



INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

DIRECÇÃO DE SERVIÇOS DE PATENTES

CAMPO DAS CEBOLAS, 1100 LISBOA  
TEL.: 888 51 51 / 2 / 3 TELEX: 18366 INPI  
TELEFAX: 87 53 08

FOLHA DO RESUMO

Modalidade e n.º (11) 99.929 N	T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
Requerente (71): F.HOFFMANN-LA ROCHE AG., suíça, industrial, com sede em 124 Grenzacherstrasse, CH-4002, Basle, Suíça			
Inventores (72): RENÉ DEVOS, WALTER FIER, GEERT PLAETINCK, JAN TAVERNIER e JOSÉ VAN DER HEYDEN			
Reivindicação de prioridade(s) (30)			Figura (para interpretação do resumo)
Data do pedido	País de Origem	N.º de pedido	
27.12.1990	EP	90811030.7	
30.04.1991	EP	91810327.6	
Epigrafe: (54) "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE CA- DEIAS $\alpha$ RECOMBINANTES DO RECEPTOR HU- MANO DA INTERLEUCINA 5 E DE COMPOSI- ÇÕES FARMACÊUTICAS QUE AS CONTÊM"			
Resumo: (máx. 150 palavras) (57)  A invenção tem como objectivo proporcionar uma cadeia $\alpha$ recombinante do receptor humano da interleucina 5 ou partes correspondentes, sequências de ADN que codificam esse receptor ou partes correspondentes, células hospedeiras transformadas com esses vectores e ainda um processo para a preparação dessas ca- deias $\alpha$ do receptor humano da interleucina 5 utilizando as refe- ridas células hospedeiras transformadas. Proporciona também com- posições farmacêuticas que contêm esses receptores ou fragmentos correspondentes e a sua utilização para o tratamento de doenças, por exemplo, asma crónica.			

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBRADAS



INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

DIRECÇÃO DE SERVIÇOS DE PATENTES

CAMPO DAS CEBOLAS, 1100 LISBOA  
TEL.: 888 51 51 / 2 / 3 TELEX: 18356 INPI  
TELEFAX: 87 53 08

FOLHA DO RESUMO (Continuação)

Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido (22)	Classificação Internacional (51)
-----------------------	-----	---------------------	----------------------------------

Resumo (continuação) (57)

2

O processo é caracterizado pelo facto de se cultivar células hospedeiras, transformadas com um vector de expressão constituído por uma sequência de ADN que codifica a cadeia  $\alpha$  do receptor humano da interleucina 5 ou partes correspondentes que ainda se ligam à interleucina 5 humana.

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

(Dr. Jorge Garin)

5

**"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE CADEIAS  $\alpha$  RECOMBINANTES DO  
RECEPTOR HUMANO DA INTERLEUCINA 5 E DE COMPOSIÇÕES  
FARMACÊUTICAS QUE AS CONTÊM"**

A interleucina-5 (IL-5 ou IL5) é uma linfocina segregada pelas células T e pelos mastócitos, possuindo actividades biológicas sobre as células B e sobre os eosinófilos. Admite-se que a actividade sobre as células B esteja restringida ao sistema dos murinos. Não se detectou qualquer actividade num painel de activação de células B em seres humanos ou em ensaios de diferenciação. [Clutterbuck et al., Eur. J. Immunol., 17 (1987) 1743 - 1750].

Na hematopoiese dos murinos, a IL-5 é um sinal selectivo para a proliferação e para a diferenciação da linhagem eosinofílica [Yamaguchi et al., J. Exp. Med., 167 (1988), 43 - 56]. Sobre esta questão, a função da IL-5 apresenta analogias com os factores estimuladores das colónias para outras linhagens mielóides. Por outro lado, a IL-5 humana (h) é bastante poderosa na activação dos eosinófilos humanos [Lopez et al., J. Exp. Med., 167 (1988); 219 - 224; Saito et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85,

2288 - 2292)].

A interleucina 5 veicula mediaticamente a sua actividade através de um complexo receptor da membrana celular. Este complexo foi já caracterizado físico-quimicamente em sistemas de murinos e humanos. As linhas de células precursoras das células B dos murganhos cujo desenvolvimento depende da IL5 foram desenvolvidas a partir da medula óssea e são utilizadas para a análise do receptor da IL5 [Rolink et al., J. Exp. Med., 169, (1989) 1693-1701]. O receptor de IL5 humano pode ser estudado num subclone da linha de células promielociticas HL60 induzida no sentido da diferenciação dos eosinófilos [Plaetinck et al., J. Exp. Med., 172 (1990) 683 - 691].

A diferenciação eosinofílica inicia-se utilizando butirato de sódio. Nessas células apenas é possível encontrar sítios de ligação IL5 de alta afinidade ( $K_d = 30$  pM). Contudo, estudos de ligações cruzadas revelaram a presença de duas cadeias polipeptídicas implicadas na ligação de IL5, com pesos moleculares com características muito próximas das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do RIL5 dos murinos.

Foi possível utilizar uma cadeia  $\alpha$  RIL5 humana e solúvel ( $\alpha$ RIL5hs) como antagonista da IL-5 em asma crónica ou noutros estados de doença com eosinofilia demonstrada. Por outro lado, foi possível utilizar a  $\alpha$ RIL5hs

ou a própria cadeia ou o receptor de elevada afinidade global, constituído pela cadeia  $\alpha$  e pela cadeia  $\beta$  [Tavernier et al., Cell, 66, (1991) 1175-1184] como instrumento para o rastreio dos antagonistas da IL-5.

Consequentemente, constitui um objectivo da presente invenção proporcionar uma sequência de ADN codificadora para a cadeia  $\alpha$  do receptor da interleucina-5 humana (R-IL5-h) ou partes correspondentes, especialmente para uma cadeia  $\alpha$  RIL5hs, um vector constituído por uma sequência de ADN, células hospedeiras eucarióticas inferiores transformadas com esse vector, proteínas recombinantes codificadas por uma sequência de ADN da presente invenção, especialmente a cadeia  $\alpha$  RIL5hs recombinante, sendo especialmente preferíveis os que contêm uma sequência de aminoácidos representada na Figura 1, e ainda proporcionar um processo para a produção dessas proteínas através de uma cultura de hospedeiros transformados da presente invenção, num meio adequado isolando-se uma proteína recombinante da presente invenção.

As sequências de ADN preferenciais da presente invenção são aquelas que incorporam os ADNc de inserção de clones de ADNc obtidos a partir de bibliotecas adequadas de ADNc, por exemplo, conforme descrito no Exemplo 4, por rastreio de hibridação conforme descrito, por exemplo, no Exemplo 5. São ainda preferíveis os ADNc de inserção quando prepa-

rados de acordo com o Exemplo 5, por exemplo, os do clone de ADNc " $\lambda$ gtii -  $\alpha$ RIL5h12". Por outro lado, as sequências de ADN preferenciais da presente invenção são as sequências codificadoras para uma cadeia  $\alpha$ RIL5hs, especificamente as sequências que incorporam uma sequência representada na Figura 1.

A clonagem da sequência de ADN da presente invenção pode ser efectuada conforme se descreve a seguir. É possível cultivar linhas de células de murinos que contêm o receptor de IL-5 dos murinos (RIL5m) numa forma acoplada à membrana, de acordo com métodos conhecidos na especialidade ou conforme especificamente descrito, por exemplo, no Exemplo 2. Essas células podem ser depois colhidas por centrifugação, e submetidas a um processo de lise, preparando-se depois um extracto da membrana utilizando um detergente adequado, por exemplo, Triton-X-100. Para se isolar a cadeia  $\alpha$  do RIL5m, pode fazer-se passar o extracto de membrana, purificado por centrifugação, por uma matriz de imuno-afinidade. Os anticorpos correspondentes a essa imuno-matriz, designadamente os anticorpos para a cadeia  $\alpha$  do RIL5m podem ser preparados e acoplados a uma matriz adequada utilizando métodos bem conhecidos na especialidade ou conforme especificamente descrito, por exemplo, nos Exemplos 1-3. A cadeia  $\alpha$  do RIL5m pode ser depois purificada pelo método da eletroforese em gel de poliacrilamida/dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e revelada sob a

forma de uma mancha numa matriz adequada.

A cadeia do receptor da IL-5 dos murinos assim purificada pode ser caracterizada por métodos da química dos péptidos que são conhecidos pelos especialistas na matéria, tais como, por exemplo, os métodos de seqüenciação dos aminoácidos N-terminais ou os métodos de clivagem enzimática ou os métodos de clivagem peptídica por via química. Os fragmentos obtidos por clivagem enzimática ou por clivagem química podem ser separados de acordo com métodos habituais, tais como, por exemplo, HPLC e esses mesmos fragmentos podem ser submetidos a novas seqüenciações N-terminais.

A partir da informação acerca da seqüência de aminoácidos assim obtida é possível produzir oligonucleótidos de acordo com métodos conhecidos na especialidade [veja-se, por exemplo, Sambrook et al., s.a.] tendo em consideração a degenerescência do código genético.

As bibliotecas de ADNc ou de ADN genómico podem ser produzidas mediante métodos conhecidos na especialidade [Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2ª ed., 1989], sendo preferíveis as bibliotecas de ADNc na base da preparação de ARNm a partir de linhas de células que se expressam com eventual indução do RIL5 humano ou de murinos, por exemplo, conforme es

pecificamente descrito no Exemplo 4. O rastreio dessas bibliotecas pode então ser efectuado pelos oligonucleótidos [Sambrook et al., s.a.]. Uma vez identificado um clone específico por esse processo, é possível isolar o fogo que aloja a sequência de ADN pretendida da presente invenção [Sambrook et al., s.a.] e é possível caracterizar as inserções correspondentes através de uma análise do diagrama de clivagem por enzima de restrição ou correspondente sequenciação segundo procedimentos normalizados (Sambrook et al., s.a.). Deve notar-se que as próprias sequências de ADN que hibridam sob rigorosas condições de hibridação (veja-se, por exemplo, Sambrook et al., s.a.) para proporcionar as da presente invenção e que são codificadoras para proteínas que se ligam ainda à IL5 e essas próprias proteínas constituem também um objectivo da presente invenção. Essas sequências de ADN podem ser preparadas, por exemplo, por métodos de mutagênese conhecidos na especialidade (veja-se, por exemplo, Sambrook et al.) a partir das correspondentes sequências de ADN naturais.

Tomando como base as sequências assim determinadas e as sequências já conhecidas para alguns receptores, é possível determinar as sequências parciais codificadoras para uma subunidade receptora solúvel e é possível cortar essas sequências parciais a partir da sequência com



pleta recorrendo a métodos conhecidos [Sambrook et al., s. a., ver também Maliszewski e Fanslow, Tibtech., 8 (1990) 324 - 329]no caso de um ADNc de inserção específico de um clone da presente invenção não ser já codificador para um desses RIL5hs, tal como sucede, por exemplo, no caso correspondente ao clone de ADNc " $\lambda$  gt11- $\alpha$  RIL5h12".

A sequência completa ou essas sequências parciais podem ser integradas, utilizando métodos conhecidos em vectores descritos na literatura da especialidade, para a sua amplificação e/ou expressão em células procarióticas [Sambrook et al., s.a.]. Os organismos hospedeiros procarióticos adequados são, por exemplo, as bactérias de gram negativa e de gram positiva tais como, por exemplo, as estirpes de E. coli, tais como HB 101 [ATCC Nº 33 694] ou E. coli W3110 [ATCC Nº 27 325] e E. coli MC1061 [Casadabam e Cohen, J.Mol. Biol., 138 (1980) 179-207] albergando já as duas últimas o plasmídeo "p3" (Sambrook et al., s.a.) no caso de vectores do tipo pCDM8, tais como IIVX ou p $\alpha$ RIL5hs (veja-se o Exemplo 9) virem a ser amplificados ou estirpes B.subtilis.

Além disso, as sequências dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção podem ser integradas, recorrendo a métodos conhecidos, em vectores adequados para expressão em células hospedeiras eucarióticas, tais como, por exemplo, células de leveduras, células de insectos e células de mamíferos. Esses vectores, tais como os outros

referidos antes, constituem também um dos objectivos da presente invenção.

Um vector de expressão típico para as células dos mamíferos contém um elemento promotor eficiente com o objectivo de proporcionar um bom regime de transcrição, a sequência de ADN que se pretende expressar e sinais para uma terminação e uma poliadenilação eficientes do produto de transcrição. Os elementos adicionais que podem ser utilizados são "aumentadores" que proporcionam nova transcrição intensificada e sequências que proporcionam, por exemplo, um período de semi-vida mais longo do ARNm. Para a expressão de sequências do ácido nucleico em que falte o fragmento de sequência endógena codificador para um péptido sinal, é possível utilizar vectores que contenham essas sequências adequadas, as quais são codificadoras para péptidos sinal de outras proteínas conhecidas. Veja-se, por exemplo, o vector pLJ268 descrito por (Cullen, B:R. em Cell 46, 973-982 (1986) e também Sharma, S. et al. em Current Communications in Molecular Biology, editado por Gething, M. J., Cold Spring Harbor Lab. 1985, páginas 73-78.

A maior parte desses vectores que são utilizados para uma expressão transitória de uma sequência de ADN particular em células de mamíferos, contém a origem de replicação do vírus SV40. Em células que expressem o antígeno T do vírus (por exemplo, as células COS), esses vec-

tores são reproduzidos abundantemente. Todavia, a expressão transitória descrita, por exemplo, no Exemplo 10, não se limita às células COS. Em princípio é possível utilizar para realizar este objectivo qualquer linha de células de mamífero transfectável. Os sinais que podem realizar uma forte transcrição são, por exemplo, o primeiro e o último promotores de SV40, o promotor e o aumentador do gene "primeiro principal imediato" do HCMV (citomegalovírus humano), as RTL ("repetições de terminal longo") de retrovírus, tais como, por exemplo, RSV, HIV e MMTV. Contudo, é possível utilizar também sinais e genes celulares, tais como, por exemplo, os promotores da actina e os genes da colagenase.

Contudo, alternativamente é possível obter também linhas de células estáveis que possuam a sequência de ADN específica integrada no genoma (cromossoma). Para esse efeito, a sequência do ADN é co-transfectada em conjunto com um marcador seleccionável, por exemplo, neomicina, higromicina, di-hidrofolato redutase (dhfr) ou hipoxantina-guanina-fosforibosilo-transferase (hgpt). A sequência de ADN estavelmente incorporada no cromossoma também pode ser abundantemente amplificada. O marcador seleccionado e adequado para este efeito é, por exemplo, o di-hidrofolato redutase (dhfr). As células de mamíferos (por exemplo, células CHO) que não contêm nenhum gene dhfr intacto são assim incubadas com quantidades crescentes de metotrexato após ter sido efectuada a transfecção. Por este processo é possível



obter linhas de células que contêm mais de um milhar de cópias da sequência de ADN desejada.

As células de mamíferos que podem ser utilizadas para a expressão são, por exemplo, as células das linhas de células humanas Hela [ATCC CCL2] e 293 [ATCC CRL 1573] e também 3T3 [ATCC CCL 163] e as células L, por exemplo [ATCC CCL 149], as células (CHO) [ATCC CCL 61], as células BHK [ATCC CCL 10] e ainda as linhas de células CV 1 [ATCC CCL 70] e COS [ATCC CRL 1650, CRL 1651].

Os vectores de expressão adequados englobam, por exemplo, vectores, tais como pBC12MI [ATCC 67 109], pSV2dhfr [ATCC 37 146], pSVL [Pharmacia, Uppsala, Suécia], pRSVcat [ATCC 37 152], pMSG [Pharmacia, Uppsala, Suécia] e plasmídeos do tipo pCDM8, tais como, por exemplo, p $\alpha$ RIL5hs [veja-se o Exemplo 7], os quais, transformados em E. coli MC1061 (plasmídeo p3 de alojamento) foram depositados ao abrigo do Tratado de Budapeste relativo a patentes de invenção na Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) em Braunschweig, na República Federal da Alemanha a 17 de Abril de 1991, com o número de registo DSM 6479. É possível isolar o plasmídeo p $\alpha$ RIL5hs a partir de E. coli transformada e depositada, utilizando técnicas conhecidas na especialidade e descritas, por exemplo, pormenorizadamente no Exemplo 9. As células hospedeiras procarióticas

ticas transformadas com esses plasmídeos que contêm uma sequência de ADN da presente invenção, especialmente células E. coli transformadas constituem também um objectivo da presente invenção, o mesmo sucedendo com os plasmídeos utilizados para essa transformação.

O processo segundo o qual essas células são transfectadas depende do sistema de expressão e do sistema vector escolhidos. Para uma visão geral destes métodos ver, por exemplo, Pollard et al., "DNA transformation of Mammalian Cells" in "Methods in Molecular Biology" [Nucleic Acids, Walker, J. M. ed., Humana, Clifton, New Jersey Vol. 2, 1984]. Existem outros métodos descritos por ["High-Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA", Molecular and Cell Biology, 7 (1987), 2745 - 2752] e em Felgner [Felgner et al., "Lipofectin: As células hospedeiras eucarióticas transfectadas com um plasmídeo adequado (vector) da presente invenção, especialmente as células hospedeiras de mamíferos, considerando-se especialmente preferenciais as células COS, e também os plasmídeos para essa transfecção e expressão da correspondente proteína recombinante, constituem também um objectivo da presente invenção.

O sistema de expressão baculovírus, já anteriormente utilizado com sucesso para a expressão de uma série de proteínas (para um estudo veja-se Luckow e Summers, Bio/Technology, 6 (1988) 47-55) pode ser utilizado

para a expressão em células de insectos. As proteínas recombinantes podem ser produzidas numa forma autêntica ou como proteínas de fusão. As proteínas assim produzidas também podem ser modificadas, por exemplo, podem ser glicosiladas [Smith et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82 (1987) 8404-8408]. Para a produção de um baculovirus recombinante que expresse a proteína desejada utiliza-se um vector designado por "vector de transferência". Esta designação significa especificamente um plasmídeo que contem a sequência heteróloga de ADN sob o controlo de um promotor forte, por exemplo, a correspondente ao gene poliedro, ficando este rodeado pelos dois lados por sequências virais. O vector de transferência é depois transfectado no interior das células de insectos conjuntamente com o ADN do baculovirus de tipo selvagem. Os vírus recombinantes originados nas células por recombinação homóloga podem ser depois identificados e isolados de acordo com métodos conhecidos. Pode encontrar-se uma descrição do sistema de expressão do baculovirus e correspondentes métodos utilizáveis em Luckow e Summers, A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station, Texas A & M University, Bulletin No. 1555, 2ª edição, 1988.

A cadeia expressada do receptor IL-5 ou os correspondentes fragmentos podem ser depois purifi

cados a partir da massa celular ou a partir dos sobrenadantes da cultura de acordo com métodos da química das proteínas que são bem conhecidos na especialidade, tais como, por exemplo, a precipitação, por exemplo com sulfato de amónio a diálise, a ultrafiltração, a filtração em gel, a cromatografia de permuta iónica, SDS-PAGE, focagem isoeléctrica cromatografia por afinidade tal como a cromatografia por imunoafinidade, HPLC ou similares.

Além disso, pode utilizar-se a cadeia de receptor da IL-5 ou os correspondentes fragmentos, de acordo com a presente invenção, para a detecção de agonistas ou de antagonistas de IL-5 utilizando procedimentos que são bem conhecidos pelos especialistas na matéria.

A cadeia do receptor da IL-5 ou os correspondentes fragmentos de acordo com a presente invenção e ainda os seus sais fisiologicamente compatíveis, os quais podem ser preparados mediante métodos bem conhecidos pelos especialistas na matéria, também podem ser utilizados para o tratamento de doenças nas quais esteja implicada a IL-5 e/ou também podem ser utilizados para a produção das correspondentes preparações farmacêuticas. Para satisfazer esse objectivo, é possível processar um ou mais dos referidos compostos, sempre que desejado ou necessário em associação com outras substâncias farmacêuticamente activas

de um modo conhecido, conjuntamente com os materiais veiculares sólidos ou líquidos vulgarmente utilizados. A dosagem dessas preparações pode ser efectuada tomando em consideração os critérios habituais, por analogia com preparações já utilizadas com actividade e estrutura semelhantes. Essas preparações farmacêuticas e a utilização dos compostos da presente invenção para fins terapêuticos constituem também um objectivo da presente invenção.

Após a descrição geral da presente invenção apresenta-se seguidamente Figuras e Exemplos com o fim de ilustrar pormenores da invenção, sem que isso constitua qualquer limitação.

#### Figura 1

Representa a sequência de ácidos nucleicos da  $\alpha$  RIL5hs e a sequência de aminoácidos deduzida, estando a correspondente sequência de aminoácidos da  $\alpha$  RIL5m indicada por baixo representando-se apenas os aminoácidos que são diferentes dos que correspondem à sequência humana. As sequências são representadas pelas abreviaturas normalizadas para os nucleótidos e para os aminoácidos.

#### Figura 2

A Figura 2 representa uma caracterização da  $\alpha$  RIL5hs. Os correspondentes pormenores estão des-



critos no Exemplo 11.

### Figura 3

A Figura 3 representa uma sequência de ADN e uma sequência de aminoácidos derivada de  $\alpha$  RIL5h, estando a correspondente sequência de aminoácidos da  $\alpha$  RIL5m indicada por baixo, representando-se apenas os aminoácidos que são diferentes dos correspondentes à sequência humana. As sequências estão representadas pelas abreviaturas normalizadas.

### Exemplo 1

#### Produção de anticorpos monoclonais contra o RIL5 dos murinos

Efectuou-se a imunização basicamente conforme descrito por A. Rolink et al., (s.a.). Resumidamente temos: no dia 0 procedeu-se à incubação de  $2 \times 10^7$  células B13 [Rolink et al., s.a.] com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS-A), misturou-se com o adjuvante de Freud completo (AFC) e injectou-se na pata posterior de ratas da estirpe Wistar. Repetiu-se este procedimento sem adjuvante de Freud (AF) ao 5º dia e ao 7º dia. Ao 8º dia procedeu-se à remoção dos nodos de linfa regionais e preparou-se uma suspensão celular. Essas células foram fundidas, utilizando PEG 1500 (Boehringer), com células Sp2/0-Ag14 [ATCC CRL 1581] na proporção de 5:1,5. Procedeu-se à dis-



tribuição das células por placas de microtitulação na presença de 500 pg/ml de IL6h recombinante [Haegeman et al., Europ. J. Biochem., 159 (1986) 625-632]. Ao 6º dia adicionou-se o mesmo volume de meio contendo uma concentração dupla de aminopterina para selecção das células híbridas. Efectuou-se o tratamento das células ao 8º dia com meio que não continha aminopterina. Procedeu-se à selecção dos hibridomas pela capacidade do seu sobrenadante para inibir a IL5m [Tavernier, J. et al., DNA, 8, (1989) 491-501] ou uma proliferação de células B13 induzida pela interleucina -3 do murganho (IL3m) (a medição foi efectuada através de um ensaio de incorporação de <sup>3</sup>H-desoxicitidina conhecido na especialidade). Como fonte de IL3m utilizou-se meio condicionado proveniente de células WEHI-3 (ATCC No. TIB68). Com os sobrenadantes que demonstraram inibir a actividade procedeu-se a novo teste num ensaio de ligação por competição com a IL5m marcada radioactivamente [de acordo com métodos conhecidos na especialidade] ou com o anticorpo "R52" [um anticorpo monoclonal que reconhece apenas a cadeia  $\beta$  do RIL-5 (Rolink et al., s.a.)] em células B13. Os anticorpos monoclonais dirigidos apenas para a cadeia  $\alpha$  do RIL5m foram identificados pela sua capacidade para inibirem quase completamente a ligação da IL5m e por imunoprecipitação da correspondente cadeia do RIL5m. Os hibridomas seleccionados foram reclonados pelo método de diluição limitadora.

## Exemplo 2

### Purificação por imunoafinidade da cadeia $\beta$ RIL5m

Processou-se o desenvolvimento de células B13 em grandes balões rotativos contendo meio de Dulbecco modificado por Iscove (Gibco laboratories, Grand Island N.Y., USA) contendo 5 % de soro de vitela fetal, L-glutamina 2 mM, 50 ug/ml de gentamicina e 100 unidades/ml de IL-5 recombinante de murganho, até se obter uma densidade de  $2 \times 10^6$  células/ml. Concentrou-se por centrifugação células de culturas de 10 litros efectuou-se a lavagem com PBS e realizou-se a citólise em 200 ml de PBS contendo 1% de Triton-X-100 e uma mistura de inibidores de protease PMSF (1 mM de cloridrato de benzamidina 10 mM e aprotinina na proporção de 100 U/ml). Decorridos 10 minutos em gelo, centrifugou-se o lisado a 1000 x g durante 10 minutos e depois clarificou-se por ultracentrifugação (100 000 x g) durante 90 minutos à temperatura de 4°C. Diluiu-se o sobrenadante com NaCl até se obter a concentração final de 0,5 M e submeteu-se a purificação. Ligou-se covalentemente o anticorpo "R52" ao produto proteico "G-Sepharose 4 Fast Flow" (Pharmacia, LKB Biotechnology AB, Uppsala, Suécia) de acordo com Schneider et al., [J. Biol. Chem., 257 (1982), 10766], para uma concentração de 5 mg/ml de gel. Fez-se passar 200 ml de lisado de células B13, à temperatura de 4°C sobre 2 ml do produto proteico "G-Sepharose 4 Fast Flow"

e depois sobre 2 ml de R52 acoplado ao produto proteico "G-Sepharose 4 Fast Flow", estando ambos carregados numa coluna com 1 cm de diâmetro. O fluxo passante foi depois recarregado nas duas colunas. Lavou-se o gel muito bem (100 ml) com um tampão contendo Tris-HCl 50 mM (pH 8,2), EDTA 1 mM, NaCl 0,5 M, 0,5 % de NP40 e finalmente tratou-se com 10 ml de NP40 a 0,1 %. Depois realizou-se a eluição das proteínas retidas utilizando 4 ml de dietilamina 50 mM (pH 11) contendo 0,1 % de Nonidet P40 (NP40), neutralizou-se por adição de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 M e concentrou-se por liofilização. Avaliou-se a pureza por SDS-PAGE e por coloração de 2,5 % do eluído com Coomassie.

### Exemplo 3

#### Purificação por imunoafinidade da cadeia $\alpha$ RIL5 dos murinos

Durante a noite misturaram-se a uma temperatura de cerca de  $4^\circ\text{C}$  lisas de células B13 provenientes de  $2 \times 10^{10}$  células (processadas através das fracções de coluna de imunoafinidade do "R52" utilizada para purificar o duplete da cadeia  $\beta$  de acordo com o Exemplo 2) com 2 ml de hidrazida avidgel AX (Bioprobe Int. Inc.) enriquecida com 10 mg de mAbs identificadora da cadeia  $\alpha$  RIL5m. Carregou-se depois o gel numa coluna e após lavagem intensa (Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 EDTA 1 mM, NaCl 0,5 mM, 0,5 % de NP40; seguindo-se NP40 a 1 % em  $\text{H}_2\text{O}$ ) procedeu-se à elui-

ção com dietilamina 50 mM, pH 11, 0,01 % de NP40. As fracções seleccionadas foram imediatamente liofilizadas e com elas se preparou nova suspensão em 2 x tampão de Laemmli na presença de  $\beta$ -mercapto-etanol. Efectuou-se o processamento das amostras através de 1,5 mm de gel contendo 10 % de PAGE-SDS. Procedeu-se à fixação do gel com 10 % de Hac e 30 % de metanol e depois à coloração com Azul Brilhante de Coomassie. As lâminas que continham a cadeia  $\alpha$ RIL5m de 60 kDa foram tratadas com tampão SDS, novamente dispostas em lâminas e submetidas a electroforese em gel recente contendo PAGE-SDS.

Após transferência para uma membrana de "Immobilon-P" (Millipore Corp.), e coloração com negro de amido, procedeu-se à excisão da banda dos 60 kDa e digeriu-se in situ com tripsina. Efectuou-se a separação dos péptidos em coluna de fase inversa C<sub>4</sub> e submeteu-se a análise de sequenciação utilizando um sequenciador de fase gasosa tipo 470A equipado com o analisador de aminoácidos PPTH de tipo 120A, em linha (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Apresenta-se seguidamente as sequências dos aminoácidos (os aminoácidos estão indicados pelas abreviaturas normalizadas) e as sequências dos correspondentes conjuntos de sondas oligonucleotídicas, sintetizadas de acordo com métodos conhecidos na especialidade:



peptido 1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

W G E W S Q P I Y V G K

Conjunto oligonucleotídico : 32 meros

T

5' CCIAC GTA AATIGG CTG IGA CCA CTC ICC CCA 3'

A G T T

T

5' CCIAC GTA AATIGG CTG ACT CCA CTC ICC CCA 3'

A G T G T

Peptido 2

1 2 3 4 5 6 7 8

H V D L E Y H V

Conjunto oligonucleotídico 2 : 23 meros

5' AC ATG ATA TTC TAA ATC IAC ATG 3'

G G C C G G

5' AC ATG ATA TTC IAG ATC IAC ATG 3'

G G C G G

4.

#### Exemplo 4

### Construção de bibliotecas unidireccionais de ADNc do $\lambda$ GT11

#### 1. Biblioteca de ADNc das células B13 pré-B dos murinos

Extraiu-se ARNm de células B13 utilizando o sistema de isolamento de ARNm de "seguimento rápido" (Invitrogen Corp.). Utilizando este protocolo isolou-se directamente poli(A) <sup>+</sup> ARNm a partir de lisados celulares utilizando oligo(dT) celulose; o rendimento obtido correspondeu aproximadamente a 50  $\mu$ g por 10<sup>8</sup> células. Procedeu-se à transcrição inversa de 5 mg de poli(A) <sup>+</sup> ARNm utilizando um iniciador-adaptador oligodT-Not1 5'-AATTCGCGGCCGC(T)<sub>15</sub>-3', (Promega Corp.) e Transcriptase Inversa da RNaseH<sup>-</sup> do Vírus da Leucémia de Murinos Moloney clonada (BRL Life Technologies, Inc.). O ADNc de cordão duplo acoplado a EcoR1 foi preparado utilizando procedimentos descritos (Sambrook et al., s.a.). Recorreu-se à clivagem Not1 para gerar uma extremidade aderente 3' única e seleccionou-se os ADNc em função das suas dimensões (>1.000 p.b.) sobre gel de agarose a 1 %. Após eluição recorrendo ao protocolo de "limpeza de genes" (BIO 101 Inc.), acoplou-se os ADNc nas ramificações EcoR1-Not1 do vector  $\lambda$  gt11 Sfi-Not (Promega Corp.). Após acondicionamento in vitro foram obtidos cerca de 4 x 10<sup>6</sup> fagos recombinantes.

#### 2. Biblioteca de ADNc (induzida pelo butirato) do clone HL60 humano

Antes da purificação do ARNm procedeu-se

à verificação de 15 células do clone HL60 induzida pelo butirato [Fischkoff, Leukemia Res., 12 (1988) 679 -686; Plaetinck et al., J. Exp. Med., 172 (1990), 683-691; HL60: ATCC-No. CCL 240] para determinação da adequada ligação  $^{125}\text{I}$ -IL5h (cerca de 2 000 sítios de ligação por célula). Utilizou-se os mesmos protocolos utilizados em 4.1 e obteve-se uma produção comparável de fagos recombinantes.

### Exemplo 5

#### Rastreo de bibliotecas de ADNc de murinos e de seres humanos

Utilizou-se dois conjuntos de sondas oligonucleotídicas "Oligonucleótido 1" e "Oligonucleótido 2" (ver o Exemplo 3) para rastreamento sob diferentes condições de hibridação (veja-se mais adiante), dependendo do tipo de sonda utilizada, de acordo com métodos conhecidos na especialidade (Sambrook et al., s.a.). Os resultados são apresentados no esquema subsequente.

1. Procedeu-se à selecção de dois clones de ADNc ( $\lambda$  gt11- $\alpha$  RIL5m 2,3) a partir de uma biblioteca de ADNc de murinos (foram rastreadas  $1,2 \times 10^6$  placas) tomando como base a hibridação com ambos os conjuntos de sondas oligonucleotídicas. Para esse efeito preparou-se cargas de placas conforme descrito utilizando membranas de transferência "Biodyne A" (Pall), (Sambrook et al., s.a.). O oli-



gonucleótido 1 foi marcado radioativamente por tratamento com quinase (Sambrook et al., s.a.) e hibridou-se sob condições de hibridação de "rigor intermédio" (veja-se adiante). O oligonucleótido 2 foi marcado radioativamente por tratamento com quinase (Sambrook et al., s.a.) e hibridou-se sob condições de hibridação de "baixo rigor" (veja-se adiante).

2. Seleccionou-se um clone de ADNc ( $\lambda$ gt11- $\alpha$ RIL5h8) a partir de uma biblioteca de ADNc humano (foram rastreadas  $2,4 \times 10^6$  placas) tomando como base a hibridação com ambos "oligonucleótido 1" e inserção do ADNc derivado de acordo com métodos conhecidos na especialidade, a partir do clone  $\lambda$ gt11- $\alpha$ RIL5m2 dos murinos.

Marcou-se o oligonucleótido 1 radioativamente por tratamento com quinase (Sambrook et al., s.a.) e hibridou-se sob condições de hibridação de "fraco rigor". A inserção de ADNc proveniente do  $\lambda$ gt11- $\alpha$ RIL5m2 foi marcada radioativamente por marcação aleatória (Sambrook et al., s.a.) e hibridou-se sob condições de hibridação de "rigor intermédio".

3. Seleccionou-se mais 5 clones de ADNc ( $\lambda$ gt11- $\alpha$ RIL5h11  $\rightarrow$  15) a partir de metade da biblioteca de ADNc humano rastreado em 2, utilizando a sonda de ADNc do  $\alpha$ RIL5m2. A hibridação foi efectuada sob condições

de "rigor intermédio".

4. Procedeu-se à selecção de mais 35 clones de ADNc ( $\lambda$ gt11-  $\alpha$  RIL5h16  $\rightarrow$  51) a partir da outra metade da biblioteca de ADNc humano rastreada em 2, utilizando a sonda de ADNc de  $\alpha$  RIL5h8. A hibridação foi efectuada sob condições de "elevado rigor" (veja-se adiante).

#### Condições de Hibridação

F) condições de hibridação de "fraco rigor":

-pré-hibridação: 5 x SSC (solução salina tamponada com citrato, conhecida na especialidade; veja-se, por exemplo, Sambrook et al., s.a.), 5 x meio de Denhardt 0,1 % de SDS, 0,05 % de pirofosfato de sódio, e ADN de esperma de salmão sonificado na proporção de 100  $\mu$ g/ml; durante a noite e á temperatura de 42°C.

-hibridação: substituiu-se o tampão de pré-hibridação pelo mesmo tampão mas incluindo a sonda marcada radioactivamente.

-lavagens: 4 lavagens consecutivas (cerca

de 30 minutos cada uma) com 2 x SSC, 0,1 % de SDS, à temperatura de 37°C:

I) condições de hibridação de "rigor intermédio":

- pré-hibridação: 20 % de formamida, 5 x SSC, 5 x meio de Denhardt, EDTA 5 mM, fosfato de sódio 25 mM (pH 6,5), 0,05 % de pirofosfato de sódio, ADN do esperma de salmão sonificado na proporção de 100 µg/ml; durante a noite e à temperatura de 42°C.
- hibridação: substituiu-se o tampão de pré-hibridação pelo mesmo tampão mas incluindo a sonda marcada radioactivamente.
- lavagens: 4 lavagens consecutivas (cerca de 30 minutos cada uma) com 2 x SSC, 0,1 % de SDS à temperatura de 37°C.

A) condições de hibridação de "alto rigor":

- pré-hibridação: 6 x SSC, 5 x meio de Denhardt, 0,5 % de SDS, ADN de esperma de salmão sonificado na proporção de 100 µg/ml; durante a noite e á temperatura de 68°C.
- hibridação: 6 x SSC, 5 x meio de Denhardt, 0,5 % de SDS, EDTA, 5 mM, ADN de esperma de salmão sonificado na proporção de 100 µg/ml incluindo a sonda marcada radioactivamente.



- lavagens: foram efectuadas as seguintes lavagens consecutivas (cerca de 30 minutos cada uma):
  - 2 x SSC, 0,1 % de SDS à temperatura ambiente (duas vezes).
  - 0,1 x SSC, 0,1 de SDS à temperatura de 68°C (duas vezes).

### Exemplo 6

#### Sequenciação

Todos os ADNc foram subclonados em vectores de tipo pGEM7zf (Promega Corp.) tendo sido gerados mutantes de supressão Exo III. Efectuou-se a sequenciação utilizando um protocolo com base no procedimento de Sanger e implicando a Taq polimerase e ADN de cordão simples, com o auxílio de um Sequenciador de ADN automático modelo 370A.

### Exemplo 7

#### Construção do plasmídeo "pαRIL5hs"

As construções plasmídicas foram efectuadas conforme descrito nos parágrafos seguintes. No caso de não haver referências ou pormenores específicos de preparação significa que foram utilizadas metodologias normaliza-

das de acordo com Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual (2nd edn). Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Procedeu-se à excisão da inserção a partir do fago  $\lambda$ gt11- $\alpha$ RIL5h12 (veja-se o Exemplo 5) utilizando as enzimas de restrição EcoR1 e Not1. As duas extremidades aderentes foram preenchidas utilizando o fragmento 1 de Klenow da polimerase do ADN de E. coli na presença dos quatro trifosfatos desoxinucleotídicos e adicionou-se ligantes BstX1 não palindrômicos utilizando ligase do ADN das T4. A sequência desses ligantes é a seguinte:

5' CTTTAGAGCACA 3'

3' GAAATCTC 5'.

Num passo posterior uniu-se ao plasmídeo pCDM8 a inserção modificada [Seed e Aruffo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 (1987), 3365; Aruffo e Seed, Proc. Acad. Sci. USA, 84, (1987) 8573; Seed, Nature, 329 (1987) 840] e seleccionou-se para análise a estrutura com a orientação adequada em relação ao promotor CMV.

### Exemplo 8

#### Transformação de MC1061(p3) de E. coli

A transformação de MC1061 (p3) de E. coli com o plasmídeo p $\alpha$ RIL5hs do Exemplo 7 foi efectuado através do procedimento de electroporação. Em conformidade com as

especificações do fabricante utilizou-se um "Gene Pulser da Bio-RAd" (Richmond, CA, USA) com as especificações seguintes: 25  $\mu$ F, 2,5 kV e 200 Ohms.

### Exemplo 9

#### Isolamento do ADN plasmídico

Preparou-se ADN plasmídico proveniente de MC1061 de E. coli transformado conforme descrito no Exemplo 8, recorrendo-se a um procedimento normalizado Birnboim e Doly, Nucl. Acids Res., 7 (1979) 1513; Sambrook et al., 1989, s.a.] com base na lise alcalina, seguindo-se um passo de ultracentrifugação em cloreto de césio. Por este processo separou-se o plasmídeo p $\alpha$ RIL5hs do plasmídeo p3. A inserção codificadora para  $\alpha$ RIL5hs foi cortada a partir do plasmídeo p $\alpha$ RIL5hs e sequenciada conforme descrito no Exemplo 6. A sequência completa do ácido nucleico e a sequência inferida de aminoácidos da  $\alpha$ RIL5hs encontram-se representadas na Figura 1.

### Exempl 10

#### Expressão da RIL5hs em células COS-1

Procedeu-se à transfecção de células COS-1 utilizando o protocolo DEAD-Dextran conforme descrito por Sambrook et al., 1989, s.a.. Resumidamente procedeu-se

à colheita de células COS-1 subconfluentes por tripsinização e novamente se procedeu à sua distribuição em placas de modo a obter-se uma densidade de  $2,3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, 24 horas antes da transfecção. As monocamadas foram lavadas duas vezes com uma quantidade mínima de meio essencial (MEM)-Hepes, pH 7,2 e efectuou-se a incubação durante 30 minutos com a mistura de transfecção [10 µg de p $\alpha$ RIL5hs isolado conforme descrito no Exemplo 9/0,5 mg de DEAD-dextrano (Mr =  $2 \times 10^6$ ; Pharmacia, Uppsala, Suécia)/ml MEM-Hepes, pH 7,2]. Seguidamente as células foram enriquecidas com 8 volumes de meio de Eagles pré-aquecido modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10 % de soro de vitela fetal (SVF) e difosfato de cloroquina 100 µM e depois efectuou-se a incubação durante 4 horas à temperatura de 37°C. Seguidamente removeu-se o meio por aspiração e procedeu-se à lavagem das monocamadas uma vez com DMEM e depois efectuou-se a incubação durante 3 dias em DMEM + 10 % de SVF.

### Exemplo 11

#### Caracterização da RIL5hs

Preparou-se sobrenadante de células COS-1 transfectadas com o plasmídeo p $\alpha$ RIL5hs, conforme descrito no Exemplo 10, e procedeu-se a um teste para confirmação da presença de  $\alpha$ RIL5hs secretada num ensaio de ligação por competição conforme se descreve a seguir: procedeu-

-se à separação de células COS-1 transfectadas conforme descrito no Exemplo 10 com um plasmídeo contendo um ADNe codificador para  $\alpha$ RIL5m (para conhecimento da sequência dos aminoácidos veja-se a Figura 1), cuja obtenção foi efectuada a partir de um clone conforme descrito no Exemplo 5 e cuja construção foi efectuada conforme descrito no Exemplo 7, por tratamento com uma solução salina tamponada com fosfato (STF) contendo EDTA 0,5 mM e 0,02 % de azeto de sódio, durante 30 minutos e à temperatura de 37°C, preparou-se nova suspensão na concentração de  $1,5 \times 10^5$  células por 0,3 ml de meio de ligação (DMEM + 10 % de SVF + 0,02 % de azeto de sódio) e incubou-se com  $^{125}\text{I}$ -IL5m 0,8 nM à temperatura de 4°C durante 1 hora na ausência (Figura 2; "-", ligação total) ou na presença (Figura 2; "+ frio", ligação não específica de um excesso 100 vezes de IL5 não marcado. O sobrenadante das células COS-1 (80 % de meio de ligação) transfectadas com p $\alpha$ RIL5hs (Figura 2, " $\alpha$ RIL5hs") foi testado para verificação da sua capacidade para inibir a ligação de  $^{125}\text{I}$ -IL5m. Efectuou-se também a ligação na presença de 80 % de sobrenadante de células COS-1 não transfectadas (Figura 2, "controlo"). Para se separar da radioactividade livre o  $^{125}\text{I}$ -IL5m ligado à membrana celular, deixou-se sedimentar células COS-1 através de uma amálgama oleosa de ftalato e procedeu-se à contagem dos grânulos individuais num contador de raios gama conforme descrito em [Plaetinck et al., J. Exp. Med., 172 (1990) 683-691].



### Exemplo 12

#### Construção do plasmídeo "p $\alpha$ RIL5h"

Procedeu-se ao isolamento dos ADNc que co-  
dificam a  $\alpha$ RIL5h praticando uma estratégia de reacção da  
cadeia da polimerase da extensão 3' (RCP) [Fritz et al., Nucl.  
Acid. Res., 19 (1991) 3747]. Uma vez que o ARNm que codifica  
a  $\alpha$ RIL5hs tem um comprimento aproximado de apenas 1350 ba-  
ses, os produtos da RCP derivados do ADNc que codificam a  
 $\alpha$ RIL5h podem ser seleccionados em função das suas dimensões.  
Em um primeiro passo procedeu-se à síntese do ADNc utili-  
zando como iniciador um hexamero aleatório, ligado em cadeia  
com um segmento conhecido de 27 bases na sua extremidade 5'.  
Depois realizou-se uma reacção da cadeia da polimerase entre  
um iniciador estimulador complementar da sequência da  $\alpha$ RIL5hs  
(veja-se a Figura 1) na posição 1036-1055, e um iniciador in-  
verso complementar da sequência posterior terminal (cauda) do  
hexamero aleatório. Embora a maior parte dos produtos de  
reacção sejam específicos, a análise da mancha de Southern  
revelou sequências  $\alpha$ RIL5 apenas nos casos em que se utili-  
zou ARNm de 15 células do clone HL60 induzido pelo buti-  
rato. Os fragmentos de ADN com mais de 350 pb foram purifi-  
cados e após a clivagem com NsiI e Sall foram subclonados  
num vector pUC18 (Pharmacia, Freiburg, BRD). Depois selec-  
cionou-se os subclones que codificam a  $\alpha$ RIL5h em um passo  
de hibridação da colónia. procedendo desse modo, seleccio-

nou-se também os ADN correspondentes á  $\alpha$ RIL5hs. A análise da sequência do ADN revelou depois que os subclones com inserções maiores do que 350 pb codificavam realmente a  $\alpha$ RIL5h. Depois gerou-se o ADNc da  $\alpha$ RIL5h com a sua configuração completa, por excisão da inserção efectuada com Nsil-Sbal (embotado) e a inserção em Nsil - NotI (embotado) abriu o vector p $\alpha$ RIL5hs (veja-se o Exemplo 7). A sequência completa do ADN da RIL5h e a sequência derivada de aminoácidos encontram-se representadas na Figura 3. A sequência do ADN caracteriza-se por uma modificação na posição 1243 da sequência do ADN da  $\alpha$ RIL5hs, resultando numa substituição da parte do terminal 3' por uma nova sequência que abrange a região transmembranal. O domínio citoplásmico tem um comprimento correspondente a 58 aminoácidos. Nesta curta cauda citoplásmica não é possível encontrar um domínio implicado nos processos de transdução do sinal.

## R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1.- Processo para a preparação de cadeias  $\alpha$  do receptor humano da interleucina 5 ou partes correspondentes que ainda se ligam à interleucina 5 humana, caracterizado por se cultivar células hospedeiras transformadas com um vector de expressão constituído por uma sequência de ADN que codifica a cadeia  $\alpha$  do receptor humano da interleucina 5 ou partes correspondentes que ainda se ligam à interleucina 5 humana.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a sequência de ADN codificar uma parte solúvel do receptor humano da interleucina 5, ligando-se ainda

2

essa parte solúvel à interleucina 5 humana.

3.- Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo facto de a sequência de ADN ser seleccionada entre as seguintes:

(a) sequência de ADN representada a seguir:

...

```

                                CCGCTGCTTCTC 12
ATCGCATGGCCACCCCATTTCTCAGGGCCAGGCACATTGAGCATTGGTCTCTGCTGACGCTATGCTAGATGCTGGGGT 91
TGCAGCCACGAGCATACACACGACACGCGTCTCTGCGCATCTTCTCTTGAATCTGCTCGGAACACAGAGGATCTCTCT 170
GTACACAGCGCTACAGATTGTTTTAGATTGAAGTTTTCTCTGTCATCTTCACTCATCTTTAAATCCCTCATAGTAAAAAGGAT 249

1  ATG ATC ATC GTC GCG CAT GTA TTA CTC ATC CTT TTG GGG GCC ACT GAG ATA CTG CAA GCT 309
   Met Ile Ile Val Ala His Val Leu Leu Ile Leu Leu Gly Ala Thr Glu Ile Leu Gln Ala
   --- --- --- Met Val Pro
   Val Leu Ala Thr

21 GAC TTA CTT CCT GAT GAA AAG ATT TCA CTT CTC CCA CCT GTC AAT TTC ACC ATT AAA GTT 369
   Asp Leu Leu Pro Asp Glu Lys Ile Ser Leu Leu Pro Pro Val Asn Phe Thr Ile Lys Val
   Asn His Lys Phe Leu
   Ala

41 ACT GGT TTG GCT CAA GTT CTT TTA CAA TGG AAA CCA AAT CCT GAT CAA GAG CAA AGG AAT 429
   Thr Gly Leu Ala Gln Val Leu Leu Gln Trp Lys Pro Asn Pro Asp Gln Glu Gln Arg Asn
   His Asp
   His

61 GTT AAT CTA GAA TAT CAA GTG AAA ATA AAC GCT CCA AAA GAA GAT GAC TAT GAA ACC AGA 439
   Val Asn Leu Glu Tyr Gln Val Lys Ile Asn Ala Pro Lys Glu Asp Asp Tyr Glu Thr Arg
   Asp Gln Glu Asp
   Asp

81 ATC ACT GAA AGC AAA TGT GTA ACC ATC CTC CAC AAA GGC TTT TCA GCA AGT GTC CGG ACC 549
   Ile Thr Glu Ser Lys Cys Val Thr Ile Leu His Lys Gly Phe Ser Ala Ser Val Arg Thr
   Lys Pro Glu Ala
   Ala

101 ATC CTG CAG AAC GAC CAC TCA CTA CTC GCC AGC AGC TGG GCT TCT GCT GAA CTT CAT GCC 609
   Ile Leu Gln Asn Asp His Ser Leu Leu Ala Ser Ser Trp Ala Ser Ala Glu Leu His Ala
   Lys Ser Ser Thr
   Lys

121 CCA CCA GGG TCT CCT GGA ACC TCA ATT GTG AAT TTA ACT TGC ACC ACA AAC ACT ACA GAA 669
   Pro Pro Gly Ser Pro Gly Thr Ser Ile Val Asn Leu Thr Cys Thr Thr His Thr Val Val
   Val Thr
   Val Val

141 GAC AAT TAT TCA CGT TTA AGG TCA TAC CAA GTT TCC CTT CAC TGC ACC TGG CTT GTT GCC 729
   Asp Asn Tyr Ser Arg Leu Arg Ser Tyr Gln Val Ser Leu His Cys Thr Trp Leu Val Gly
   Ser Ser His Thr His Pro
   Arg

161 ACA GAT GCC CCT GAG GAC ACG CAG TAT TTT CTC TAC TAT AGG TAT GGC TCT TGG ACT GAA 739
   Thr Asp Ala Pro Glu Asp Thr Gln Tyr Phe Leu Tyr Tyr Arg Tyr Gly Ser Trp Thr Glu
   Lys Phe Val Leu
   Phe

181 GAA TGC CAA GAA TAC AGC AAA GAC ACA CTG GGG AGA AAT ATC GCA TGC TGG TTT CCC AGG 849
   Glu Cys Gln Glu Tyr Ser Lys Asp Thr Leu Gly Arg Asn Ile Ala Cys Trp Phe Pro Arg
   Lys Arg Ala Asn
   Thr

201 ACT TTT ATC CTC AGC AAA GGG CGT GAC TGG CTT TCG GTG CTT GTT AAC GGC TCC AGC AAG 909
   Thr Phe Ile Leu Ser Lys Gly Arg Asp Trp Leu Ser Val Leu Val Asn Gly Ser Ser Lys
   Asn Phe Glu Gln Ala His Ile
   His Ile

221 CAC TCT GCT ATC AGG CCC TTT GAT CAG CTG TTT GCC CTT CAC GCC ATT GAT CAA ATA AAT 969
   His Ser Ala Ile Arg Pro Phe Asp Gln Leu Phe Ala Leu His Ala Ile Asp Gln Ile Asn
   Arg Ala Lys
   Val

241 CCT CCA CTG AAT GTC ACA GCA GAG ATT GAA GGA ACT CGT CTC TCT ATC CAA TGG GAG AAA 1029
   Pro Pro Leu Asn Val Thr Ala Glu Ile Glu Gly Thr Arg Leu Ser Ile Gln Trp Glu Lys
   Arg Val
   Ser Asn Ser Tyr

261 CCA GTG TCT GCT TTT CCA ATC CAT TGC TTT GAT TAT GAA GTA AAA ATA CAC AAT ACA AGG 1089
   Pro Val Ser Ala Phe Pro Ile His Cys Phe Asp Tyr Glu Val Lys Ile His Asn Thr Arg
   Leu Asp
   Lys

281 AAT GGA TAT TTG CAG ATA GAA AAA TTG ATG ACC AAT GCA TTC ATC TCA ATA ATT GAT GAT 1149
   Asn Gly Tyr Leu Gln Ile Glu Lys Leu Met Thr Asn Ala Phe Ile Ser Ile Ile Asp Asp
   His Ile Lys
   Lys

301 CTT TCT AAG TAC GAT GTT CAA GTG AGA GCA GCA GTG AGC TCC ATG TCC AGA GAG GCA GGG 1209
   Leu Ser Lys Tyr Asp Val Gln Val Arg Ala Ala Val Ser Ser Met Cys Arg Glu Ala Gly
   Val Thr Ser Ile
   Met Pro

321 CTC TGG AGT GAG TGG AGC CAA CCT ATT TAT GTG GGG TTC TCA AGA TAA AGGAGATAACATCCA 1272
   Leu Trp Ser Glu Trp Ser Gln Pro Ile Tyr Val Gly Phe Ser Arg End
   Arg Gly
   Lys Glu

GCTTTCTGCCCCACCCGTATCTGAAATAAAAAACACAGCAGGGATAGCAGATTAAAAA 1351

```

e também os seus cordões complementares, ou os que incorporam essas sequências;

(b) sequências de ADN que hibridam com sequências de finidas em (a) ou os seus fragmentos;

(c) sequências de ADN que, devido à degeneração do código genético, não hibridam com sequências definidas em (a) e (b), mas que codificam polipeptidos que têm exactamente a mesma sequência de aminoácidos.

4.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo facto de as células hospedeiras serem procarióticas ou eucarióticas.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de as referidas células hospedeiras eucarióticas serem células hospedeiras de mamíferos.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de as referidas células hospedeiras de mamíferos serem células CHO ou COS.

7.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo facto de o vector de expressão ser do tipo pSV2, pRSV, pBC12MI, pMSG ou pCDM8.

8.- Processo para a preparação de uma composição farmacêutica, caracterizado pelo facto de se incorporar, como ingrediente activo, uma quantidade eficaz de um composto quando preparado de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em conjunto com um veículo inerte, não tóxico, terapêuticamente compatível, eventualmente com outras substâncias farmacêuticamente activas.

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

*Agilham*