codifica para uma seqüência de aminoácidos N-terminal iniciando com Met-Cis-Pro, que foi determinada, pelo sequenciamento de bases, como tendo o SEQ. ID. N^o 12 correspondendo à seqüência de aminoácidos do SEQ. ID. N^o 13.

Os vetores de expressão foram transformados em *E. coli* BL21 (DE3) para preparar transformantes, respectivamente designados por BL21/pmSCPFc(HM11200), BL21/pmPSCFc(HM11201), BL21/pmCPSFc(HM11204) e BL21/pmCPFc(HM11205).

Os transformantes BL21/pmSCPFc(HM11200) e BL21/pmPSCFc(HM11201) foram depositados no Centro Coreano de Cultura de Microorganismos (KCCM) no dia 20 de junho de 2005, com os N^{os} de Acesso KCCM-10659P e KCCM-10660P, respectivamente, e os transformantes BL21/pmCPSFc(HM11204) e BL21/pmCPFc(HM11205) no KCCM no dia 28 de julho de 2005 com os N^{os} de Acesso KCCM-10665P e KCCM-10666P, respectivamente.

<1-2> Expressão e Purificação da Fc da IgG4

Como no caso da IgG4, os transformantes bacterianos preparados no Exemplo <1-1> foram inoculados nos respectivos fermentadores (Marubishi Company) e deixados

crescer, seguido pela determinação quanto a se eles expressaram fragmentos da região Fc da imunoglobulina.

Primeiramente, cada transformante foi cultivado em 100 ml do meio LB com agitação noturna, e inoculado em um fermentador para cultura em grande escala. O fermentador foi mantido a 28°C ou 35°C. Para impedir a conversão de um ambiente aeróbico para anaeróbico, as culturas foram aeradas com 20-vvm de ar e agitadas a 500 rpm. Para compensar os nutrientes insuficientes para o crescimento bacteriano durante a fermentação, as culturas foram suplementadas com glicose e extratos de levedura, de acordo com os estados de fermentação das bactérias. Quando as culturas atingiram um valor OD₆₀₀ de 80, um indutor, IPTG, foi adicionado às culturas para induzir a expressão protéica. As culturas foram adicionalmente cultivadas durante 40 a 45 horas para aumentar o valor OD a 600 nm a 100 a 120.

A expressão da Fc da imunoglobulina, a formação de corpos de inclusão e a formação de dímeros da Fc da Ig expressa nos transformantes de *E. coli* foram examinadas como segue. Para investigar a expressão intracelular geral das regiões Fc da imunoglobulina, partes das soluções fermentadas foram misturadas com volumes iguais de tampão de amostra protéica 2x e submetidas à eletroforese em um gel SDS-PAGE a 15% (Criterion Gel, Bio-Rad). Como resultado, observou-se a superexpressão da Fc da imunoglobulina em todos os transformantes produzidos. Em seguida, as células foram

rompidas usando um ultrasonicador (Misonix Company). O lisado celular assim obtido foi centrifugado para separar as substâncias solúveis em água das substâncias insolúveis em água. Verificou-se que a maioria das substâncias superexpressas existia
5 como corpos de inclusão, conforme medido por eletroforese em SDS-PAGE a 15%. Os corpos de inclusão foram submetidos ao seguinte processo de enovelamento com o objetivo de examinar a qual grau a Fc foi reenovelada e se, e a qual grau, as regiões Fc diméricas foram formadas. 10 g da solução fermentada foram
10 submetidos à ultrasonicação em 100 mL de um tampão de lise (10mM Tris, PH9,0, 1mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 0,2M NaCl) para romper as células. A centrifugação a 10.000 rpm durante 20 minutos dividiu o lisado celular em uma fração solúvel em água e uma fração insolúvel em água como um corpo de
15 inclusão. 2 g desse corpo de inclusão foram dissolvidos em uma mistura de 20 mL de 1M Tris (PH 9,0) e 20 mL de um tampão de solubilização (6M Guanidina, 50mM Tris) e deixados reagir enquanto foram moderadamente agitados a 4° durante 30 minutos. Seguindo o término da reação, a solução de corpos de inclusão foi
20 misturada durante a noite, com 10 volumes de um tampão de reenovelamento (2 M uréia, 50 mM Tris, 0,25 M Arginina, 3 mM cisteína, pH 9,0) com agitação moderada. A essa mistura, foi adicionado um tampão de amostra de proteínas livre de qualquer agente redutor, tal como DTT ou beta-mercaptoetanol, seguido
25 pela eletroforese em SDS-PAGE a 15% (Criterion Gel, Bio-Rad). As bandas de proteínas foram visualizadas com um corante, tal

como Coomassie Brilliant. A FIG. 1 é uma fotografia obtida de um gel no qual as proteínas reenoveladas a partir dos corpos de inclusão expressos pelo reformante HM11201 a 32°C (pista 1) e a 28°C (pista 2), por HM11200 a 28°C (pista 3) e a 32°C (pista 4),
5 por HM11204 a 28°C (pista 5) e a 32°C (pista 6), e por HM11205 a 32°C (pista 7) e a 28°C (pista 8) foram corridas na presença de um campo elétrico, junto com uma proteína Fc, como controle, purificado de *E. coli* de acordo com um método convencional (pista C). Como visto na Fig. 1, uma parte significativa das
10 proteínas totais é atribuída à proteína Fc, da qual grande parte existe em forma dimérica após ser reenovelada. Entretanto, as proteínas Fc diferem na razão de dímeros para monômeros de um transformante para outro, isto é, de acordo com a seqüência de aminoácidos N-terminal expressa pelo transformante. Por
15 exemplo, uma parte significativa das proteínas Fc de HM11201, que inicia com Met-Pro-Ser-Cis-Pro-CH₂-CH₃, existe na forma dimérica. Quase todas as proteínas Fc de HM11205, que iniciam com Met-Cis-Pro-CH₂-CH₃, existem como monômeros, mas não existem em formas diméricas. Acredita-se que isso se deva ao
20 fato de que a especificidade de processamento da aminopeptidase nas células hospedeiras de *E. coli* varia dependendo da seqüência N-terminal da Fc.

<1-3> Análise da seqüência N-terminal

Os fragmentos diméricos da região Fc
25 reenovelados dos corpos de inclusão são diferentes na seqüência de aminoácidos do tipo selvagem em razão da presença do

resíduo de metionina inicial. Com o intuito de determinar se o resíduo de metionina é processado pelas proteases de *E. coli*, as seqüências de aminoácidos N-terminais das proteínas foram analisadas pelo Basic Science Research Institute, Seoul, Coréia.

5 As amostras usadas na análise de seqüência de aminoácidos N-terminal foram preparadas como se segue.

Primeiramente, uma membrana PVDF (Bio-Rad) foi imersa em metanol durante cerca de 2 a 3 segundos para ativá-la, e foi umedecida suficientemente com um tampão de
10 bloqueio (170 mM glicina, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 SDS-page não reduzido, preparado no Exemplo <1-2>, f% metanol). As amostras de proteínas separadas em um geloram submetidas ao “blotting” em uma membrana PVDF durante cerca de uma hora usando um kit de blotting (Hoefer Semi-Dry Transfer unit,
15 Amersham). As proteínas transferidas para a membrana PVDF foram coradas com um corante protéico, Coomassie Blue R-250 (Amnesco), durante um momento (3-4 segundos) e lavadas com uma solução descolorante (água: ácido acético: metanol = 5:1:4). Em seguida, os fragmentos de membrana contendo proteínas
20 foram cortados com tesouras e submetidos à análise de seqüência N-terminal.

Como resultado, verificou-se que as proteínas da Fc da IgG4, incluindo uma região de dobradiça, possuem uma seqüência N-terminal de Glu-Ser-Lis-Tir-Gli-Pro-Pro-Cis Pro-
25 Ser-Cis-Pro-CH2-CH3. As seqüências de aminoácidos e as

seqüências N-terminais das proteínas expressas nos transformantes são apresentadas na Tabela 1 a seguir.

TABELA 1

Transformantes	Seqüências N-terminais	Resultados da análise de seqüências	
		Dímero	Monômero
HM11200	Met-Ser-Cis-Pro-CH2-	Ser-cis-Pro-CH2	Pro-CH2
HM11201	Met-Pro-Ser-cis-Pro-CH2-	Pro-Ser-cis-Pro-CH2	Pro-Ser-cis-Pro-CH2
HM11204	Met-cis-Pro-Ser-cis-Pro-CH2	Pro-Ser-cis-Pro-CH2	misturado
HM11205	Met-cis-Pro-CH2-CH3	-	Pro-CH2

Os dados da análise de sequenciamento de aminoácidos revelaram que os fragmentos Fc renovelados dos corpos de inclusão produzidos pelos transformantes de *E. coli* da presente invenção foram processados para terem uma seqüência N-terminal precisa, livre do resíduo de metionina inicial. O produto protéico que resta em uma forma monomérica, mesmo após o renovelamento, é destituído de resíduos de cisteína, e, portanto, não pode formar dímeros. Além disso, como se vê na FIG. 1, a parte do monômero nos fragmentos Fc renovelados difere de um transformante para outro, e não existe nenhum dímero em HM11205. Esses resultados indicam que a seqüência de aminoácidos do sítio N-terminal tem grande influência sobre o processamento do terminal N, fazendo com que uma proteína contendo uma seqüência N-terminal desejada possa ser obtida pela modulação da seqüência N-terminal. As proteínas, mesmo se

tiverem a mesma seqüência de aminoácidos, podem ser processadas de maneira diferente, dependendo das condições da cultura das células hospedeiras de *E. coli*, especialmente a temperatura de cultura, conforme revelado nos testes a seguir. O

5 HM11200, quando cultivado a baixas temperaturas (28°C a 32°C), expressou a proteína de fusão Fc em uma forma solubilizada na mesma quantidade que a forma do corpo de inclusão. A forma solubilizada da proteína de fusão Fx existia como um monômero livre da seqüência de aminoácidos N-terminal Met-Ser-Cis.

10 Assim, os presentes inventores reconheceram que uma proporção controlada dos fragmentos Fc imunoglobulina monomérica e dimérica podem ser obtidos modulando a seqüência de aminoácidos N-terminal da proteína de fusão Fc e a condição de cultura das células hospedeiras.

15 Para determinar quantitativamente a expressão das regiões Fc da imunoglobulina nos transformantes de *E. coli*, as regiões Fc da imunoglobulina da solução de reenovelamento foram purificadas usando uma coluna de afinidade com proteína A conhecida por ter forte afinidade com imunoglobulinas, como

20 segue.

Os corpos de inclusão coletados por centrifugação foram reenovelados, e então purificados por cromatografia em coluna. Após 5 ml de uma coluna de afinidade com proteína A (Pharmacia) terem sido equilibrados com PBS, os

25 lisados celulares foram carregados para a coluna a uma taxa de fluxo de 5 ml/min. As proteínas não ligadas foram removidas por

enxágüe com PBS, e as proteínas ligadas foram eluídas com 100 mM de citrato (pH 3,0). As frações coletadas foram dessalinizadas usando uma coluna de dessalinização HiPrep 26/10 (Pharmacia) com 10 mM de tampão Tris (pH 8,0). Em seguida, foi realizada cromatografia em coluna por troca de ânions secundária usando 50 ml de uma coluna Q HP 26/10 (Pharmacia). As regiões Fc primárias da imunoglobulina purificada recombinante foram carregadas na coluna Q-Sepharose HP 26/10 (pharmacia), e a coluna foi eluída com um gradiente linear (0 a 0,2 M NaCl) em 19 mM de tampão Tris (Ph 8,0), obtendo assim frações altamente puras. Após serem parcialmente purificadas usando a coluna de afinidade com proteína A, os níveis de expressão das regiões Fc da Ig recombinante foram determinados, sendo os resultados apresentados na Tabela 2 a seguir.

15

TABELA 2

Plasmídeos	Transformantes	Rendimentos de expressão após a Purificação com Proteína A
pmSCPFc	HM11200	5-6 g/L
pmPSCFc	HM11201	4-5 g/L
pmCPSFc	HM11204	4-5 g/L
pmCPFc	HM11205	3-4 g/L

EXEMPLO 2: Construção do Vetor de Expressão da Região Fc da Imunoglobulina Humana IgG1, Expressão e Purificação da Região Fc da IgG1 e Análise da Sequência N-Terminal

<2-1> Construção do vetor de expressão da região Fc da IgG1

Para clonar uma região Fc de cadeia pesada incluindo a região de dobradiça da imunoglobulina humana IgG1, a RT-PCR foi realizada da mesma forma que no Exemplo <1-1>. Para amplificar genes contendo diferentes de seqüências N-terminais, foram usados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores.

TABELA 3

Seqüência de Oligonucleotídeos Iniciadores 5'

10

Utilizados

	Seqüência de Oligonucleotídeos Iniciadores 5'
MEPK	5'GGA ATT CCA TAT GGA GCC CAA ATC TTG TGA CAA AAC TCA C 3'
MSCD	5'GGA ATT CCA TAT GTC TTG TGA CAA AAC TCA CAC ATG CCC 3'
MDKT	5'GGA ATT CCA TAT GGA CAA AAC TCA CAC ATG CCC ACC GTG C 3'
MCPA	5'GGG AAT TCC ATA TGT GCC CAG CAC CTG AAC TCC TGG GG
MPKS	5'GGG AAT TCC ATA TGC CCA AAT CTT GTG ACA AAA CTC AC
MCPP	5'GGG AAT TCC ATA TGT GCC CAC CGT GCC CAG CAC CTG AAC TCC
MPPC	5'GGA ATT CCA TAT GCC ACC GTG CCC AGC ACC TGA ACT CCT G 3'
MPCP	5'GGA ATT CCA TAT GCC GTG CCC AGC ACC TGA ACT CCT GGG G 3'

Quanto ao oligonucleotídeo iniciador 3', ele tinha a seqüência de 5'-CGC GGA TCC TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG GCT CTT C-3' e foi usado para a

amplificação de todos os genes contendo seqüências N-terminais diferentes. Para facilitar um procedimento de clonagem gênica subsequente, um sítio de reconhecimento Nde I foi introduzido em cada um dos oligonucleotídeos iniciadores 5', e um sítio de reconhecimento BamHI foi introduzido no oligonucleotídeo iniciador 3'. Os produtos da região Fc amplificados com pares dos oligonucleotídeos iniciadores foram inseridos em um vetor, obtendo assim respectivos plasmídeos recombinantes projetados para conterem partes da seqüência total de aminoácidos Glu-Pro-Lis-Ser-Cis-Asp-Lis-Tre-His-Tre-is-Pro-Pro-Cis-Pro da região de dobradiça da IgG1, como segue. O plasmídeo que continha um gene amplificado com o oligonucleotídeo iniciador MEPK foi chamado de pMEPKFc1, e foi ancorada a ele uma seqüência de DNA que codifica para o CH2 e CH3 da IgG1, iniciando com Met-Glu-Pro-Lis, que foi analisada, pelo sequenciamento de bases, como tendo o SEQ. ID. N^o 22 correspondendo à seqüência de aminoácidos do SEQ. ID. N^o 23. O plasmídeo que continha um gene amplificado com o oligonucleotídeo iniciador MSCD foi chamado de pMSCKFc1, e foi ancorada a ele uma seqüência de DNA que codifica para o CH2 e CH3 da IgG1, iniciando com Met-Ser-Cis-Asp, que foi analisada, pelo sequenciamento de bases, como tendo o SEQ. ID. N^o 24 correspondendo à seqüência de aminoácidos do SEQ. ID. N^o 25. Um plasmídeo que continha um gene amplificado com o oligonucleotídeo iniciador MDKT foi chamado de pMDKTFc1, e foi ancorada a ele uma seqüência de DNA que codifica para o CH2 e CH3 da IgG1, iniciando com

Met-Asp-Lis-Tre, que foi analisada, pelo sequenciamento de bases, como tendo o SEQ. ID. N^o 26 correspondendo à seqüência de aminoácidos do SEQ. ID. N^o 27. Um plasmídeo que continha um gene amplificado com o oligonucleotídeo iniciador MCPA foi chamado de pMCPAFc1, e foi ancorada a ele uma seqüência de DNA que codifica para o CH2 e CH3 da IgG1, iniciando com Met-Cis-Pro, que foi analisada, pelo sequenciamento de bases, como tendo o SEQ. ID. N^o 28 correspondendo à seqüência de aminoácidos do SEQ. ID. N^o 29. Um plasmídeo que continha um gene amplificado com o oligonucleotídeo iniciador MPKS foi chamado de pMPKSFc1, e foi ancorada a ele uma seqüência de DNA que codifica para o CH2 e CH3 da IgG1, iniciando com Met-Pro-Lis-Ser, que foi analisada, pelo sequenciamento de bases, como tendo o SEQ. ID. N^o 30 correspondendo à seqüência de aminoácidos do SEQ. ID. N^o 31. Um plasmídeo que continha um gene amplificado com o oligonucleotídeo iniciador MCPP foi chamado de pMCPPFc1, e foi ancorada a ele uma seqüência de DNA que codifica para o CH2 e CH3 da IgG1, iniciando com Met-Cis-Pro-Pro, que foi analisada, pelo sequenciamento de bases, como tendo o SEQ. ID. N^o 32 correspondendo à seqüência de aminoácidos do SEQ. ID. N^o 33. Um plasmídeo que continha um gene amplificado com o oligonucleotídeo iniciador MPPC foi chamado de pMPPCFc, e foi ancorada a ele uma seqüência de DNA que codifica para o CH2 e CH3 da IgG1, iniciando com Met-Pro-Pro-Cis, que foi analisada, pelo sequenciamento de bases, como tendo o SEQ. ID. N^o 34 correspondendo à seqüência

de aminoácidos do SEQ. ID. N^o 35. Um plasmídeo que continha um gene amplificado com o oligonucleotídeo iniciador MPCP foi chamado de pMPCPFc, e foi ancorada a ele uma seqüência de DNA que codifica para o CH2 e CH3 da IgG1, iniciando com
5 Met-Pro-Cis-Pro, que foi analisada, pelo sequenciamento de bases, como tendo o SEQ. ID. N^o 36 correspondendo à seqüência de aminoácidos do SEQ. ID. N^o 37. Os vetores de expressão foram transformados em *E. coli* BL21 (DE3) para preparar transformantes, respectivamente designados como
10 BL21/pMEPKFc1(HM11206), BL21/pMSCDFc1(HM11207), BL21/pMDKTFc1(HM11208), BL21/pMCPAFc1(HM11209) BL21/pMPKSFc1(HM11210), BL21/pMCPPFc1(HM11211), BL21/pMPPCFc1(HM11212) e BL21/pMPCPFc1(HM11213).

Expressão e purificação da Fc da IgG1

15 Como no caso da IgG4, os transformantes bacterianos preparados no Exemplo <2-1> foram inoculados nos respectivos fermentadores (Marubishi Company) e deixados crescer, seguido pela determinação quanto a se eles expressaram fragmentos da região Fc da imunoglobulina.

20 Primeiramente, cada transformante foi cultivado em 100 ml do meio LB com agitação noturna, e inoculado no fermentador para cultura em grande escala. O fermentador foi mantido a 28oC ou 35oC. Para impedir a conversão de um ambiente aeróbico para anaeróbico, as culturas foram aeradas com
25 20-vvm de ar e agitadas a 500 rpm. Para compensar os nutrientes insuficientes para o crescimento bacteriano durante a

fermentação, as culturas foram suplementadas com glicose e extratos de levedura, de acordo com os estados de fermentação das bactérias. Quando as culturas atingiram um valor OD₆₀₀ de 80, um indutor, IPTG, foi adicionado às culturas para induzir a expressão protéica. As culturas foram adicionalmente cultivadas durante 40 a 45 horas para aumentar o valor OD a 600 nm a 100 a 120.

A expressão da Fc da imunoglobulina, a formação de corpos de inclusão e a formação de dímeros da Fc Ig expressa nos transformantes de *E. coli* foram examinadas como segue. Para investigar a expressão intracelular geral das regiões Fc da imunoglobulina, as soluções fermentadas foram divididas em alíquotas antes e após a indução.

Partes das soluções fermentadas foram misturadas com volumes iguais de tampão de amostra de proteínas 2x e submetidas à eletroforese em um gel SDS-PAGE a 15% (Criterion Gel, Bio-Rad) sob as seguintes condições de redução. Os resultados da eletroforese são apresentados na FIG. 7. Um controle da Fc da IgG4 foi corrido na pista 1, ao passo que os níveis de expressão do transformante HM11208 de acordo com o tempo são apresentados nas pistas 2 a 4 e os níveis de expressão do transformante HM 11206 de acordo com o tempo são apresentados nas pistas 5 a 7. Os níveis de expressão nos transformantes HM11207, HM11212, HM11209, HM11210, HM11213 e HM11211 são apresentados nas pistas 8 a 13, respectivamente. Como visto na FIG. 7, uma banda única de 30

kDa (região Fc), que não foi observada antes da indução com IPTG, apareceu muito claramente em todas as amostras submetidas à indução com IPTG, indicando que as regiões Fc da IgG1 recombinante foram expressas, em contraste ao controle 5 G4Fc. Além disso, as regiões Fc foram superexpressas, totalizando até pelo menos 30% da quantidade total de proteínas expressas.

Para determinar quantitativamente a expressão das regiões Fc da imunoglobulina nos transformantes de *E. coli*, 10 as regiões Fc da imunoglobulina da solução de reenovelamento foram purificadas usando uma coluna de afinidade com proteína A conhecida por ter forte afinidade com imunoglobulinas, da mesma forma que a utilizada para a Fc da IgG4.

Dos transformantes, o transformante de 15 plasmídeo pMSCDFc foi medido como o que tinha a maior taxa de expressão, equivalente a tanto quanto 340 mg por 10 g de corpo de inclusão, ao passo que os transformantes pMDKTFc, pMEPKFc, pMPPCFc e pMPCPFc apresentaram taxas de expressão de 133,3 mg, 139 mg, 110 mg e 120 mg, 20 respectivamente.

O conteúdo da Fc dimérica da IgG1 nos produtos expressos foi medido da mesma forma que a utilizada para o conteúdo da Fc dimérica da IgG4. As células das soluções de fermentação foram rompidas usando um ultrasonicador 25 (Misonix Company). O lisado celular assim obtido foi centrifugado para separar as substâncias solúveis em água das

substâncias insolúveis em água. Verificou-se que a maioria das substâncias superexpressas existia como corpos de inclusão, conforme medido por eletroforese em SDS-PAGE a 15%. Os corpos de inclusão foram renovelados com o objetivo de
5 examinar a qual grau a Fc foi renovelada e se, e a qual grau, as regiões Fc diméricas foram formadas. As proteínas renoveladas da Fc foram purificadas usando uma coluna de afinidade com proteína A e misturadas com um tampão de amostra de proteínas livre de agentes redutores, tal como DTT ou beta-mercaptoetanol,
10 seguido pela eletroforese em SDS-PAGE a 15% (Criterion Gel, Bio-Rad). As bandas de proteínas foram visualizadas com um corante, tal como Coomassie Brilliant.

A FIG. 8 é uma fotografia tirada de um gel no qual isolados em coluna de proteína A das proteínas renoveladas
15 a partir dos corpos de inclusão expressos pelo reformante HM11208 (pista 1), pelo reformante HM11206 (pista 2), pelo reformante HM11207 (pista 4), pelo reformante HM11212 (pista 5) e pelo reformante HM11213 (pista 7) foram corridos na presença de um campo elétrico sob uma condição sem redução,
20 junto com uma proteína Fc da IgG4 usada como controle (pistas 3, 6 e 8). Conforme apresentado na FIG. 8, verificou-se que todos os fragmentos Fc da IgG1 usados no teste formaram dímeros, apesar de a quantidade deles ter divergido até certo ponto.

<2-3> Análise da seqüência N-terminal

25 Como reconhecido no caso da Fc da IgG4, a seqüência de aminoácidos N-terminal determinou o

processamento pós-translacional quanto a se o resíduo de metionina inicial restou ou se o resíduo de metionina inicial foi processado precisamente, ou junto com outros resíduos de aminoácidos para obter seqüências de aminoácidos diferentes da desejada. Com o intuito de determinar se o resíduo de metionina foi processado pelas proteases de *E. coli*, as diferentes seqüências de aminoácidos N-terminais das regiões Fc da IgG1 foram analisadas pelo Basic Science Research Institute, Seoul, Coréia. Os resultados da análise apresentam-se de maneira resumida na Tabela 4 a seguir.

TABELA 4

Transformantes	Resultados do Sequenciamento N-Terminal (Dímeros)
HM11208	Met
HM11206	Met
HM11207	Ser
HM11212	Pro
HM11213	Pro

Como visto na Tabela 4, o resíduo de metionina inicial permanece não processado nos transformantes de HM11208 e HM11206, em que as regiões Fc da IgG1 foram superexpressas em formas diméricas enquanto que os produtos fermentados de HM11207, HM11212 e HM11213 não tiveram resíduos de metionina inicial como resultado do processamento pós-translacional preciso.

Juntos, os dados obtidos pelos experimentos mencionados acima indicam que quando uma região Fc da IgG1 é expressa em *E. coli*, a sua seqüência N-terminal determina a

expressão, o nível de expressão, a proporção de dímeros e seu processamento N-terminal, e que as regiões Fc livres dos resíduos de metionina inicial podem ser produzidas em grande escala beneficiando-se da seqüência N-terminal. As regiões Fc da IgG1
 5 obtidas de acordo com a presente invenção podem ser usadas para aperfeiçoar a meia-vida em soro e a atividade fisiológica do polipeptídeo fisiologicamente ativo ligado a elas sem indução de resposta imunológica devido à adição de resíduos de aminoácidos exógenos.

10 **EXEMPLO 3: Construção do Vetor de Expressão da Região Fc da Imunoglobulina Humana IgG2**

<3-1> Construção do vetor de expressão da região Fc da IgG2

Para clonar uma região Fc de cadeia pesada
 15 incluindo a região de dobradiça da IgG2, a RT-PCR foi realizada da mesma forma que na região Fc da IgG4. Para amplificar genes contendo diferentes de seqüências N-terminais, foram usados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores.

TABELA 5

	Seqüências de Oligonucleotídeos Iniciadores 5'
G2MPP CSS	5' GGG AAT TCC ATA TGC CAC CGT GCC CAG CAC CAC CTG TGG CAG G 3'
G2MPC PSS	5' GGG AAT TCC ATA TGC CGT GCC CAG CAC CAC CTG TGG CAG GAC 3'
G2MCP SS	5' GGG AAT TCC ATA TGT GCC CAG CAC CAC CTG TGG CAG GAC 3'
G2MC CVSS	5' GGG AAT TCC ATA TGT GTT GTG TCG AGT GCC CAC CGT GCC CAG C 3'

G2MC	5' GGG AAT TCC ATA TGT GTG TCG AGT GCC
VESS	CAC CGT GCC CAG CAC C 3'

O oligonucleotídeo iniciador 3' ele tinha a seqüência de 5'-CGC GGA TCC TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG GCT CTT C-3' e foi usado para a amplificação de todos os genes contendo seqüências N-terminais diferentes.

5 Para facilitar um procedimento de clonagem gênica subsequente, um sítio de reconhecimento Nde I foi introduzido em cada um dos oligonucleotídeos iniciadores 5', e um sítio de reconhecimento BamHI foi introduzido no oligonucleotídeo iniciador 3'. Os produtos da região Fc amplificados com pares dos

10 oligonucleotídeos iniciadores foram inseridos em um vetor, obtendo assim respectivos plasmídeos recombinantes projetados para conterem partes da seqüência total de aminoácidos Glu-Arg-Lis-Cis-Cis-Val-Glu-Cis-Pro-Pro-Cis-Pro da região de dobradiça da IgG1, como segue. O plasmídeo que continha um gene

15 amplificado com o oligonucleotídeo iniciador G2MPPCSS foi chamado de pmPPCG2Fc, e a ele foi ancorada uma seqüência de DNA que codifica para o CH2 e CH3 da IgG2, iniciando com Met-Pro-Pro-Cis, que foi analisada, pelo sequenciamento de bases, como tendo o SEQ. ID. N^o 38 correspondendo à seqüência

20 de aminoácidos do SEQ. ID. N^o 39. O plasmídeo que continha um gene amplificado com o oligonucleotídeo iniciador G2MPCPSS foi chamado de pmPCPG2Fc, e a ele foi ancorada uma seqüência de DNA que codifica para o CH2 e CH3 da IgG2, iniciando com Met-Pro-Cis-Pro, que foi analisada, pelo

sequenciamento de bases, como tendo o SEQ. ID. N^o 40 correspondendo à seqüência de aminoácidos do SEQ. ID. N^o 41. O plasmídeo que continha um gene amplificado com o oligonucleotídeo iniciador G2MCPSS foi chamado de pmCPG2Fc, e a ele foi ancorada uma seqüência de DNA que codifica para o CH2 e CH3 da IgG2, iniciando com Met-Cis-Pro, que foi analisada, pelo sequenciamento de bases, como tendo o SEQ. ID. N^o 42 correspondendo à seqüência de aminoácidos do SEQ. ID. N^o 43. Um plasmídeo que continha um gene amplificado com o oligonucleotídeo iniciador G2MCCVSS foi chamado de pmCCVG2Fc, e foi ancorada a ele uma seqüência de DNA que codifica para o CH2 e CH3 da IgG2, iniciando com Met-Cis-Cis-Val-Glu-Cis-Pro-Pro-Cis-Pro, que foi analisada, pelo sequenciamento de bases, como tendo o SEQ. ID. N^o 44 correspondendo à seqüência de aminoácidos do SEQ. ID. N^o 45. Um plasmídeo que continha um gene amplificado com o oligonucleotídeo iniciador G2MCVESS foi chamado de pmCVEG2Fc, e foi ancorada a ele uma seqüência de DNA que codifica para o CH2 e CH3 da IgG2, iniciando com Met-Cis-Val-Glu-Cis-Pro-Pro-Cis-Pro, que foi analisada, pelo sequenciamento de bases, como tendo o SEQ. ID. N^o 46 correspondendo à seqüência de aminoácidos do SEQ. ID. N^o 47. Os vetores de expressão foram transformados em *E. coli* BL21 (DE3) para preparar transformantes, respectivamente designados como BL21/pmPPCPG2Fc (HM11206), BL21/pmPCPG2Fc

(HM11207), BL21/pmCPG2Fc (HM11216), BL21/pmCCVG2Fc (HM11217) e BL21/pmCVEG2Fc (HM11218).

<3-2> Expressão, Purificação e Análise da Sequência N-terminal da Fc da IgG2

5 Como no caso da IgG4, os transformantes bacterianos preparados no Exemplo <3-1> foram inoculados nos respectivos fermentadores (Marubishi Company) e deixados crescer, seguido pela determinação quanto a se eles expressaram fragmentos da região Fc da imunoglobulina. As condições da
10 cultura não foram significativamente diferentes das apresentadas para a Fc da IgG4. Verificou-se que os fragmentos da região Fc da IgG2 foram superexpressos sob várias condições, inclusive temperatura, composição do meio, concentração do indutor, etc., conforme medido por SDS-PAGE em uma condição de redução.
15 A FIG. 9 mostra o resultado de um SDS-PAGE a 15% das soluções de fermentação misturadas com volumes iguais de tampão de amostra de proteínas 2x. Um fragmento Fc da IgG4 foi usado como controle na pista 1, ao passo que os fragmentos expressos pelo HM11214, HM11215, HM11216, HM11217 e
20 HM11218 foram corridos nas pistas 2 a 6, respectivamente. Como visto na FIG. 9, todos os cinco transformantes usados no experimento superexpressaram os fragmentos Fc.

O conteúdo da Fc dimérica da IgG4 nos produtos expressos foi medido da mesma forma que descrito
25 acima. As células das soluções de fermentação foram rompidas e as substâncias insolúveis em água do lisado celular foram

reenoveladas, após o que apenas os fragmentos da região Fc foram purificados usando uma coluna de afinidade com proteína A. Os produtos de expressão purificados foram misturados com um tampão de amostra de proteínas livre de agentes redutores, tal como DTT ou beta-mercaptoetanol, e separados em SDS-PAGE a 15% (Criterion Gel, Bio-Rad). As bandas de proteínas foram visualizadas com um corante, tal como Coomassie Brilliant. A FIG. 10 ilustra o resultado da eletroforese. Um fragmento Fc da IgG4 foi usado como controle nas pistas 1 e 7, ao passo que dímeros do fragmento de HM11215, HM11216, HM11217 e HM11218 foram observados nas pistas 2 a 6. Conforme interpretado pelos dados da FIG. 10, todos os produtos de expressão dos transformantes, apesar de diferentes uns dos outros com respeito à seqüência N-terminal ou à condição de expressão, podem formar dímeros.

Com o intuito de examinar se o resíduo de metionina foi processado pelas proteases de *E. coli*, diferentes seqüências de aminoácidos N-terminais das regiões Fc diméricas da IgG4 foram analisadas pelo Basic Science Research Institute, Seoul, Coréia. O resíduo de metionina inicial foi removido dos produtos dos transformantes HM11214 e HM11215, ambos os quais possuem um resíduo de prolina na posição 2.

Conforme evidenciado nesses experimentos, as regiões Fc da IgG2 podem ser expressas em grande escala no *E. coli*. Além disso, os dados obtidos nos experimentos mencionados acima indicam que a seqüência N-terminal de uma

região Fc da IgG1 determina a expressão, o nível de expressão, a proporção de dímeros e seu processamento N-terminal, e que as regiões Fc livres dos resíduos de metionina inicial podem ser produzidas em grande escala beneficiando-se da seqüência N-terminal. As regiões Fc da IgG1 obtidas de acordo com a presente invenção podem ser usadas para aperfeiçoar a meia-vida em soro e a atividade fisiológica do polipeptídeo fisiologicamente ativo ligado a elas sem indução de resposta imunológica devido à adição de resíduos de aminoácidos exógenos.

10 EXEMPLO 4: Ensaio de Ligação ao C1q usando ELISA

Para determinar se os derivados preparados no Exemplo <1-2> e as proteínas correspondendo às regiões Fc das imunoglobulinas, expressas nos transformantes de *E. coli* e purificadas, ligam-se ao C1q humano, efetuou-se um imunoensaio enzimático (ELISA) como se segue. Como grupos de teste, foram usadas as regiões Fc da imunoglobulina produzidas pelos transformantes HM11200 e HM11201 preparados nos Exemplos anteriores. Como padrão, utilizou-se uma imunoglobulina glicosilada (IVIGG-globulina S, Green Cross PBM) As amostras teste e padrão foram preparadas em 10 mM de tampão carbonato (pH 9,6) a uma concentração de 1 µg/ml. As amostras foram divididas em alíquotas em uma placa de 96 poços (Nunc) em uma quantidade de 200 ng por poço, e a placa foi revestida durante a noite a 4°C. Em seguida, cada poço foi lavado com PBS-T (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.05%

Tween 20) três vezes, bloqueado com 250 µl de um tampão de bloqueio (1% de soroalbumina bovina em PBS-T) à temperatura ambiente durante 1 hora, e lavado novamente com o mesmo PBS-T três vezes. As amostras padrão e teste foram diluídas em PBS-T até uma concentração predeterminada e adicionadas a poços revestidos com anticorpos, e a chapa foi incubada à temperatura ambiente durante 1 hora e lavada com PBS-T três vezes. Em seguida, foram adicionados 2 (g/ml C1q (R&D Systems) à placa, reagidos à temperatura ambiente durante 2 horas, em seguida lavando a placa com PBS-T seis vezes. Foram adicionados 200 µl de uma diluição 1:1000 de conjugado de peroxidase-anticorpo humano anti-C1q humano (Biogenesis, USA) no tampão de bloqueio a cada poço, deixando reagir à temperatura ambiente por 1 hora. Após cada poço ter sido lavado com PBS-T três vezes, foram misturados volumes iguais de reagentes coloridos A e B (Cor A: peróxido estabilizado e Cor B: cromogênio estabilizado; DY 999, R&D Systems), e 200 µl da mistura foram adicionados a cada poço, seguido por incubação durante 30 minutos. Em seguida, adicionaram-se 50 µl de uma solução de término de reação e 2 M de ácido sulfúrico a cada poço. A placa foi lida usando um leitor de microplacas (Molecular Device). A absorvância das amostras padrão e teste foi medida em 450 nm, sendo os resultados apresentados na FIG. 2.

Conforme ilustrado na FIG. 2, as proteínas da região Fc da imunoglobulina produzidas em *E. coli* de acordo

com a presente invenção apresentaram afinidade de ligação notoriamente reduzidas com C1q. Esses resultados indicam que as proteínas da região Fc da imunoglobulina da presente invenção raramente correm o risco de induzir respostas imunológicas, tal como citotoxicidade e inflamação no corpo, quando usadas como um veículo para polipeptídeos fisiologicamente ativos em uma forma conjugada.

EXEMPLO 5: Ensaio para ligação com Fc γ RI, Fc γ RIII e FcRn $\alpha\beta_2$ usando ELISA

A Fc da imunoglobulina é conhecida por ligar os receptores de hematócitos a Fc γ RI e Fc γ RIII para mediar funções efetoras, como a citotoxicidade dependente de anticorpos. Para determinar se a Fc da imunoglobulina produzida no *E. coli* media tais funções efetoras, cada um dos receptores foi obtido e examinado em relação à capacidade de ligação pelo ELISA. Além disso, a Fc da imunoglobulina foi examinada em relação à ligação ao receptor FcRn, que é conhecido por ter influência sobre o metabolismo *in vivo* da imunoglobulina, da mesma forma.

<5-1> Construção das Linhagens de Expressão Fc γ RI, Fc γ RIII e FcRn $\alpha\beta_2$ humanas

O RNA total foi isolado das células mononucleares de sangue periférico humano usando um kit (Qiagen, Cat. No. ???) e foi usado para “pescar” genes que codificam os domínios de ligação ao ligante extracelular da Fc γ RI, Fc γ RIII e FcRn $\alpha\beta_2$ humana por meio da RT-PCR e PCT. Os genes foram fusionados a um gene GST (Glutathione S-

transferase) e clonados em respectivos vetores de expressão de células de mamíferos, ancorando a ele um gene deidrofolato-reductase. O plasma pHM000 recombinante assim preparado foi transfetado para células CHO. Nesse aspecto, as células CHO foram inoculadas, numa contagem de 1×10^6 células por 6 cm da cápsula de cultura, incubadas a 37°C ou 24 horas em uma incubadora de CO_2 a 5%, e lavadas duas vezes com Opti-MEM (Gibco., Cat. no. 31985-070). 1 ml do Opti-MEM contendo 10 μg de pHM000 foi misturado com 1ml do reagente LipofectaminaTM (Invitrogen, Cat. no. 18324-020). Após ser deixada em repouso por 20 minutos, a mistura resultante foi adicionada às células CHO preparadas. Essas células foram incubadas a 37°C durante 18 horas em uma incubadora de CO_2 a 5% e revigoradas com DMEM/F12, suplementadas com soro feral bovino a 10% e penicilina-estreptomicina a 1%, antes da incubação durante 48 horas adicionais. De modo a selecionar as linhagens transformadas, as células foram tratadas com 0,5% de tripsina (Gibco., Cat. N^o 15400-054) no meio de seleção α -MEM (Welgene, Cat. N^o LM008-02), que incluía soro fetal bovino dializado a 10%, penicilina-estreptomicina a 1% e 800ug/ml de geneticina (Mediatech, Cat. No. 61-234RG), seguido por centrifugação. As células assim transformadas foram transferidas para uma cápsula de cultura T25 (Nunc) e cultivadas a 37°C em uma incubadora de CO_2 a 5% até 90% de confluência ou mais. A fim de determinar os níveis de expressão de Fc γ RI, Fc γ RIII e FcRn $\alpha\beta_2$, as linhagens selecionadas foram incubadas a 37°C em uma incubadora

com CO₂ a 5% com concentrações crescentes de MTX (Sigma, Cat. No. M-8407) de 20 nM, com um incremento de 20 nM a cada duas semanas.

<5-2> Produção e Purificação da FcγRI, FcγRIII
5 e FcRnαβ₂ humana

FcγRI, FcγRIII and FcRnαβ₂ were purified as follows. As linhagens celulares selecionadas foram inoculadas em Cell Factory (Nunc, Cat. no. 170009) a uma contagem de 3,5x10⁸ células por fábrica e cultivadas a 37°C durante 38 horas
10 em uma incubadora de CO₂ a 5%, e depois lavadas duas vezes com 1 litro de PBS por fábrica. As células foram suplementadas com 1 litro do meio de produção CHO-A-SFM contendo 0,3 mM de butirato de sódio (Sigma, Cat. No. B-5887) e cultivadas a 33°C em uma incubadora de CO₂ a 5%, durante o que o sobrenadante
15 da expressão foi recuperado dia sim, dia não, no total de 7 dias. O sobrenadante coletado foi centrifugado, filtrado por meio de um sistema de filtração de 0,22 μm (Corning), concentrado usando um sistema de concentração (PALL, Cat. no. PN OS010C70) e carregado em uma resina FF de sefarose quelante FF (Amersham
20 pharmacia, Cat. no. 17-0575-02) carregada com 0,1M de sulfeto de níquel (Sigma, Cat. No. N4887), de modo que os GST de FcγRI, FcγRIII, e FcRnαβ₂ fossem ligados ao níquel. FcγRI, FcγRIII, e FcRnαβ₂ ligados foram separados e purificados da coluna usando 50mM de NaPi (pH 8,0), 300 mM de NaCl e 230
25 mM de imidazol.

<5-3> Ensaio para ligação a FcγRI

O Fc γ RI purificado no Exemplo <5-2> foi diluído até uma concentração de 0,75 μ g/ml em PBS (pH 7,4), dividido em alíquotas em uma placa de 96 poços (Nunc, Maxisorp) a uma quantidade de 100 μ l por poço, e incubado
5 durante 18 horas a 4°C de modo que o receptor fosse ligado ao fundo da placa de 96 poços. Cada poço da placa de 96 poços foi lavado três vezes com 300 μ l de um tampão de lavagem PBS (pH 7,4) contendo 0,05% de Tween-20 (Amresco, Cat. No. 0777).

Depois, 300 μ l do PBS (pH 7,4) contendo 0,1%
10 de Tween-20 e 3% de BSA (soroalbumina bovina, Amresco, Cat. No. 0332) foram adicionados a cada poço de modo a impedir a ligação indesejada de outras substâncias ao fundo do poço, e foram incubados a 37°C durante 1 hora, após o que a solução de reação foi totalmente removida. Com a IgG do soro humano e a
15 Fc separados pelo tratamento da IgG do soro humano com papaína servindo como controles, HM11200 e o produto HM11201 purificados no Exemplo 2 foram diluídos até uma concentração de 9 μ g/ml nos respectivos tampões de ensaio, seguido pela repetição de uma diluição 1:3 em série com o
20 tampão de ensaio sete vezes.

100 μ l da diluição foram colocados em cada poço de uma placa de 96 poços e deixados reagir a 25°C durante 2 horas com agitação a uma velocidade constante, em seguida lavando os poços seis vezes com um tampão de lavagem. Para
25 examinar se o HM11200, o produto de HM11201 e os controles, todos os quais estavam ancorados ao fundo da placa de poços,

estavam ligados a Fc γ RI, uma diluição de 1:100000 de um anticorpo de cadeia pesada anti-humano de cabra conjugado com HRP (Chemicon, AP309P) em um tampão de ensaio foi colocado a um volume de 100 μ l em cada poço e deixada reagir a 25°C durante 2 horas com agitação a uma velocidade constante. Após lavar seis vezes com um tampão de lavagem, 100 (l de um substrato (BD bioscience, Cat. No. 555214), capaz de reagir com o HRP conjugado com o anticorpo, foram colocados em cada poço e reagidos a 25°C durante 20 minutos. A reação foi terminada com ácido sulfúrico 2N e a intensidade da cor foi medida com um leitor ELISA (Molecular Devices, leitor de microplacas) a 450 nm. Como visto na FIG. 3, praticamente nenhuma das proteínas Fc produzidas no E. coli se ligou ao Fc γ RI, ao passo que a IgG e a Fc, ambas glicosiladas, se associaram fortemente ao Fc γ RI.

<5-4> Ensaio para ligação ao Fc γ RIII

Com a IgG do soro humano e a Fc separadas pelo tratamento da IgG do soro humano, com papaína servindo como controles, o HM11200 e o produto de HM11201 purificados no exemplo <1-2> foram diluídos até uma concentração de 9 μ g/ml no respectivo tampão carbonato (pH 9,0), seguido pela repetição de uma diluição em série de 1:3 com o tampão carbonato sete vezes.

100 (l da diluição foram colocados em cada poço de uma placa de 96 poços e incubados a 40°C durante 18 horas, de modo que eles fossem ligados ao fundo da placa de 96

poços. Cada poço da placa de 96 poços foi lavado três vezes com 300 (l de um tampão de lavagem consistindo de PBS (pH 7,4) contendo 0,05% de Tween-20 (Amresco, Cat. No. 0777). Em seguida, 300 (l de um tampão de ensaio consistindo de PBS (pH 7,4) contendo 0,1% de Tween-20 e 5% de leite desnatado em pó (Difco, Cat. No. 232100) foram adicionados a cada poço para impedir a ligação indesejada de outras substâncias ao fundo do poço, e foram incubados a 37°C durante 1 hora, seguido pela remoção completa da solução de reação. O FcγRIII purificado no Exemplo <4-2> foi diluído até uma concentração 1 (g/ml na solução de ensaio. 100 μl da diluição foram colocados em cada poço de uma placa de 96 poços e deixados reagir a 25°C durante 2 horas, com agitação a uma velocidade constante. Os poços foram lavados seis vezes com um tampão de lavagem. Um anticorpo anti-GST de coelho (Chemicon, AB3282), que foi capaz de se ligar ao GST (glutathione S-transferase) do FcγRIII associado ao HM11200, ao produto de HM11201 e aos controles, foi diluído em 1:10000 no tampão de ensaio, e 100 μl da diluição foram colocados em cada poço e deixados reagir a 25°C durante 21 horas com agitação a uma velocidade constante. Subseqüentemente, após lavar os poços seis vezes com um tampão de lavagem 100 μl de uma diluição de 1:7500 do anticorpo com o anticorpo de coelho no tampão de ensaio foram colocados em cada poço.

Após a reação a 25°C durante 2 horas com agitação a uma velocidade constante, a placa de 96 poços foi

lavada seis vezes com um tampão de lavagem. Um substrato foi adicionado da mesma forma que no Exemplo <5-3> e a intensidade da cor foi medida com um leitor ELISA. Como visto na FIG. 4, praticamente nenhuma das proteínas Fc γ RIII produzidas no *E. coli* se ligou ao Fc γ RI, ao passo que a IgG e a Fc, ambas glicosiladas, se associaram fortemente ao Fc γ RIII.

<5-5> Ensaio para ligação ao FcR $\alpha\beta$ 2

Com a IgG do soro humano e a Fc separadas pelo tratamento da IgG do soro humano com papaína servindo como controles, HM11200 e o produto de HM11201 purificado no Exemplo <1-2> foram diluídos até uma concentração de 20 μ g/ml no respectivo tampão carbonato (pH 9,0), seguido pela repetição de uma diluição em série de 1:3 com o tampão carbonato sete vezes.

100 μ l da diluição foram colocados em cada poço de uma placa de 96 poços e incubados a 4°C durante 18 horas, de modo que eles fossem ligados ao fundo da placa de 96 poços. Cada poço da placa de 96 poços foi lavado três vezes com 300 μ l de um tampão de lavagem consistindo de PBS (pH 7,4) contendo 0,05% de Tween-20 (Amresco, Cat. No. 0777). Em seguida, 300 μ l de um tampão de ensaio consistindo de PBS (pH 7,4) contendo 0,1% de Tween-20 e 0,5% de BSA (Amresco, Cat. No. 0332) foram adicionados a cada poço para impedir a ligação indesejada de outras substâncias ao fundo do poço, e foram incubados a 37°C durante 1 hora, seguido pela remoção completa

da solução de reação. O FcRn $\alpha\beta_2$ purificado no Exemplo <5-2> foi diluído até uma concentração 3 (g/ml na solução de ensaio. 100 (1 da diluição foram colocados em cada poço de uma placa de 96 poços e deixados reagir a 25oC durante 2 horas, com agitação a uma velocidade constante. Os poços foram lavados seis vezes com o tampão de lavagem. Um anticorpo anti-GST de coelho (Chemicon, AB3282), que foi capaz de se ligar ao GST (glutathiona S-transferase) do FcRn $\alpha\beta_2$ associado ao HM11200, ao produto de HM11201 e aos controles, foi diluído em 1:10000 no tampão de ensaio, e 100 (1 da diluição foram colocados em cada poço e deixados reagir a 25oC durante 21 horas com agitação a uma velocidade constante. Subseqüentemente, após lavar os poços seis vezes com um tampão de lavagem, 100 (1 de uma diluição de 1:7500 do anticorpo com o anticorpo de coelho no tampão de ensaio foram colocados em cada poço.

Após a reação a 25oC durante 2 horas com agitação a uma velocidade constante, a placa de 96 poços foi lavada seis vezes com um tampão de lavagem. Um substrato foi adicionado da mesma forma que no Exemplo 5-3 e a intensidade da cor foi medida com um leitor ELISA. Assim como a IgG e a Fc glicosilada, como visto na FIG. 5, as proteínas da Fc produzidas no E. coli se ligaram fortemente ao FcRn $\alpha\beta_2$.

EXEMPLO 6: Preparação e Análise Farmacocinética do Conjugado de EPO humana

25

<6-1> Preparação da EPO humana

Para preparar um conjugado de EPO humana (eritropoietina), primeiro um gene da EPO foi amplificado por RT-PCR usando o RNA total isolado das células sanguíneas e clonado em um vetor pBluscript II (Stratagen), gerando assim um
5 vetor pBlueEP. Para transferir o gene EPO clonado para um vetor de expressão de célula animal pCMV/dhfr-(pCDNA3.1 (Invitrogen Company) contendo um gene dhfr), o pBlueEP foi digerido com HindIII e BamHI, e o fragmento contendo o gene EPO assim obtido foi inserido no vetor de expressão da célula
10 animal tratado com as mesmas enzimas de restrição, obtendo assim o pcmvEP. Esse vetor de expressão carregando um gene EPO foi transfectado para células CHO, uma linhagem de expressão protéica, usando um reagente de Lipofectamina (Gibco). As células foram tratadas com concentrações
15 gradativamente crescentes de MTX até 120 nM para elevar seus níveis de expressão. A EPO foi expressa em níveis altos, maiores do que 100 mg por litro.

<6-2> Preparação do complexo EPO-PEG humano

20 ALD-PEG-ALD (Shearwater), um polietilenoglicol de 3,4 kDa contendo um grupo reativo de aldeídos em ambas as extremidades, foi misturado com concentrações de um tampão fosfato de 100 mM contendo a EPO preparada em <6-1> a uma concentração de 5 mg/ml apropriada
25 para formar uma razão molar EPO: PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 e 1:20. A essa mistura, foi adicionado um agente redutor,

cianoboroidreto de sódio (NaCNBH₃, Sigma), a uma concentração final de 20 mM, deixando-o reagir a 4°C durante 2 horas com agitação moderada para permitir que o PEG se ligue seletivamente à extremidade amino terminal da EPO. Para obter
5 um complexo 1:1 de PEG e EPO, a mistura de reação foi submetida à cromatografia de exclusão por tamanho usando uma coluna Superdex^R (Pharmacia). O complexo EPO-PEG foi eluído a partir da coluna usando 10 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,0) como um tampão de eluição, e a EPO não ligada ao
10 PEG, o PEG não reagido e os subprodutos diméricos, onde o PEG estava ligado a duas moléculas de EPO, foram removidos. O complexo EPO-PEG purificado foi concentrado até 5 mg/ml. Por meio desse experimento, verificou-se que a razão molar ideal da reação para EPO com PEG, proporcionando a maior reatividade e
15 gerando a menor quantidade de subprodutos, como dímeros, é de 1:2,5 a 1:5.

<6-3> Preparação do conjugado do complexo EPO-PEG humano e da região Fc da imunoglobulina recombinante

20 O complexo EPO-PEG preparado no exemplo <6-2> foi ligado a uma região Fc da imunoglobulina produzida usando o HM11201 no Exemplo <1-3>. Em detalhes, o fragmento da região Fc da imunoglobulina (cerca de 53 kDa) preparado no Exemplo <1-3> foi dissolvido em 10 mM de tampão fosfato e
25 misturado com o complexo EPO-PEG em uma razão molar de complexo EPO-PEG:região Fc de 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8. Após a

concentração do tampão fosfato da solução de reação ter sido ajustada para 100 mM, um agente redutor, NaCNBH₃, foi adicionado à solução de reação a uma concentração final de 20 mM e foi deixado reagir a 4°C durante 20 horas com agitação moderada. Por meio desse experimento, verificou-se que a razão molar ideal da reação para o complexo EPO-PEG com o fragmento da região Fc, proporcionando a maior reatividade e gerando a menor quantidade de subprodutos, como dímeros, foi de 1:2.

Após a reação de acoplamento, a mistura de reação foi submetida à cromatografia de alta pressão de modo a eliminar substâncias e subprodutos que não reagiram. A solução de reação de acoplamento foi dessalinizada usando uma coluna de dessalinização HiPrep 26/10 (Pharmacia) com 10 mM de tampão Tris (pH 8,0). Em seguida, a solução de reação foi carregada em 50 ml de uma coluna Q HP 26/10 (Pharmacia) a uma taxa de fluxo de 8 ml/min, e essa coluna foi eluída com um gradiente linear de NaCl de 0M a 0,2 M para obter frações desejadas. As frações coletadas foram novamente carregadas em uma coluna polyCAT 21.5×250 equilibrada com 10 mM de tampão acetato (pH 5,2) a uma taxa de fluxo de 15 ml/min, e essa coluna foi eluída com um gradiente linear de NaCl de 0,1 a 0,3 M, obtendo assim frações extremamente puras.

<6-4> Análise farmacocinética

A EPO nativa preparada no Exemplo <5-1>, Aranesp (Amgen), contendo um teor mais elevado de ácido

siálico a fim de aumentar sua meia-vida, e o conjugado de EPO-PEG-Fc (grupo teste) preparado no Exemplo <5-3> foram injetados por via subcutânea a uma dosagem de 100 µg/kg em cinco ratos SD por grupo. Após a injeção subcutânea, amostras de sangue foram coletadas em 0,5, 1, 2, 4, 5, 12, 24 e 48 horas nos grupos de controle e em 1, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 240, 288, 336 e 384 horas nos grupos de teste. As amostras de sangue foram coletadas em tubos de 1,5 ml, coaguladas e centrifugadas durante 10 minutos usando um microcentrifugador de alta velocidade Eppendorf para remover as células sanguíneas. Os níveis de proteína no soro foram medidos por ELISA usando um anticorpo específico à EPO.

A Tabela 6, apresentada a seguir, e a FIG. 6, ilustram as meias-vidas em soro da proteína nativa e do conjugado protéico. O conjugado protéico de EPO-PEG-Fc (*E. coli*), preparado usando a região Fc da imunoglobulina produzida de acordo com a presente invenção como um veículo, apresentou meia-vida em soro muito maior do que a da EPO nativa. Verificou-se que essa meia-vida estendida é maior do que a do Aranesp, conhecido por ser uma EPO de segunda geração com grande meia-vida em soro.

TABELA 6

	EPO	Conjugado de EPO-PEG-Fc	Aranesp
Cmax ¹ (ng/ml)	30,4	192,8	96,8
Tmax ² (hr)	12,0	48,0	12,0
T1/2 ³ (hr)	6,1	47,0	16,4

AUC ⁴ (ng.hr/ml)	713	20436	4064
MRT ⁵ (hr)	15,1	88	32
¹ Concentração máxima do soro ² Tempo necessário para atingir concentração máxima do fármaco ³ Meia-vida em soro de um fármaco ⁴ Área sob a concentração do soro versus curva de tempo ⁵ Tempo médio durante o qual uma molécula de fármaco reside no corpo			

Aplicabilidade Industrial

Como descrito até agora, o método de acordo com a presente invenção permite a produção em massa de uma região Fc da imunoglobulina em uma forma de corpo de inclusão em *E. coli* usando uma região Fc da imunoglobulina recombinante que compreende uma região de dobradiça. Quando ligada a uma proteína fisiologicamente ativa, a região Fc da imunoglobulina produzida pode ser usada de maneira eficaz para melhorar a meia-vida em soro e a atividade fisiológica da proteína fisiologicamente ativa sem nenhum risco de induzir respostas imunológicas.

REIVINDICAÇÕES

1. – Método de produção de uma região Fc da imunoglobulina livre de um resíduo de metionina inicial em grande escala, caracterizado por compreender:

5 preparar um vetor de expressão recombinante, incluindo uma seqüência de nucleotídeos que codifica para uma região Fc da imunoglobulina recombinante, composta de uma região Fc da imunoglobulina ligada, em um N-terminal dela, a uma região de dobradiça da imunoglobulina por meio de uma
10 ligação peptídica;

 transformar uma célula procariótica com o vetor de expressão recombinante para criar um transformante;

 cultivar o transformante para expressar a região Fc da imunoglobulina como um corpo de inclusão; e

15 isolar e purificar a região Fc da imunoglobulina.

2. – Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a região Fc da imunoglobulina é isolada em uma forma monomérica ou dimérica.

3. – Método, de acordo com a reivindicação 1,
20 caracterizado pelo fato de que a região de dobradiça tem duas ou mais seqüências de aminoácidos consecutivas derivadas da região de dobradiça da IgG, IgA, IgM, IgE, ou IgD.

4. – Método, de acordo com a reivindicação 3,
25 caracterizado pelo fato de que a região de dobradiça tem duas ou mais seqüências consecutivas de aminoácidos, cada uma incluindo pelo menos um resíduo de cisteína.

5. – Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a IgG é selecionada dentre o grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

6. – Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a região de dobradiça tem uma seqüência de aminoácidos representada pela SEQ. ID. N^o 18, 19, 20, 21, 48, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 ou 60.

7. – Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a região Fc da imunoglobulina é selecionada dentre o grupo que consiste de regiões Fc da IgG, IgA, IgM, IgE, IgD e suas combinações e híbridos.

8. – Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a região Fc da imunoglobulina é a região Fc da IgG selecionada a partir do grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e suas combinações e híbridos.

9. – Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a região Fc da imunoglobulina é composta de um a quatro domínios selecionados a partir do grupo que consiste dos domínios C_H1, C_H2, C_H3, C_H4 e C_L.

10. – Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a região Fc da imunoglobulina tem uma seqüência de aminoácidos representada pela SEQ. ID. N^o 77, 9, 11, 13, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 ou 47.

11. – Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o vetor de expressão recombinante é pmSCPFc, pmPSCFc, pmCPSFc, pmCPFc, pMEPKFC1,

pMSCKFc1, pMDKTFc1, pMCPAFc1, pMPKSFc1, pMCPFFc1, pMPPCFc, pMPCPFc, pmPPCG2Fc, pmPCPG2Fc, pmCPG2Fc, pmCCVG2Fc ou pmCVE2Fc.

12. – Método, de acordo com a reivindicação 1,
5 caracterizado pelo fato de que a célula procariótica é *E. coli*.

13. – Método, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado pelo fato de que o transformante é *E. coli*
BL21/pSTIIG1CH1_3(HM10935), BL21/pSTIIdCG1Fc
(HM10927), BL21/pSTIIdCG1SFC (HM10928),
10 BL21/pSTIIdCG1SFFc (HM10929), BL21/pSTIIG1Mo
(HM10930), BL21/pSTIIdCG2Fc (HM10936),
BL21/pSTIIdCG4Fc (HM10932),
BL21/pSTIIG4CH1_3(HM10931), BL21/pSTIIG4Mo
(HM10933) ou BL21/pSTIIG4H_K (HM10934).

14. – Região Fc da imunoglobulina monomérica
15 ou dimérica, livre de resíduos de metionina inicial, caracterizada
por ser preparada pelo método da reivindicação 1.

c 1 2 3 4 5 6 7 8

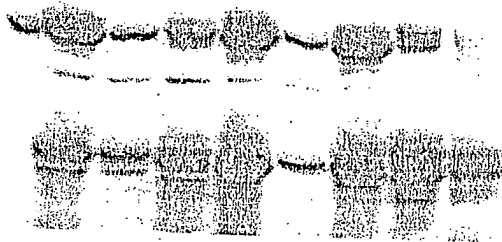


FIGURA 1

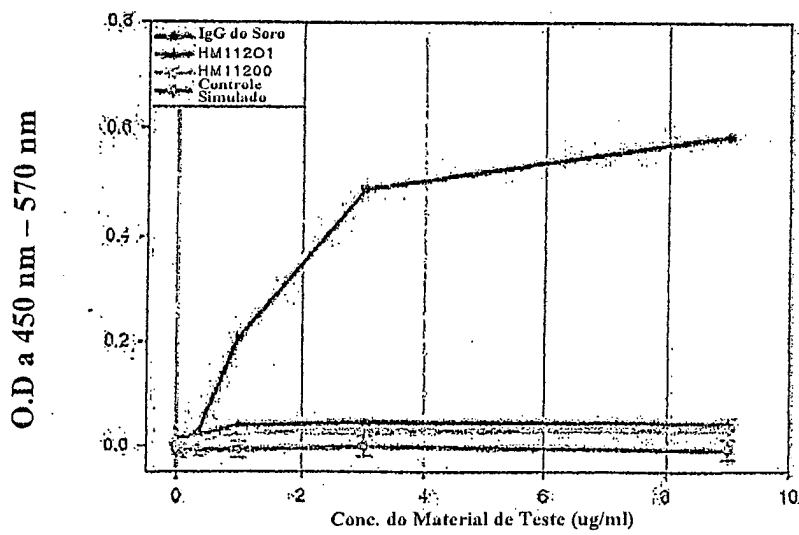


FIGURA 2

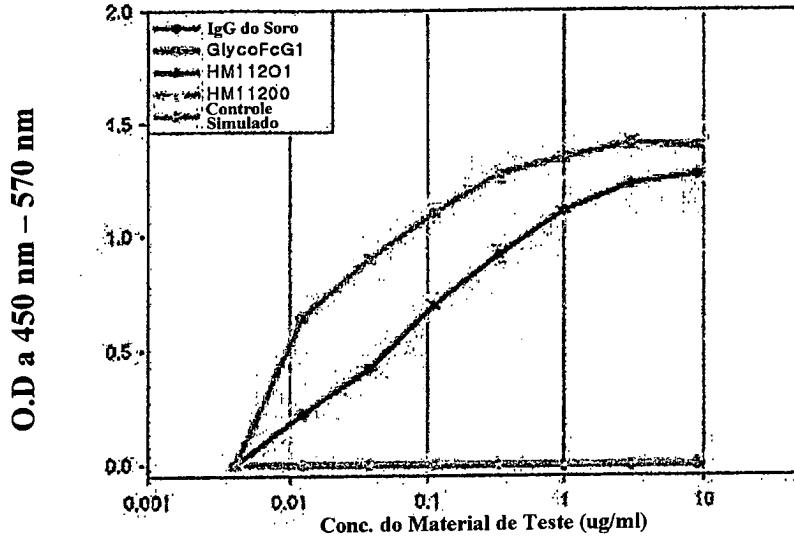


FIGURA 3

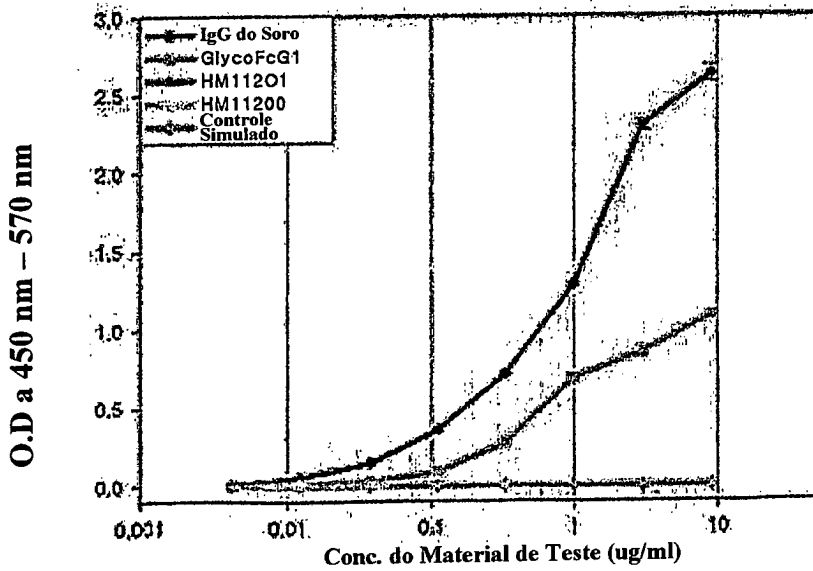


FIGURA 4

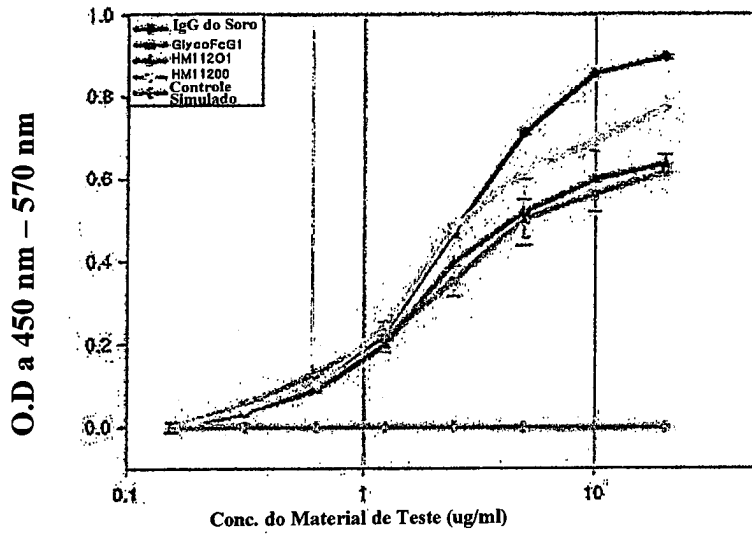


FIGURA 5

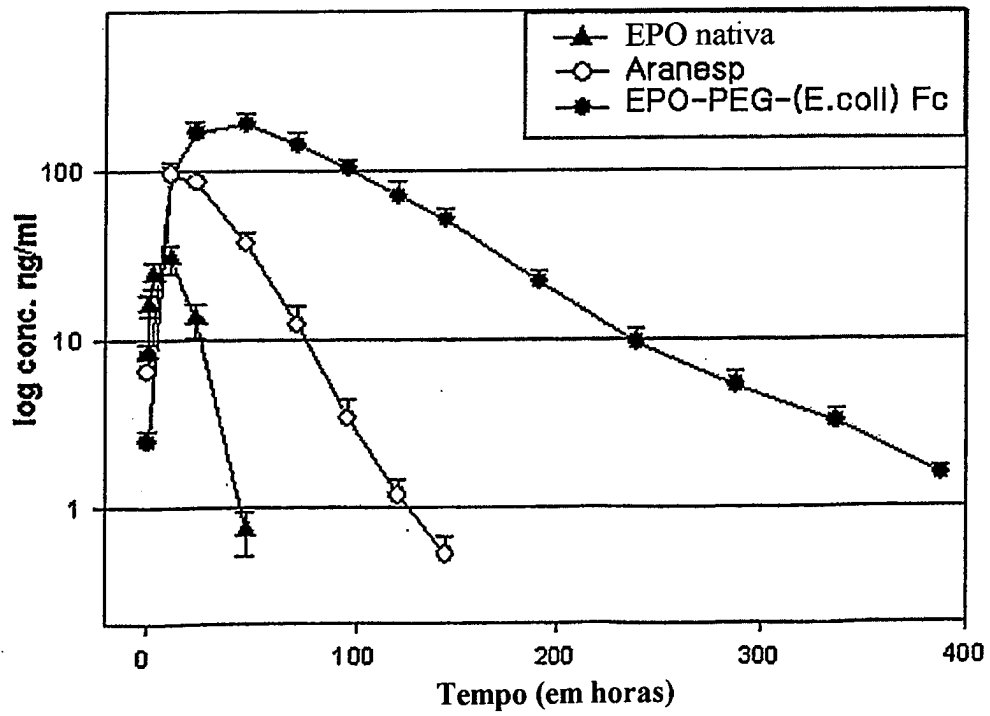


FIGURA 6

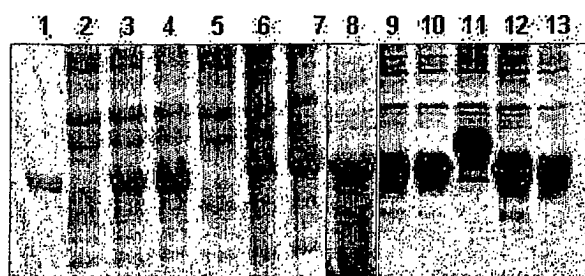


FIGURA 7

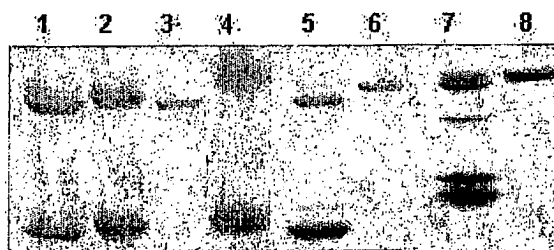


FIGURA 8

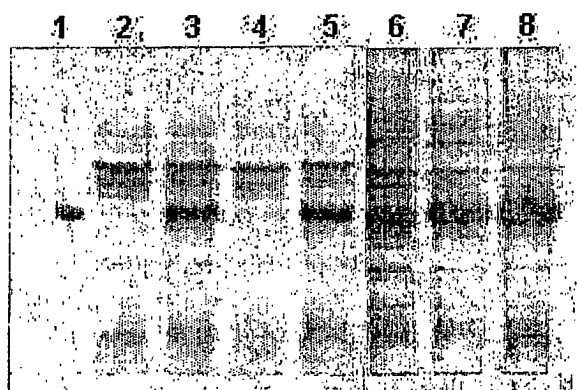


FIGURA 9

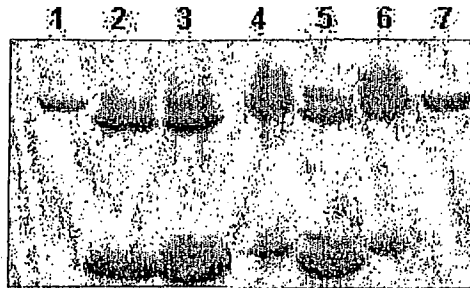


FIGURA 10

RESUMO

Patente de Invenção para “MÉTODO PARA PRODUÇÃO EM MASSA DA REGIÃO Fc DA IMUNOGLOBULINA LIVRE DE RESÍDUOS DE METIONINA INICIAL”.

É revelado um método para a produção em massa de uma região Fc da imunoglobulina monomérica ou dimérica, livre de resíduos de metionina inicial, usando um vetor de expressão recombinante que compreende uma seqüência de nucleotídeos que codifica para uma região Fc da imunoglobulina recombinante, a qual compreende uma região Fc da imunoglobulina ligada, em seu N-terminal, a uma região Fc da imunoglobulina via uma ligação peptídica.