

MEMÓRIA DESCRITIVA

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 94.016

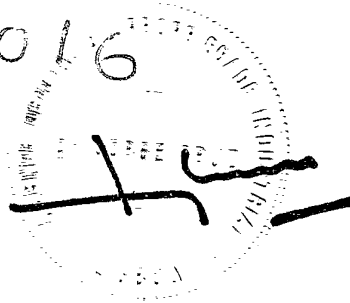
NOME: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial, em
D-5090 Leverkusen, Bayerwerk, R.F.A.

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE INIBIDORES DE
PROTEINASES"

INVENTORES: HANS FRITZ, WOLFGANG GEBHARD e RATHINDRA DAS

**Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo
4º da Convenção da União de Paris de 20 de Março de 1883.
13 de Maio de 1989 e 18 de Janeiro de 1990 sob os Nos.
P 39 15 689.3 e P 40 01 244.1 na República Federal Alemã**

94.016



MEMÓRIA DESCRITIVA

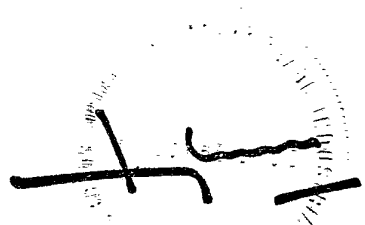
Resumo

O invento diz respeito a um processo para a produção de variantes peptídicas baseadas nos domínios que têm actividade inibidora de bicunina humana (ou seja os componentes que têm a actividade inibidora do inibidor da inter- α -tripsina, ou do inibidor da tripsina do soro, estável aos ácidos, ou do inibidor da tripsina urinária), por métodos de manipulação genética usando microorganismos (bactérias, eucariotas inferiores), assim como de medicamentos contendo estas variantes peptídicas. As variantes peptídicas são caracte-

=====

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEINASES"



rizadas pela sua capacidade para inibir proteases serina, por exemplo elastase pancreática e granulocítica, catepsina G ou calicreína do plasma.

O invento engloba variantes de peptídeos baseados nos domínios com a actividade inibidora da bicunina humana (ou seja o componente tendo a actividade inibidora do inibidor da inter- α -tripsina ou do inibidor da tripsina sérica estável aos ácidos ou do inibidor de tripsina urinária), processo para a preparação das variantes de peptídeos descritas por métodos da manipulação genética usando microorganismos (bactérias, eucariotas inferiores), assim como medicamentos contendo estas variantes de peptídeos. As variantes de peptídeos são caracterizados pela sua capacidade para inibir proteases serina, por exemplo elastase pancreática e granulocítica, catepsina G ou calicreina do plasma.

Quando as proteases atingem o espaço extracelular elas são normalmente apanhadas rapidamente por fortes inibidores de proteases endógenos como seja o inibidor de α_1 -proteinase (Travis & Salvesen, Ann. Rev. Biochem, 52, 655, 1983). Em certas situações este mecanismo protector pode não funcionar ou pelo menos não funcionar adequadamente e a consequência pode ser estados patológicos graves tais como o desenvolvimento de enfisema, choque séptico, pulmão em choque ARDS, artrite reumatóide, perturbações da coagulação, fôlha renal e do fígado, inter alia. Os inibidores de proteinases com uma acção específica são de especial interesse neste contexto como potenciais agentes terapêuticos. Os inibidores de proteinases que são particularmente interessantes para usar com humanos têm sequências de aminoácidos semelhantes às dos inibidores humanos naturais. Isto aplica-se particularmente às terapias a longo prazo tais como o tratamento de deficiências de inibidores de α_1 -proteínas (desenvolvimento de enfisema) para evitar efeitos secundários tóxicos ou alérgicos.

Se bem que o inibidor da α_1 -proteinase seja a antagonista natural da elastase neutrofílica, cuja inibição extracelular é a principal finalidade em caso de inflamação, não é óptimamente adequada ao uso em terapêutica por vários motivos. O seu peso molecular relativamente elevado

4-

de 53 000 d requeria o uso de grandes quantidades não fisiológicas por peso do inibidor. Se bem que as quantidades necessárias possam ser obtidas por meio de engenharia genética seria necessário usar quantidades ainda maiores do inibidor devido à reduzida meia-vida biológica em circulação de uma proteína recombinante que não é glicosilada da maneira fisiológica (Matheson et al., J. Biol. Chem. 261, 10404, 1986). Em qualquer dos casos o inibidor é encarado como susceptível à proteólise e oxidação.

Ambas as propriedades reduzem mais a concentração das espécies activas. Apenas a susceptibilidade à oxidação poderá ser eliminada por meio de engenharia genética através da substituição de resíduo metionina no centro reactivo dos inibidores (posição P_1) por exemplo por leucina (McCourtney et al., Nature 313, 149, 1985).

O objectivo do presente invento é desenvolver inibidores de proteinases, por exemplo contra elastase de leucócitos humanos, catepsina G de calicreina do plasma tendo uma massa molecular distintamente mais baixa, para o tratamento de doenças humanas. Neste contexto o objectivo foi avaliar se é possível modificar inibidores de proteinases de modo a terem um espectro de inibição pretendido através da modificação dos inibidores humanos já conhecidos. Consideram-se como moléculas básicas adequadas a isto a subunidade tendo actividade inibidora do inibidor da inter- α -tripsina humana ITI (Schreitmüller et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 368, 963, 1987; Gebhard et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369S, 19, 1988; Gebhars et al., FEBS Lett, 299, 63, 1988; Gebhard et al., Europ.J. Biochem., no prelo), o qual daqui em diante é designado bicunina (Fig. 1), assim como os inibidores da tripsina tipo Kunitz de estrutura idêntica no soro (STI) e na urina (UTI), se fosse possível substituir alguns resíduos de aminoácidos para conseguir uma alteração específica do espectro de inibição natural destes inibidores (Fig 1). Eles são o resultado da maturação proteolítica do produto da trução primária

de um único gene (Kaumeyer et al., Nucleic. Acids Res. 14, 7839, 1986) e consiste num peptídeo N-terminal o qual pode ser eliminado com tripsina (resíduos de aminoácidos 1-21) e dois domínios consecutivos estruturalmente relacionados (domínio 1 é o domínio N-terminal, definido como os resíduos de aminoácidos 22-77 e o domínio 2 é a parte C-terminal da proteína, definido como os resíduos de aminoácido 78-147) e estes podem também ser obtidos isoladamente por tratamento com tripsina. Ambos os domínios têm actividade inibidora da proteinases de diferentes especificidade inibidora (Gebhard & Hochstra Ber em: "Proteinase Inhibitors", Barrett & Selvesen, eds., Elsevier, 1986, p. 375).

Dependendo da situação fisiológica particular, a proteína de fase aguda bicumina pode estar presente na forma complexada (em ITI ou num complexo com imuno globulinas) e na forma não complexada, que é então detectável como STI, UTI é STI que sofreu filtração renal. Assim, os inibidores individuais diferem apenas em estarem associados ou não a outras proteínas ou serem detectados em diferentes fluidos do corpo.

Inibidores específicos e fortes, por exemplo da elastase neutrofílica, catepsina G ou calicreína plasmática, baseados em domínios de bicunina foram obtidos por substituição de resíduos de aminoácidos na posição P_1 dos centros reactivos do domínio I ou domínio II do inibidor. Ainda, substituições adicionais nos domínios, por exemplo em particular na posição P_2' , são capazes de melhorar ainda as propriedades inibidoras.

Assim o presente invento está relacionado de um modo geral com variantes de inibidores tipo Kunitz cujo espectro de inibição foram alterados devido à substituição de um resíduo de aminoácido natural, não só na posição P_1 mas também na posição P_2^1 do centro reactivo, por um outro resíduo de aminoácido natural, especificamente com os ini-

bidores que foram obtidos na base dos domínios isolados ou os domínios ligados uns aos outros, da bicunina humana, desde que as propriedades inibidoras do inibidor natural ou dos seus domínios individuais tenham sido alterados e/ou melhorados por substituição dos resíduos de aminoácidos naturais nas posições P_1 e/ou P_2' dos centros reactivos de um ou de ambos os domínios por qualquer um dos aminoácidos naturais, mas em particular pelos aminoácidos do grupo compreendendo Ala, Gli, Ile, Len, Arg, Fen, Val, Ter, Trp, e His. Ainda, o invento também está relacionado com as construções que formam as bases das variantes dos inibidores, independentemente da escolha particular de codões e da ligação das regiões de cDNA natural com tal DNA sintético.

Ainda, o presente invento também está relacionado com variantes de bicunina em que, "além das substituições numa ou em ambas as posições P_1 assim como numa ou em ambas as posições P_2' , existem também outras substituições noutras posições. Substituições adicionais deste tipo podem ainda melhorar mais as propriedades inibidoras pretendidas, resultam num comportamento farmacocinético mais favorável, prolongam a meia-vida in vivo ou resultam numa preparação industrial mais favorável.

Finalmente, o presente invento também engloba variantes de bicunina tendo segmentos peptídias N-terminais e C-terminais que diferem, em natureza e grau, nos resíduos cisteína nas posições 26 e 76 (domínio 1 do inibidor) e 82 e 132 (domínio 2 do inibidor) que são necessários à formação das estruturas básicas. Os limites dos domínios originalmente definidos (Lis²² e Arg⁷⁷ do domínio inibidor 1 e Tre⁷⁸ e Asn¹⁴⁷ do domínio inibidor 2) foram definidos com base na divisão em peptídeos funcionais que podem ser conseguidos com tripsina e não coincidem exactamente com as regiões de exão as quais foram agora determinadas (Vetr et al., FEBS Lett, no prelo, 1989). De acordo com isto, os dois domínios inibidores seriam limitativos pelos resíduos de aminoácidos Asp²⁴ e Val⁷⁹,

e Ala⁸⁰ e Asp¹³⁷, respectivamente (Fig. 1). Dependendo do sistema de expressão usado, as construções de genes individuais podem codificar extensões peptídicas N- ou C-terminais, independentemente de elas serem retidas no todo ou em parte, na variante do inibidor final e funcionam apenas temporariamente como parte de uma proteína precursora e destas extensões podem ser atribuídas à bicumina natural ou a uma proteína estranha.

Por exemplo, a sequência N-terminal Met¹⁸-Tre¹⁹-Val²⁰-Lis²¹, que é idêntica à sequência de aminoácidos natural da bicumina exceptuando o resíduo metionina, pode com vantagem ser usada para se obter, por clivagem com tripsina, um único produto que corresponde à composição do domínio I originalmente definido. Deste modo é também possível remover domínios da bicumina de construções com um segmento proteico N-terminal estranho. Em expressão directa (sem um segmento proteico estranho N-terminal) pode-se esperar que a eliminação da metionina N-terminal seja parcial ou mesmo completa. Para evitar a possibilidade de remoção da arginina C-terminal em construções de um resíduo de um único domínio I em aplicação terapêutica, nalguns casos são preferidos as extensões C-terminais.

A expressão de variantes da bicumina ou de fragmentos de variantes da bicumina pode ser efectuada com êxito usando sistemas bacterianos ou eucarióticos. Assim, sistemas bacterianos adequados podem ser, por exemplo, a expressão em estirpes de Escherichia coli K12; na forma não fundida no citoplasma ou como proteína de fusão formada dentro da célula e ligada a um parceiro de fusão adequado, por exemplo à parte N-terminal da replicase MS2, ou como produto que possui actividade inibidora e é secretado para o espaço periplástico usando peptídeos sinal adequados, por exemplo da sequência sinal OmpA.

São sistemas eucarióticos adequados, por exemplo sistemas de secreção de levedura em que o produto de expressão é conduzido por uma sequência líder adequada, por exemplo a pre-pro-sequência do factor alfa, através da via de secreção e é libertado para o meio de cultura como substância tendo actividade inibidora. É ainda possível usar sistemas de expressão de levedura que resultem em síntese intracelular.

No entanto, é ainda possível usar muitos outros sistemas de expressão procarióticas e eucarióticas, por exemplo usando estirpes de Bacillus, Staphylococcus, Hansemela, Aspergillo ou outras estirpes hospedeiras.

Se o objectivo fôr conseguido por glicosilação semelhante à presente em mamíferos, devem ser escolhidos sistemas que glicolisam correctamente. Nos sistemas de expressão procarióticos são obtidas variantes de bicunina não glicosiladas. Os sistemas de expressão de levedura geralmente resultam numa glicosilação que difere do padrão de glicosilação dos mamíferos. As variantes de bicunina não glicosilados obtidos com sistemas de expressão de levedura podem ser preparadas usando enzimas de desglicosilação ou pela expressão de variantes que não podem ser glicosiladas.

O presente invento inclui preparações farmacêuticas que além excipientes não tóxicos, inertes e farmacêuticamente adequados contêm um ou mais compostos de acordo com o invento ou que consistem num ou mais compostos activos de acordo com o invento e processos para a produção destas preparações.

O presente invento também inclui preparações farmacêuticas em unidades de dosagem. Isto significa que as preparações são na forma de partes individuais, por exemplo comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas, pilulas, supositórios e ampolas, para as quais o teor de substân-

cia activa corresponde a uma fracção ou a um múltiplo de uma dose individual. As unidades de dosagem podem conter, por exemplo, uma, duas, três ou quatro doses individuais ou um meio, um terço, ou um quarto de uma dose individual. Uma dose individual de preferência contem a quantidade de composto activo que é dada numa administração e que geralmente corresponde a um todo, um meio ou um terço ou um quarto da dose diária.

Por excipiente não tóxicos, inertes e farmacêuticamente adequados deve-se entender diluentes sólidos, semi-sólidos ou líquidos, agentes de preenchimento e auxiliares de formulação de todos os tipos.

Os comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas, pílulas, grânulos, supositórios, soluções, suspensões e emulsões, pastas, pomadas, géis, cremes, loções, pós e vaporizadores podem ser referidos como preparações farmacêuticas preferidas.

Comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas, pílulas e grânulos podem conter o composto ou compostos activos juntamente com os excipientes habituais tais como (a) agente de preenchimento e ampliação, por exemplo amidos, lactose, sucrose, glucose, manitol e silica, (b) ligantas, por exemplo carboximetilcelulose, alginatos, gelatina, e polivinilpirrolidona, (c) humidificantes, por exemplo glicerina, (d) agentes desintegrantes, por exemplo agar-agar, carbonato de cálcio e carbonato de sódio, (e) retardados de solubilização, por exemplo parafina e (f) aceleradores de absorção, por exemplo compostos de amónio quaternário, (g) agentes molhantes por exemplo álcool cetílico ou monostearato de glicerina, (h) absorventes, por exemplo caulino e bentonite e (i) lubrificantes, por exemplo talco, estearato de cálcio e estearato de magnésio e polietilenoglicóis sólidos ou misturas das substâncias apresentadas de (a) a (i).

Os comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas, pílulas e grânulos podem ser providos dos revestimentos e cápsulas habituais, facultativamente contendo agentes de opacificação e podem ter uma composição tal que libertem o composto ou compostos activos apenas, ou preferencialmente, numa determinada parte do trato intestinal, facultativamente de modo retardado, sendo exemplo de composições de embebição, que podem ser usados, os polímeros e cêras.

O composto ou compostos activos, facultativamente juntamente com um ou mais dos excipientes atrás referidos, podem ser também numa forma micro-encapsulada.

Os supositórios podem conter, além do composto ou compostos activos, os excipientes habituais solúveis ou insolúveis em água, por exemplo polietilenoglicóis, gorduras, por exemplo manteiga de cacau e esteres superiores (por exemplo um álcool C_{14} com um ácido gordo C_{16}) ou misturas destas substâncias.

Pomadas, pastas, cremes e géis podem conter os excipientes habituais além do composto ou compostos activos, por exemplo gorduras animais e vegetais, cêras, parafinas, amido, tragacanto, derivados da celulose, polietilenoglicóis, silicones, bentonites, sílica, tragacanto, derivados da celulose, polietilenoglicóis, silicones, bentonites, sílica, talco e óxido de zinco ou misturas destas substâncias.

Os pós e pulverizadores podem conter os excipientes habituais além do composto ou compostos activos, por exemplo lactose, talco, sílica, hidróxido, silicato de cálcio e pós de poliamida ou misturas destas substâncias. Os pulverizadores podem ainda conter os propelantes habituais, por exemplo clorofluoro-hidrocarbonestros.

As soluções e emulsões podem conter os excipientes convencionais além do composto ou compostos activos, tais como solventes, agentes de solubilização e emulsionantes, por exemplo água, álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, álcool benzílico, benzoato de benzilo, propilenoglicol, 1,3-butilenoglicol, dimetilformamida, óleos, especialmente óleo de sementes de algodoeiro, óleo de amendoim, óleo de gérmen de milho, azeite, óleo de castor e óleo de sésamo, glicerina, glicerinoformol, álcool tetra-hidrofurfurílico, polietilenoglicóis e ésteres de ácidos gordos e sorbitano ou misturas destas substâncias.

Para administração parentérica, as soluções e emulsões podem ser também na forma esterilizada que é isotónica com o sangue.

As suspensões podem conter os excipientes habituais além do composto ou compostos activos, tais como diluentes líquidos, por exemplo água, álcool etílico ou propilenoglicol, agentes para suspensão, por exemplo alcoois isostearílicos etoxilados, ésteres de polioxietilenossorbitol e ésteres de sorbitano, celulose microcristalina, meta-hidróxido de alumínio, bentonite, agar-agar e tragacanto ou misturas destas substâncias.

As formas de formulação mencionadas podem também conter corantes, preservativos e aditivos que melhoram o odor e sabor, por exemplo óleo de hortelã-pimenta e óleo de eucalipto e adulcorantes por exemplo sacarina.

Os compostos terapêuticamente activos de preferência deverão estar presentes nas preparações farmacêuticas atrás referidas numa concentração de 0,1 a 99,5% por peso, de preferência cerca de 0,5 a 95% por peso da mistura total.



As preparações farmacêuticas atrás referidas podem também conter outros compostos farmacêuticos activos além dos compostos de acordo com o invento.

As preparações farmacêuticas atrás referidas são produzidas como habitualmente de acordo com métodos conhecidos, por exemplo misturando o composto activo ou os compostos activos com o excipiente ou excipientes.

Os compostos activos ou as preparações farmacêuticas podem ser administradas localmente, oralmente, parenteralmente, intraperitonealmente e/ou rectalmente, de preferência oralmente ou parenteralmente, especialmente intravenosamente ou intramuscularmente.

Em geral mostrou-se vantajoso, tanto na medicina humana como na medicina veterinária, administrar o composto ou compostos activos de acordo com o invento em quantidades totais de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 500, de preferência 4 a 100, mg/kg de peso do corpo todas as 24 horas, facultativamente na forma de várias administrações individuais, para se conseguir os melhores resultados. Uma administração individual contém o composto activo ou os compostos activos de acordo com o invento de preferência em quantidades de aproximadamente 1 a aproximadamente 250, especialmente 3 a 60, mg/kg de peso de corpo. No entanto, pode ser necessário fazer um desvio da dose mencionada e em particular fazê-lo em função da natureza e peso do corpo do sujeito a ser tentado, da natureza e da gravidade da doença, da natureza da preparação e da administração do medicamento e o tempo ou intervalo ao longo do qual se faz a administração.

Assim, nalguns casos pode ser suficiente usar uma quantidade inferior à referida para o composto activo enquanto noutras casos a quantidade referida do composto activo deve ser excedida. A dosagem óptima particular necessária e o tipo de administração dos compostos activos podem

ser facilmente decididos por alguém dentro da matéria com base no seu conhecimento especializado.

Métodos

Os métodos usados para a clivagem de DNA com enzimas de restrição, para o preenchimento dos extremos protuberantes com dNTP na presença de DNA-polimerase I (fragmento klenow), para digestão com nuclease de Phaseolus aureus, electroforese em gel de DNA, isolamento de fragmentos de DNA, ligação de fragmentos de DNA, para a transformação de E. coli e para hibridação de colónias foram os métodos convencionais descritos por Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor (1982), tendo em consideração a informação dos fabricantes (enzimas de restrição da Boehringer Mannheim (Mannheim), Biolabs (Schwalbach), Pharmacia (Freiburg); nuclease de Phaseolus aureus, Pharmacia e células E. coli competentes, BRL, Eggenstein).

Síntese Química de Oligonucleotídeos.

Os oligonucleotídeos foram sintetizados num Pharmacia Gene AssemblerTM usando química de fosforamideto bem estabelecido (β -cianoetil N,N-diisopropilfosforamideto) e purificado por electroforese em gel de poliacrilamida desnaturante.

Sequenciação de DNA

Para verificar a sequência de DNA das construções de genes individuais, DNA de cadeia dupla foi

directamente sequenciado pelo método de Chem & Seeburg (DNA, 4, 165, 1985) em ambas as cadeias para cada caso.

Transformação de leveduras

100 ml de uma suspensão de células da estirpe de levedura SC 106 (MAT-alfa, hom 3, gal 2, his 6, ura 3; estirpe S2207A, Yeast Genetics Stock Center, University of California, Berkeley, CA 9472, USA) com uma concentração celular de 2×10^7 por ml foram centrifugados; o sedimento de células foi lavado uma vez com 5 ml de tampão TE (10 mM Tris x HCl, pH 7,5, 1mM EDTA) e depois com 5 ml de tampão LiA (acetato de lítio 0,1M em tampão TE). As células foram então ressuspensas em 1 ml de tampão LiA e incubadas a 30°C durante 1 hora. As células competentes obtidas assim foram guardadas a 4°C durante 1 dia. A transformação foi efectuada do seguinte modo:

10 µl da solução de plasmídeo (1-5 µg de DNA) e 15 µl de um DNA veículo (DNA desnaturado de espermatozoides de arenque, 3 mg/ml) foram adicionados a 0,1 ml de suspensão celular. A incubação a 30°C durante 30 minutos foi seguida da adição de 0,7 ml de polipropilenoglicol (polipropilenoglicol 3250 a 40% em tampão LiA) e ainda incubação a 30°C durante 60 min. As células então foram sujeitas a choque térmico (42°C, 5 min) e subsequentemente centrifugada numa "microfuge" Eppendorf durante 4 seg. O sedimento de células foi lavado duas vezes com 0,5 ml de tampão TE de cada vez e as células foram então ressuspensas em 0,1 ml de tampão TE e semeadas num meio nutritivo selectivo. Os transformantes foram obtidos após 3 dias.

Crescimento dos transformantes e análise dos produtos de secreção

Os transformantes foram cultivados em meio SD (0,67% da base azotada de leveduras sem aminoácidos, 2% D-glucose) suplementado com treonina, metionina e histidina (20 mg/litro de cada) a 30°C. Após ter sido atingida numa densidade adequada, as células foram centrifugadas e medida a actividade inibidora de tripsina ou elastase no sobrenadante de cultura.

Electroforese em gel de poliacrilamida

As proteínas foram habitualmente detectadas por electroforese em gel de SDS-poliacrilamida (Laemmli, Nature 277, 680, 1970) e coloração com azul brilhante Coomassie.

Análise de aminoácidos

Cerca de 1 nmol de proteína foi incubado na presença de 200 µl de 6M HCl, 0,05% de β-mercaptoetanol a 110°C sob vácuo durante 22 h. O hidrolisado foi seco, dissolvido em 150 µl de tampão citrato de sódio 0,2M, pH 2,2 e filtrado. A análise de aminoácidos foi efectuada num analisador de aminoácidos Biotronic LC500 com detector de fluorescência e integrador Shimadzu C-R2AX. Os aminoácidos foram quantificados após reacção com ftalaldeído de acordo com a literatura Benson & hare, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 619 (1975)).

Sequenciação de aminoácidos

1-2 nmoles de proteína dissolvida em 30 ul de ácido trifluoroacético foram aplicados a filtros de fibra de vidro tratados com Polybrene e sequenciados num sequenciador de fase gasosa (Applied Biosystems) pelo método de Hewick et al., J. Biol. Chem. 256, 7990 (1981). Os derivados de feniltioidantoína foram separados e analisados com a ajuda de uma coluna de HPLC ciano (Dopont) como descrito por Beyrenther et al., Modern Methods in Protein Chemistry, 303-325, Walter de Gryter, Berlin (1983), usando um sistema de HPLC Waters.

Ensaio de inibição da tripsina

A actividade de tripsina foi determinada usando o método de Geiger & Fritz, Methods of Enzymatic Analysis, Vol. V, 3ª ed., Bergmeyer (ed.), Verlag Chemie Weinheim (1984) p. 121 com p-nitroanilida de benzoil-L-arginina como substrato. A p-nitroanilina libertada foi medida num espectrofotómetro a 405 nm. A enzima e inibidor foram pré-incubados durante 15 minutos antes da adição do substrato.

Ensaio de inibição da elastase

A elastase de leucócitos humanos foi adquirida a Elastina Products Company Inc., P.O. Box 147, Pacific, Miss. 63069/USA. O substrato usado foi MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA (Bachem, Budendorf, Switzerland): As condições do ensaio estão indicadas na Tabela 1. Em geral, as amostras de inibidor foram diluídas com tampão de ensaio, adicionou-se enzima e a mistura foi então pré-incubada. A reacção

foi iniciada pela adição de substrato (dissolvido em DMSO numa concentração de 0,1M e ajustado à concentração da solução "stock" com tampão) e a libertação de p-nitroanilina a partir do substrato foi seguido continuamente a 405 nm. Os valores de 100% foram determinados em ensaios correspondentes sem inibidores. A inibição (em percentagem) foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{OD na presença de inibidor}}{\text{OD na ausência de inibidor}} \right]$$

Tabela 1: Condições para o ensaio de inibição da elastase (Nakajima et al., 254, 4027, 1979).

Tampão	0,2M Tris/HCl, pH 8,0 + 0,1% Tween 80
Volume total após adição do substrato	0,65 ml
Quantidade de enzima/ensaio	50 ng
Tempo de pré-incubação à temperatura ambiente	30 minutos
Substrato	MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-PNA
Solução "stock"	0,065M
Quantidade/ensaio	0,1 ml
Temperatura de ensaio	30°C

EXEMPLO 1Construção de variantes do gene bicunina e expressão em E. coli

As variantes individuais de genes da bicunina baseiam-se no mRNA natural por um lado e em genes sintéticos dos domínios individuais, ou partes deles por outro lado. Os clones de cDNA foram obtidos a partir de bancos de cDNA adequados por hibridação com sondas oligonucleotídicas (Kaumeyer et al., Nucleic Acids Res. 14, 7839-7849, 1986) ou por despiste com anticorpos contra inibidor de inter- α -tripsina humana (Schreitmüller et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368, 963-970, 1987). Os genes sintéticos (primeiro domínio) ou segmentos de genes (segundo domínio) foram obtidos como se segue:

Construção do gene de $[1-17, 78-147]_{\text{Met}}^{18}\text{-Xaa}^{36}\text{-Xaa}^{38}\text{-bicunina}$ com, por exemplo, Xaa=Ile, Leu, Met ou Val

Os genes para o primeiro domínio (de $[1-17, 78-147]_{\text{Met}}^{18}\text{-bicunina}$) e suas variantes (de $[1-17, 78-147]_{\text{Met}}^{18}\text{-Xaa}^{36}\text{-Xaa}^{38}\text{-bicunina}$ com, por exemplo, Xaa=Ile, Leu, Met ou Val) foram construídos a partir de dois módulos que foram gerados por síntese completa e que podem ser removidos, individualmente ou em conjunto, a partir destes genes por clivagem com a combinação adequada de enzimas de restrição Neo I, Asp 718 e Sal I. A construção facilita a manipulação dos genes em vários sistemas vectores e, via sítio de restrição interno Asp 718, a substituição dos módulos para a preparação das variantes (Fig 2).

O módulo 1 engloba os oligonucleotídeos 1-6 e o módulo 2 os oligonucleotídeos 7-12. As construções de $\text{Xaa}^{36}\text{-Xaa}^{38}$ requerem apenas a substituição do módulo 1.

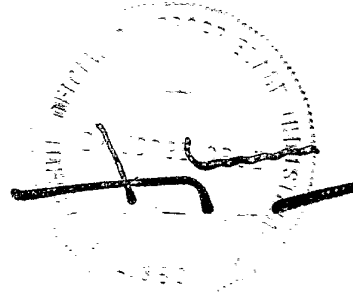
Para construir variantes do módulo 1, os oligonucleotídeos 2, 3, 5 e 6 foram substituídos sempre que necessários por variantes de oligonucleotídeos em que o codão para metionina (ATG) foi substituído por um de isoleucina (ATC), leucina (CTG) ou valina (GTT) ou a sua sequência complementar na cadeia oposta. A sequência N-terminal V-T-K é parte do peptídeo N-terminal natural. O único aminoácido estranho é a metionina do início cuja eliminação pode ser conseguida na expressão directa do gene em E. coli in vivo.

A estratégia de clonagem está descrita na Fig. 3. O plasmídeo pTZ18NCO foi preparada por clivagem de pTZ18R (Pharmacia) com EcoRI, tratamento com nucleasse de Phaseolus aureus, ligação com a sequência polindrómica 5'-ACCATGGT-3' e transformação de E. coli DH5. A construção foi verificada por análise da sequência.

Os plasmídeos pTZMOD1 e pTZMOD1XX (XX=IL, LM, MM, LL, VL) foram caracterizados por sequenciação após clivagem do plasmídeo pTZ18NCO com NcoI e Asp178, ligação do plasmídeo linearizado com os oligonucleotídeos 1-6 (módulo 1, Fig. 2) ou os correspondentes variantes de oligonucleotídeos, as quais foram fosforilados com cinase de polinucleotídeos transformação de E. coli DHS, hibridação de colónias com o oligonucleotídeo 4 marcada radioactivamente e isolamento de DNA de plasmídeo.

O plasmídeo pTZKUN1 foi isolado após clivagem do plasmídeo pTZMOD1 com Asp718 e SalI, ligação do plasmídeo linearizado com os oligonucleotídeos 7-12 (módulo 2, Fig. 2) que tinham sido fosforilados com cinase de polinucleotídeos, transformação de E. coli DH5 e hibridação de colónias com o oligonucleotídeo 11 marcado reactivamente e caracterizado por sequenciação do DNA de plasmídeo.

Para construir os plasmídeos pTZKUN1XX (XX=IL, LM, MM, LL, VL) usou-se o fragmento do módu-



lo 2lremovido de pTZKUN1 com Asp 718 e SalI, em vez dos oligonucleotídeos individuais 7-12 deste módulo e o processo para a construção foi análogo aos já descritos.

Construção de genes de L^{1-17} -Met¹⁸-Xaa³⁶-Xaa³⁸-bicunina

Os genes da bicunina do tipo de L^{1-17} -Met¹⁸-Xaa³⁶-Xaa³⁸-bicunina são variantes de dois domínios com substituições de aminoácidos apenas no primeiro domínio. Eles foram obtidos por condensação do gene sintético do primeiro domínio ou das suas variantes com um fragmento de gene natural do segundo domínio. A estratégia de clonagem está descrita na Fig. 4.

O plasmídeo pTZBIK foi obtido a partir do cDNA de um clone de α_1 -microglobulina-bicunina (pTZ18MB1) que foi clonado no plasmídeo pTZ18K por clivagem com a nuclease de restrição San3A. Isto gerou o fragmento A (Fig. 4) que foi isolado por electroforese em gel, O fragmento possui a sequência quase completa do gene da bicunina sem a fracção codificadora da α_1 -macroglobulina e uma pequena parte do segmento de gene do peptídeo N-terminal da bicunina. Os extremos do fragmento foram preenchidas selectivamente com dATP e dGTP na presença da enzima Klenow, dotada de extremos cerses com a nuclease de Phaseolus aureus e clonado no plasmídeo pTZ19R (Pharmacia) que tinha sido linearizado com Hind III e igualmente dotado de extremos cerses com nuclease de Phaseolus aureus. Fez-se a transformação de E. coli. O DNA de plasmídeo dos clones resultantes foi verificada por análise da sequência.

Os plasmídeos pTZBIK1 e pTZBIK1XX (XX=IL, LM, MM, LL, VL) foram gerados substituindo o segmento de gene natural para o domínio 1 do gene da bicunina pelo segmento de gene sintético adequado ou por uma das suas variantes. O fragmento C de DNA de pTZBIK foi isolado após clivagem com SphI e PstI e contem a sequência de cDNA completa da bicu-

nina com exceção do segmento de gene para quase todo o domínio 1 e ligado aos correspondentes plasmídeos clivados pTZKUN1 e pTZKUN1XX (XX=IL, LM, MM, LL, VL) (ver Fig. 3) e clonados em E. coli DH5. O DNA de plasmídeo dos clones resultantes foi caracterizado por análise de sequência.

Construção do gene da de $\text{[}^{1-79}\text{]-Xaa}^{92}\text{-Xaa}^{94}\text{-bicunina}$ com Xaa=Ile, Leu, Met, Val, Fen

O gene do segmento do segundo domínio (de $\text{[}^{1-79}\text{]-bicunina}$) foi obtido truncando a bicunina (Fig. 5). As suas variantes (de $\text{[}^{1-79}\text{]-Xaa}^{92}\text{-Xaa}^{94}\text{-bicunina}$) foram preparados por substituição de um fragmento de restrição ApaI/XmnI do domínio 2 (módulo 3) por combinação adequadas dos aligonucleotídeos A-D ou seus variantes (Fig. 6) como se mostra na Fig. 7.

O plasmídeo pTZKUN2 (Fig. 5) foi obtido por ligação do fragmento A, que foi gerado por tratamento do DNA de pTZBTK1 com as nucleases de restrição HindIII e BapMI e dotado de extremos cerses com nuclease de Phaseolus aureus, ao vector pTZ19R (Pharmacia) que tinha sido clivado com XcyI e igualmente tratado com nuclease de Phaseolus aureus após transformação de células E. coli DH5. O DNA de plasmídeo de clones individuais foi caracterizado por análise da sequência.

Os plasmídeos pTZKUN2XX (XX=IL, LL; VL e LF) foram obtidos por substituição de um fragmento ApaI/XmnI de pTZKUN2 pelos oligonucleotídeos adequados do módulo 3 (ver Fig. 6). O fragmento vector foi isolado após clivagem com as nucleases de restrição referidas e desfosforilação dos extremos 5' com fosfatase alcalina de intestino de vitela. Após ligação com os oligonucleotídeos do módulo 3 que tinham sido fosforilados com cinase de polinucleotídeos e transformação de E. coli DM5, o DNA de plasmídeo de clones individuais foi caracterizado por mapeamento e, finalmente

análise da sequência (Fig. 7).

Construção de genes de λ^{1-17} -Met¹⁸-Xaa³⁶-Xaa³⁸-Xaa⁹²-Xaa⁹⁴-7 bicunina

Variantes de genes da bicunina com substituições em ambos os domínios foram gerados a partir de variantes do gene da bicunina com um domínio variante 1 (pTZBIK1XX; Fig. 4) por substituição de um segmento de gene do domínio 2 natural por um segmento correspondente das variantes do gene do domínio 2 (Fig. 7) como se mostra na Fig. 8.

Clivagem do plasmídeo pTZB1XX pelas nucleases de restrição EcoRI e ApaI, desfosforilação dos extremos 5' dos fragmentos de DNA com fosfatase alcalina de intestino de vitela e isolamento do fragmento vector foram seguidos de ligação com o fragmento EcoRI/ApaI de pTZKUN2XX isolado de modo semelhante e clonagem em *E. coli* DH6. Os plasmídeos dos clones individuais foram caracterizados por análises da sequência.

Construção do gene de $\lambda^{1-17, 82-147}$ -Met¹⁸-Xaa³⁶-Xaa³⁸-bicunina

Genes do primeiro domínio com extensão C-terminal adicional pela sequência de aminoácidos T-V-A-A (de $\lambda^{1-17, 82-147}$ -Met¹⁸-Xaa³⁶-Xaa³⁸-bicunina) foram obtidos a partir dos plasmídeos pTZBIK1XX das variantes de bicunina adequadas após substituição do segundo domínio pelos oligonucleotídeo a (5'-CTGTGGCGGCCTGAG-3') e b (5'-AATTCTCAGG-CCGCC-3') (Fig. 9). Com esta finalidade, pTZBIK1XX foi clivado com BspMI e EcoRI, os extremos 5' dos fragmentos de DNA foram desfosforilados com fosfatase alcalina de intestino de vitela e o fragmento vector foi isolado e ligado na presença dos oligonucleotídeos. Após transformação de *E. coli* DH5, os plasmídeos pTZKUN1XXc de clones individuais foram verificados por análise das sequências.

Expressão de variantes da bicunina

Foi possível para algumas variantes do gene da bicunina descritas serem expressas no próprio vector de clonagem e após reclonagem em vários vectores de expressão tais como por exemplo, pJLA 502 (Schauder et al., Gene 52, 279-283, 1987) pEX3 (Stanley & Luzio, EMBOJ.3, 1429-1434, 1984) e pEX3407 (Kocken et al., FEBS Lett. 236, 132-134 1988). Por exemplo, os fragmentos NcoI/SalI e NcoI/EcoRI podem ser isolados a partir dos plasmídeos pTZKUN1XX e pTZBIK1XX2XX respectivamente (Figuras 3 e 8) e directamente ligados ao vector pJLA502 que foi correspondentemente cortado e tratado com fosfatase alcalina de intestino de vitela. Como alternativa, os fragmentos dos plasmídeos pTZBIK1XX (fragmento NcoI/EcoRI, Fig. 4), pTZBIK1XX2XX (fragmento NcoI/EcoRI, Fig. 8), pTZKUN1XX (fragmento NcoI/HindIII, Fig. 3) podem ser isolados de todos os extremos cerses com a nucleasse de Phaseolus aureus e ligados aos vectores pEX3 ou pEX3407.

Fragmentos do plasmídeo pTZKUN2XX (Fig. 7) podem ser gerados por clivagem com EcoRI, tratamento com nuclease de Phaseolus aureus e subsequente clivagem com BamHI e ligados aos vectores pEX. O DNA dos vectores pEX podem com esta finalidade ser cortado com SalI e tratado com nuclease de Phaseolus aureus ou, como na última construção mencionada, clivado com pstI, tratado com nuclease de Phaseolus aureus e subsequentemente clivado com BamHI. Os transformantes de E. coli pop 2136 (Vidal-Ingigliardi & Rainband, Nucleic Acids Res. 13, 1163, 1989) permite controle da expressão genética dependente da temperatura. As proteínas de fusão que são produzidas em cada caso são ligadas via uma ligação peptídica Asp-Pro sensível aos ácidos à proteína a ser expressa. A remoção da fracção da proteína de fusão, purificação e renaturação da fracção bicunina resultou em variantes de inibidores dos tipos de $\text{[}^{1-17}\text{]-Pro}^{18}\text{-bicunina}$, de $\text{[}^{1-17, 78-147}\text{]-Pro}^{18}\text{-bicunina}$ e de $\text{[}^{1-78}\text{]-Pro}^{79}\text{-bicunina}$. A parte bicunina



pode também ser clivada do parceiro da fusão usando a sequência Pro²⁰-Lis²¹-Lis²² que é particularmente sensível à proteólise (com tripsina). Foi possível expressar particularmente bem variantes de um só domínio em sistemas de expressão secretores.

Os produtos de expressão foram detectados por electroforese em gel (por exemplo para determinação de proteínas de fusão) ou em ensaios convencionais de inibição de enzimas (após eliminação do parceiro de fusão, purificação e renaturação da parte bicunina).

Os resultados que foram obtidos mostram que, por exemplo, de [1-17]-Met-18-Leu-36-Leu-38-bicunina, de [1-17]-Met-18-Leu-36-Leu-38-Leu-92-Leu-94-bicunina e de [1-17]-Met-18-Leu-92-Leu-94-bicunina, preparados como descrito para expressão em *E. coli*, têm uma acção forte e inibidora de proteases.

EXEMPLO 2

Expressão de Leu-36-Leu-38-bicunina

Clonagem do gene: pCY17, um vector derivado de pBR322, que contem o gene estrutural MAT-alfa-1 (Kurjan e Herskowitz, Cell, 30, 933, 1982) foi obtido a Herskowitz, Universidade da Califórnia. pMT15 é um vector vai-vem levedura-*E. coli* (Fig. 10). Ele é portador de segmentos de genes Amp^R, bla e URA3 que actuam como marcas seleccionadas para *E. coli* e levedura. pMT15 em adição contem a origem ColE1 de pBR322 e um segmento de forma B do plasmídeo 2 μ , de tal forma que o

plasmídeo pode replicar-se estávelmente em E. coli e em levedura. Ele é ainda portador do promotor MAT1-alfa e da sequência codificadora da pre-pro-sequência N-terminal da proteína precursora do factor alfa como fragmento EcoRI-HinSIII que tinha sido obtido a partir do plasmídeo pCY17. Este fragmento é seguido no extremo 3' por um fragmento HindIII-BamHI de 115 pb que codifica os 34 aminoácidos N-terminais da pre-invertase (Das et al., Mol. Gen. Genet. 218, p240, 1989). Finalmente, pMT15 continha no extremo 3' do sítio de clivagem BamHI um fragmento de 160 pb de um terminador de transição de levedura que tinha sido obtido a partir do gene URA3 de levedura (Yarger et al., Mol. Cell. Biol. 8, 1095, 1986).

O fragmento PstI-HindIII de 235 pb de pMT15 que é portador da região codificadora da sequência pré-pro-líder do factor alfa foi clonado no vector M13mpl8 e sujeito a mutagénese dirigido usando o oligonucleotídeo mutagénico 5'-GAAGAAGGGGTATTGGATAAAAGA-3'. O resultado da mutagénese foi o codão serina na posição 81 na pre-pro-sequência do factor alfa foi mudado de TCT para AGC, o que gerou um sítio de clivagem de restrição HindIII. O fragmento PstI-HindIII de 213 pb (Fig. 11) assim preparado foi usado para substituir o fragmento PstI-HindIII de 235 pb em pMT15. O plasmídeo modificado deste modo foi designado ps600; ele é portador da sequência codificadora de Lis-Arg em vez de Lis-Arg-Glu-Ala-Glu-Ala como sítio de processamento (Fig. 12).

Construção do gene Leu-36-Leu38-bicunina: um fragmento Sau 3AI de 540 pb do plasmídeo PIM1 (Das e Lehman, J. Cell. Biochem, 2B, 284, 1988) que é portador de sequência codificadora da bicunina (Fig. 13) foi clonado em M13mpl92 sujeito a mutagenese dirigida de modo a transformar Met-36 em Leu-36 e Met-38 em Leu-38. A mutagenese foi efectuada pelo método de Sayers et al (Nucl. Acids. Res., 16, 79, (1989)). Preparou-se ainda um fragmento de DNA de cadeia dupla com a seguinte sequência:

5' ... AGC TTG GAT AAA AGA GCT GTC CTA CCC CAA

3' - AC CTA TTT TCT CGA CAC GAT GGG GTT

GAA GAG GAA G.....3'

CTT CTC CTT CCT AG5'

O fragmento de DNA foi fosforilado por processos convencionais. O fragmento de DNA obtido deste modo foi descrito juntamente com a sequência de bicunina mutagenizada no plasmídeo pS600 de 8,2 pb que tinha sido digerido com HinIII e BamHI. O oligómero reconstituiu o extremo 3' da sequência pre-pro-factor alfa e o extremo 5' da sequência da bicunina. O novo plasmídeo pLLB3638 assim obtido contém a região codificadora da sequência pre-pro-factor-alfa com his-Arg como sítio de processamento fundido com a sequência da Leu-36-Leu-38-bicunina. O DNA e a correspondente sequência de aminoácidos no sítio de fusão de pre-pre-factor-alfa-Leu-36-Leu-38-bicunina em pLLB3638 está descrito na Fig. 4.

Expressão, secreção e detecção de Leu-36-Leu-38-bicunina tendo actividade inibidora: A estirpe de levedura SC106 (MATd, hom3, gal 2, his 6, ura 3) foi transformada com pLLB3638 de acordo com os métodos descritos atrás; células URA3⁺ foram isoladas e cultivadas; o sobrenadante de cultura foi tratado quanto à actividade inibidora de elastase. Mostrou-se em testes testemunha que as células SC106 transformadas com pS600 não produziram actividade inibidora de elastase para o meio de cultura.

Os resultados que foram obtidos mostraram que o gene Leu-36-Leu-38-bicunina expressa em Saccharomyces uvisialis conduziu à formação de duas espécies proteicas no meio de cultura com as seguintes propriedades: (a) inibidores activos da tripsina, (b) peso molecular de 20K e 17K de acordo com electroforese com geis de SDS-poliacrilamida, (c)

para cada espécie proteica cerca de 60% mostrou a sequência N-terminal da bicunina e cerca de 40% mostrou a sequência de de(Ala-1)-bicunina.

EXEMPLO 3

Expressão de Leu-92-Leu-94-bicunina

Clonagem do gene: O fragmento Sau3AI de 540 pb do DNA de pIM1 (Das e Lehman, J. Cell. Biochem. 12B, 284, 1988) com a sequência codificadora da bicunina (Fig. 13) foi clonado no plasmídeo M13 mpl9 e sujeito a mutagenese dirigida para mudar Arg-92 para Leu-92 e Fen-94 para Leu-94. O fragmento mutagenizado deste modo foi clonado no plasmídeo pS600 em analogia com o Exemplo 1. A sequência de DNA e a sequência correspondente de aminoácidos no sítio de fusão do gene pre-pro-factor alfa-Leu-92-Leu-94-bicunina no vector de expressão pLLB9294 então descritas na Fig. 15.

Expressão secreção e detecção de Leu-92-Leu-94-bicunina tendo actividade inibidora: SC106 foi transformada com pLLB9294 de acordo com os métodos descritos atrás; células URA3⁺ foram isoladas e cultivadas; o sobrenadante de cultura foi testado quanto à actividade inibidora da elastase. Foi mostrado em ensaios testemunha que as células SC106 transformadas com pS600 não produziram actividade inibidora de elastase para o meio de cultura.

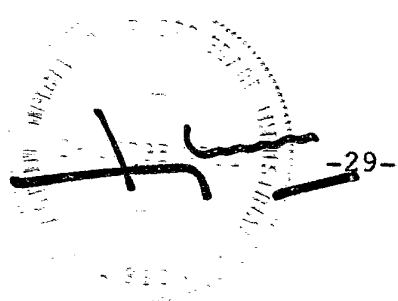
Os resultados que foram obtidos mostraram que o gene Leu-92-Leu-94-bicunina expresso em Saccharomyces cereviside levou à formação de duas espécies proteicas

no meio de cultura com as seguintes propriedades: (a) inibidores activos da elastase, (b) peso molecular de 20K e 17K de acordo com electroforese em géis de SDS-poliacrilamida, (c) para cada espécie proteica cerca de 60% apresentaram a sequência N-terminal da bicunina e cerca de 40% apresentaram a sequência da de(Ala-1)-bicunina.

EXEMPLO 4

Expressão de Leu-36-Leu-38-Leu-92-Leu-94-bicunina

Clonagem do gene: O fragmento Sam3AI de 540 pb do DNA de pIM1 (Das e Lehman, J. Cell. Biochem. 12B, 284, 1988) com a sequência codificadora da bicunina (Fig. 13) foi clonado no plasmídeo M13mpl9 e sujeito a mutagénese dirigida de modo a alterar Met-36 para Leu-36, Met-38 para Leu-38, Arg-92 para Leu-92 e Fen-94 para Leu-94. O fragmento assim mutagenizado foi clonado no plasmídeo pS600 em analogia com o Exemplo 1. A sequência de DNA e a correspondente sequência de aminoácidos no sítio de fusão do gene da pre-pro-factor alfa-Leu-36-Leu-38-Leu-94-bicunina no vector de expressão p4LB está descrito na Fig. 16.



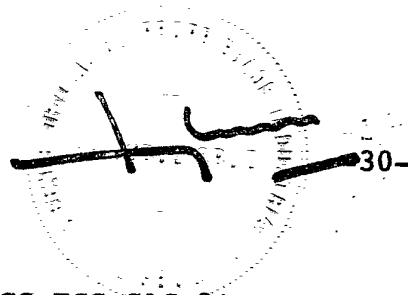
Expressão, secreção e detecção de Leu-36-Leu-38-Leu-92-Leu-94-bicunina tendo actividade inibidora: SC106 foi transformada com p4LB de acordo com os métodos descritos atrás; células URA3⁺ foram isoladas e cultivadas; o sobrenadante de cultura foi testado quanto à actividade inibidora de elastase. Mostrou-se nos testes testemunha que as células SC106 transformadas com pS600 não produziram actividade inibidora de elastase para o meio de cultura.

Os resultados que foram obtidos mostraram que o gene Leu-36-Leu-38-Leu-92-Leu-94-bicunina expresso em Saccharomyces cerevisiae conduziu à formação de duas espécies proteicas no meio de cultura com as seguintes propriedades: (a) inibidoras activas da elastase, (b) peso molecular de 20K e 17K de acordo com electroforese em géis de SDS-poliacrilamida, (c) para cada espécie proteica cerca de 60% apresentou a sequência N-terminal da bicunina e cerca de 40% apresentou a sequência da de(Ala-1)-bicunina.

EXEMPLO 5

Expressão da de(1-21)-Leu-36-Leu-38-bicunina

Clonagem do gene: um fragmento POUII de 480pb do DNA de pIM1 (Das e Lehmann, J. Cell. Biochem, 12B, 284, 1988), que é portador da região codificadora da de(1-21)-bicunina (Fig. 13) foi clonado no plasmídeo M13mpl9 e sujeito a mutagénesse dirigida de modo a mudar Met-36 para Leu-36 e Met-38 para Leu-38. A mutagénesse foi efectuada pelo método de Sayers et al., (Nucl. Acids, Res. 16, 719, 1988). Preparou-se ainda um fragmento de DNA de cadeia dupla com a seguinte sequência:



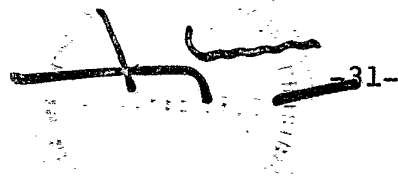
5'-AGC TTG GAT AAA AGA AAA GAA GAT TCC TGC CAG-3'

AC CTA TTT TCT TTT CTT CTA AGG ACG GTC-5'

O fragmento de DNA foi fosforilado por processos convencionais. O fragmento de DNA obtido deste modo foi inserido juntamente com a sequência da bicunina mutagenizada no plasmídeo pS600 de 8,2kb que tinha sido digerido com HindIII e BamHI. O oligomero reconstitui o extremo 3' da sequência pre-pro-factor alfa e o extremo 5' de sequência da bicunina. O novo plasmídeo pDLLB-121 assim obtido contém a região codificadora da sequência pre-pro-fractor alfa com Lis-Arg como sítio de processamento fundida com de(1-21)-leu-36-Leu-38-bicunina. O DNA e o correspondente sequência de aminoácidos no sítio de fusão de pre-pro-factor alfa-Leu-36-Leu-38-bicunina em pDLLB-121 estão descritos na Fig. 17.

Expressão, secreção e detecção de de(1-21)-Leu-36-Leu-38-bicunina tendo actividade inibidora: SC106 foi transformado com pDLLB-121 de acordo com os métodos descritos atrás; células URA³⁺ foram isoladas e cultivadas; o sobrenadante de cultura foi testada quanto à actividade inibidora de elastase. Demonstrou-se nos ensaios testemunha que as células SC106 transformadas com pS600 não produziram actividade inibidora de elastase para o meio de cultura.

Os resultados que foram obtidos mostraram que o gene de (1-21)-Leu-36-Leu-38 expresso em Saccharomyces cerevisiae conduziu à formação de uma proteína no meio de cultura com as seguintes propriedades: (a) inibidor activo da tripsina, (b) peso molecular de 17K e 15K de acordo com electroforese em géis de SDS-poliacrilamida, (c) a proteína mostrou a sequência N-terminal de His-Glu-Asp-Ser-Cis de de(1-21)-bicunina.



Legendas

Fig. 1 Estrutura primária da bicunina humana.

O peptídeo N-terminal (pos. 1-21) e domínios 1 (pos. 22-77) e 2 (pos. 78-147) podem ser obtidos por clivagem com tripsina. As setas indicam sequências das regiões que foram codificadas por exões diferentes e as asteriscos indicam os resíduos especificamente alterados P_1 e P_2 dos outros reactivos. Resíduos de aminoácidos idênticos nos dois domínios inibidores da bicunina estão evidenciados por linhas verticais.

Fig. 2 Construção de variantes de $\text{[1-17, 78-147]-Met}^{18}\text{-Xaa}^{36}\text{-Xaa}^{36}\text{-bicunina}$. Sequência oligonucleotídica do gene básico. Os resíduos substituídos nas variantes estão sublinhadas duas vezes. O primeiro codão no extremo 5' do gene faz parte da sequência de reconhecimento NcoI CCATGG e o último nucleotídeo do terceiro de três codões de paragem consecutivas SalI GTCGAC. As sequências de reconhecimento para as nucleases de restrição NcoI, Asp718 e SalI, que limitam os módulos individuais, estão sublinhadas uma vez. Os oligonucleotídeos usados para a construção de genes estão representados por setas e estão numerados.

Fig. 3 Clonagem do gene de $\text{[1-17, 78-147]-Met}^{18}\text{-bicunina}$ (pTZKUN1) e das variantes de genes de $\text{[1-17, 78-147]-Met}^{18}\text{-Xaa}^{34}\text{-Xaa}^{38}\text{-bicunina}$ (pTZKUN1XX).

Fig. 4 Clonagem do gene de [1-17]-bicunina (pTZBIK) e da de $\text{[1-17]-Met}^{18}\text{-bicunina}$ (pTZBIK1) e da $\text{[1-17]-Met}^{18}\text{-Xaa}^{36}\text{-Xaa}^{38}\text{-bicunina}$ (pTZBIK1XX).

M: μ -microglobulina; D_1 e D_2 : domínios 1 e 2 da bicunina; N: peptídeo N-terminal da bicunina;

C; sequência C-terminal da bicunina; KUN-1; domínio 1 sintético consistindo nos módulos Mod 1 e Mod 2. Os sítios de clivagem que se perdam devido ao processo de clonagem estão registrados, mas não mais identificados no plasmídeo resultante. Os fragmentos B e D - se não fossem gerados como tal - estão indicados para ajudar a orientação.

Fig. 5 Clonagem do gene de $[^{1-79}]$

-bicunina (pTZKUN2)

D2: domínio 2 da bicunina, C: sequência C-terminal da bicunina; KUN1: domínio sintético 1 consistindo nos módulos Mod 1 e Mod 2; os sítios de clivagem que são perdidos devido ao processo de clonagem estão registrados no plasmídeo resultante sem identificação. Os fragmentos - mesmo não tendo sido gerados como tal - como seja por exemplo, B e C - estão indicados para ajudar a orientação.

Fig. 6: Construção de variantes do gene do segundo domínio da bicunina: variantes de $[^{1-79}]$ -Xaa⁹²-Xaa⁹⁴-bicunina e de $[^{1-17}]$ -Met¹⁸-Leu³⁶-Leu³⁸-Leu⁹²-Leu⁹⁴-bicunina com Xaa⁹²-Xaa⁹⁴=Ile, Leu, Met, Val ou Fen. Está apresentada a sequência de bicunina natural do domínio 2 (posição 78) e os oligonucleotídeos sintéticos A-D (setas) onde os codões nas posições 92 e 94 da bicunina (sublinhado duas vezes) nos oligonucleotídeos A e B foram substituídos de acordo com os seguintes requisitos das variantes individuais (Ile: ATC; Leu; CTG; Val: GTT; ou suas sequências complementares na cadeia oposta). As sequências de reconhecimento para as nucleases de restrição ApaI (GGGCCC) e XmnI (GAANNNTTC) estão sublinhadas uma vez.

Fig. 7 Clonagem de variantes do gene de $[^{1-79}]$ -Xaa⁹²-Xaa⁹⁴-bicunina com Xaa=Ile, Leu, Met e Val.

D2: domínio 2 da bicunina; KUN2: domínio 2 da bicunina após substituição do fragmento natural XmnI/ApaI pelo módulo sintético 3; C: sequência C-terminal da bicunina.

Fig. 8 Clonagem de variantes do gene de $\text{[}^{1-17}\text{]-Met}^{18}\text{-Xaa}^{36}\text{-Xaa}^{38}\text{-Xaa}^{92}\text{-Xaa}^{94}\text{-bicunina}$ com Xaa = Ile, Leu, Met, Val ou Fen.

KUN1: domínio 1 sintético consistindo nos módulos 1 e 2;

KUN2: domínio 2 de bicunina após substituição do fragmento natural XmnI/ApaI pelo módulo sintético 3;

C: sequência C-terminal da bicunina

Fig. 9 Clonagem do gene de $\text{[}^{1-17, 82-147}\text{]-Met}^{18}\text{-Xaa}^{36}\text{-Xaa}^{38}\text{-bicunina}$ (extensão C-terminal do primeiro domínio pela sequência de aminoácidos T-V-A-A).

KUN1: domínio 1 sintético consistindo nos módulos 1 e 2;

D2: domínio da bicunina; C: sequência C-terminal da bicunina;

a e b: adaptadores oligonucleotídicos (ver texto).

Fig. 10: pMT15, um vector vai-vem *E. coli*-levedura

Fig. 11 diagrama da mutagênese dirigida da sequência líder do factor alfa. A mutagênese de TCT para AGC facilita o isolamento de um fragmento PstI-HindIII de 213 pb que foi designado (I).

Fig. 12: Construção de um vector vai-vem levedura-*E. coli* modificado para a expressão/secreção de bicunina usando o promotor do factor alfa e a sequência líder do factor modificado. A sequência líder do factor alfa modificado (designada I na Fig. 11) foi incorporada como um fragmento de gene PstI-HindIII no vector pMT15 e ali substitui a sequência líder original do factor alfa.

Fig. 13: O gene natural da bicunina clonado no vector vai-vem *E. coli* - levedura pMT15 que contem 1 pre-pro-sequência do factor alfa.

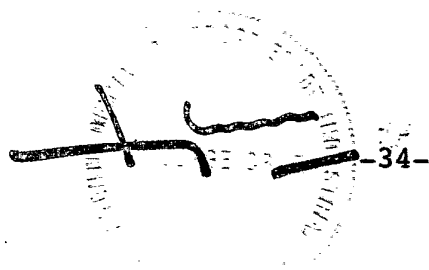


Fig. 14: Vector de expressão pLLB 368. Fusão de genes pre-pro-factor alfa-Leu-36-Leu-38-bicunina clonada no vector pS600. Está apresentada a sequência de DNA e correspondente sequência de aminoácidos no sítio de fusão de pre-pro-factor alfa-Leu-36-Leu-38-bicunina em pLLB3638. Lis-Arg é o sítio de processamento KEX2 da sequência pre-pro-factor alfa (Juliens et al., Cell. 37, 1075, 1984). A numeração de aminoácidos 1-38 corresponde à da sequência de muteína bicumina.

Fig. 15: Vector de expressão pLLB 9294. Fusão de genes pre-pro-factor alfa-Leu-92-Leu-94-bicunina clonada no vector pS600. Estão apresentadas as sequências de DNA e de aminoácidos correspondentes no sítio de fusão de pre-pro-factor alfa-Leu-92-Leu-94-bicunina em pLLB3638. his-Arg é o sítio de processamento KEX2 da sequência pre-pro-factor alfa (Julius et al., Cell. 37, 1075, 1984). Anumeração de aminoácidos 1-94 corresponde à da sequência de muteína bicumina.

Fig. 16: Vector de expressão p4LB. Fusão de genes pro-pro-factor alfa-Leu-36-Leu-38-Leu-92-Leu-94-bicunina clonado no vector pS600. Estão apresentadas a sequência de DNA e correspondente sequência de aminoácidos no sítio de fusão de pro-pro-factor alfa-Leu-36-Leu-38-Leu-92-Leu-94-bicunina em p4LB. Lis-Arg é o sítio de processamento KEX2 da sequência pre-pro-factor alfa (Julius et al., Cell. 37, 1075, 1984). A numeração de aminoácidos 1-94 corresponde à da sequência da muteína bicumina.

Fig. 17: Vector de expressão pDLLB-121. Fusão de genes pre-pro-factor alfa-de(1-21)-Leu-36-Leu-38-bicumina clonado no vector pS600. Estão apresentados a sequência de DNA e correspondente sequência de aminoácidos no sítio de fusão de pre-pro-factor alfa-de(1-21)-Leu-36-Leu-38-bicumina em pDLLB-121, his-Arg é o sítio de processamento KEX2 da sequência pre-pro-factor alfa (Julius et al., Cell. 37,



-35-

1075, 1984). A numeração de aminoácidos 1-38 corresponde à da sequência da mteína bicunina.

REIVINDICAÇÕES:

1ª. - Processo para a produção de inibidor de proteínas que tem a sequência de aminoácidos 21 a 147 da bicunina humana, caracterizado por se proceder, na referida sequência, à substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido por um outro aminoácido natural.

2ª. - Processo para a produção de inibidor de proteínas de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se proceder à substituição do resíduo de aminoácido numa ou mais do que uma das posições 36, 38, 45, 92, 94, 98, 116 por outros aminoácidos naturais.

3ª. - Processo para a produção de inibidor de proteinases de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado por se proceder à substituição por um resíduo de aminoácido do grupo constituído por Ala, Gli, Ile, Leu, Fen, Val, Arg, Tir, Trp, Lis.

4ª. - Processo de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado por se produzirem inibidores de proteinases com quaisquer combinações pretendidas das seguintes substituições:

Posição 36: Met por Leu, Ile, Val, Arg, Fen, Trp, Lis.

Posição 38: Met por Leu, Arg, Ile, Val, Lis,

Posição 45: Asn por um outro aminoácido natural,

Posição 92: Arg por leu, Ile, Val, Fen, Lis,

Posição 94: Fen por Leu, Arg, Lis, Ile, Val,

Posição 98: Trp por Tir, Lis, Ile, Val, Fen, Leu, Ala, Gli, Ser,

Posição 116: Glu por Arg, Lis.

5a. - Processo de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizado por se proceder à substituição de um ou mais resíduos Met por resíduos de aminoácido não oxidáveis.

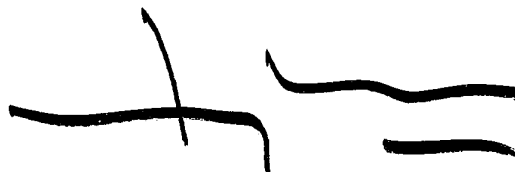
6a. - Processo de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado por se produzir um inibidor de proteinases, com um polipeptídeo adicional no extremo N cuja sequência de aminoácidos deriva da sequência natural 1 a 21 da bicunina.

7a. - Processo de acordo com as reivindicações 1 a 6, caracterizado por se produzir um inibidor de proteinases com ou sem glicosilação.

8a. - Processo para a produção de fragmentos com acção inibidora de proteínases, caracterizado por os referidos fragmentos serem obtidos a partir de inibidores de proteinases de acordo com as reivindicações 1 a 7.

9a. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por se produzirem fragmentos que essencialmente contêm a sequência de aminoácidos 22 a 77, 1 a 77 ou 78 a 147 de bicunina.

Lisboa, 11 de Maio de 1990



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA

[Handwritten signature]

10 20
A V L P G E E E S S S S S S L Y T E V T K

22 30 40 50 60 70 77
K E D S C Q L G Y S A G P C M G M T S R Y F Y N G T S M A C E T F Q Y G G C M G N N F V T E K E C L Q T C R

78 80 90 100 110 120 133
T V A A C N L P I V R G P C R A F I Q L W A F D A V K G K C V L F P Y G G C Q G N G N K F Y S E K E C R E Y C G

140 147
V P G D G D E E L L R F S N

FIG.1

NcoI 22 30 36
M V T K K E D S C Q L G Y S A G P C M

<-----1-----X-----
CCATGGTAACTAAAAAGAAGACTCTTGCCAGCTGGGCTACTCTGCTGGTCCGTGCATGG 60
CATTGATTTTTTCTTCTGAGAACGGTCCGACCCGATGAGACGACCAGGCACGTACC
<-----4-----X-----5-----

Module 1 < > Module 2
38 40 Asp718 50
G M T S R Y F Y N G T S M A C E T F Q Y

-2-----X-----3-----X-----7-----
GTAIGACTTCTCGTTACTTCTACAACGGTACCTCTATGGCTTGCGAACTTTCCAGTACG 120
CATACTGAAGAGCAATGAAGATGTTGCCATGGAGATACCGAACGCTTTGAAAGGTCATGC
-X-----6-----X-----10-----

60 70
G G C M G N G N N F V T E K E C L Q T C

--X-----8-----X-----9-----
GTGGTTGCATGGGTAACGGTAACAACCTTCGTTACTGAAAAAGAATGCCTGCAGACTTGCC 180
CACCAACGTACCCATTGCCATTGTTGAAGCAATGACTTTTTTCTTACGGACGTCTGAACGG
-----X-----11-----X-----12-----

R endendend Sall

----->

GTTAATGATAG

CAATTACTATCAGCTG

----->

FIG.2

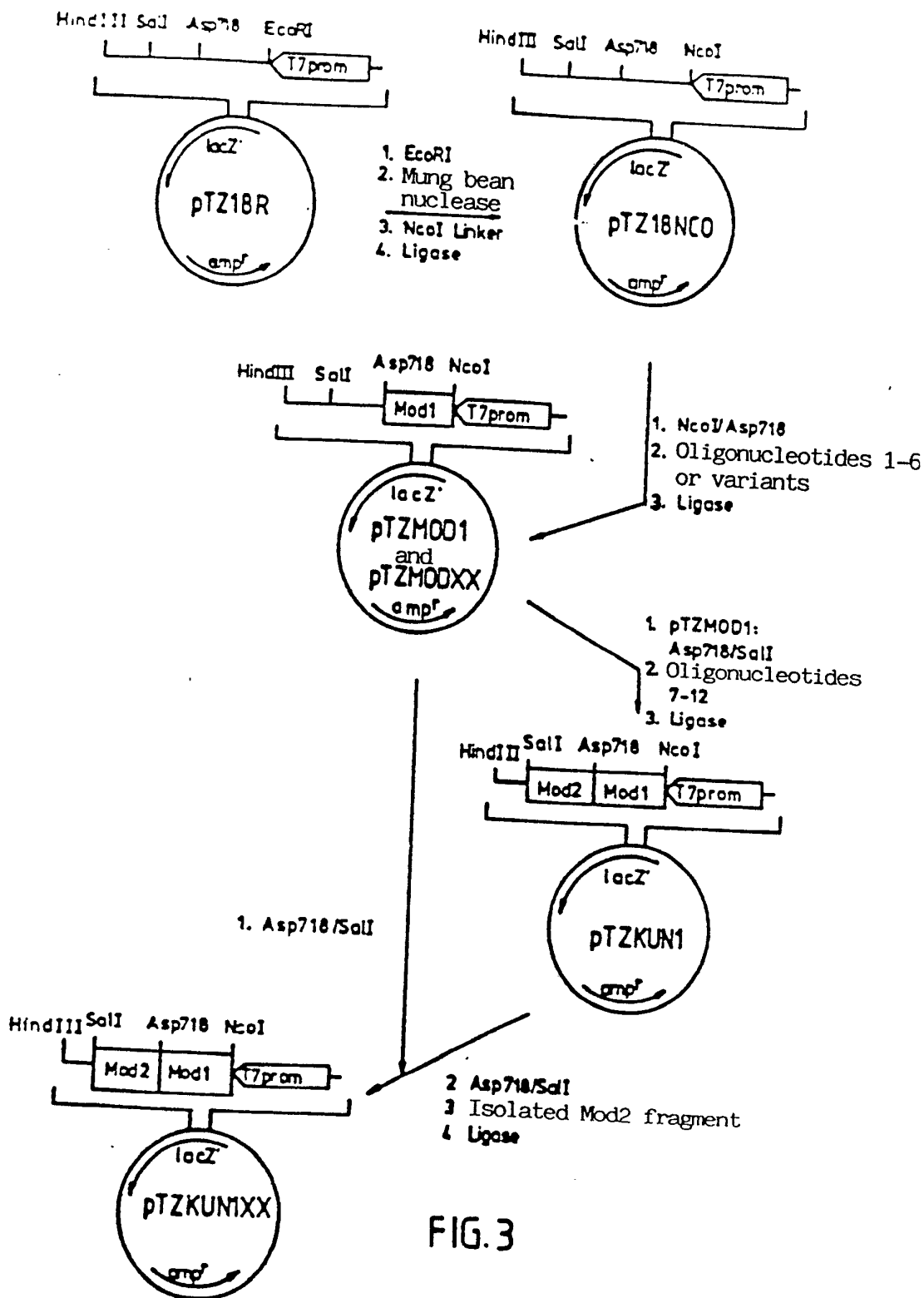


FIG. 3

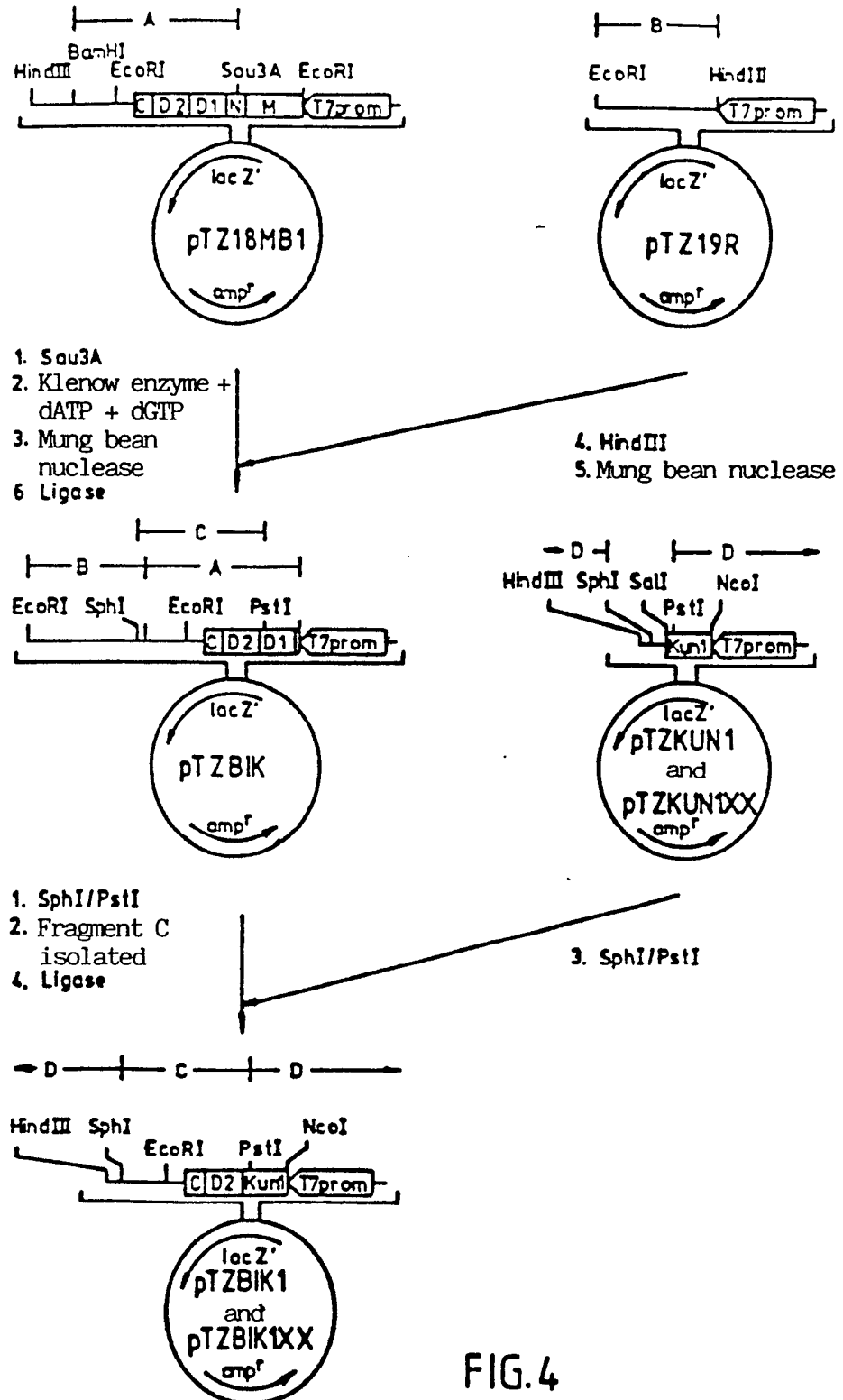


FIG.4

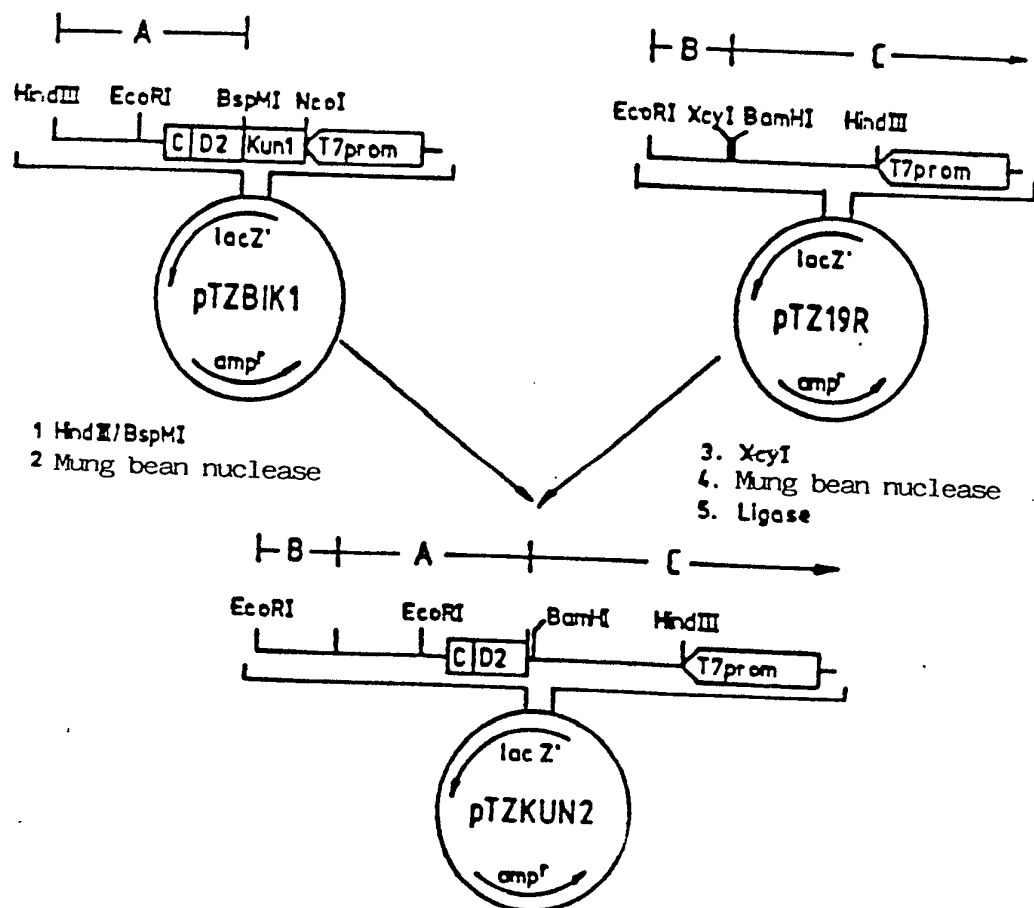


FIG. 5

78 80 90 92 94 97
T V A A C N L P I V R G P C B A E I Q L
-----A-----
ACTGTGGCGGCCTGCAATCTCCCCATAGTCCGGGGCCCCTGCCGAGCCTTCATCCAGCTC
TGACACCGCCGGACGTTAGAGGGGTATCAGGCCCGGGGACGGACCGGAAGTAGGTCGAG
-----B-----

100 110
W A F D A V K G K C V L F P Y G G C Q G
-----X-----C-----
TGGGCATTTGATGCTGTCAAGGGGAAGTGCGTCTCTTCCCCTACGGGGGCTGCCAGGGC
ACCGTAAACTACGACAGTTCCCTTCACGCAGGAGAAGGGGATGCCCCGACGGTCCCG
-----X-----D-----

120 130
N G N K F Y S E K E C R E Y C G V P G D
----->-----
AACGGGAACAAGTTCCTACTCAGAGAAGGAGTGACAGAGTACTGCGGTGTCCCTGGTGAT
TTGCCCTTGTTCAAGATGAGTCTCTTCTCACGTCTCTCATGACGCCACAGGGACCACTA
----->-----

140 147
G D E E L L R F S N
GGTGATGAGGAGCTGCTGCGCTTCTCCAAGTACAACTGGCCGGTCTGCAAGTCAGAGGA
CCACTACTCCTCGACGACGCGAAGAGGTTGACTGTTGACCGGCCAGACGTTTCAGTCTCCT
TGGCCAGTGTCTGTCCCGGGGTCTGTGGCAGGCAGCGCCAAGCAACCTGGGTCCAAATA
ACCGGTCACAGACAGGGCCCCAGGACACCGTCCGTGCGGTTTCGTTGGACCCAGGTTTAT
AAAACTAAATTGTAACTCCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
TTTTGATTAAACATTTGAGGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

FIG.6

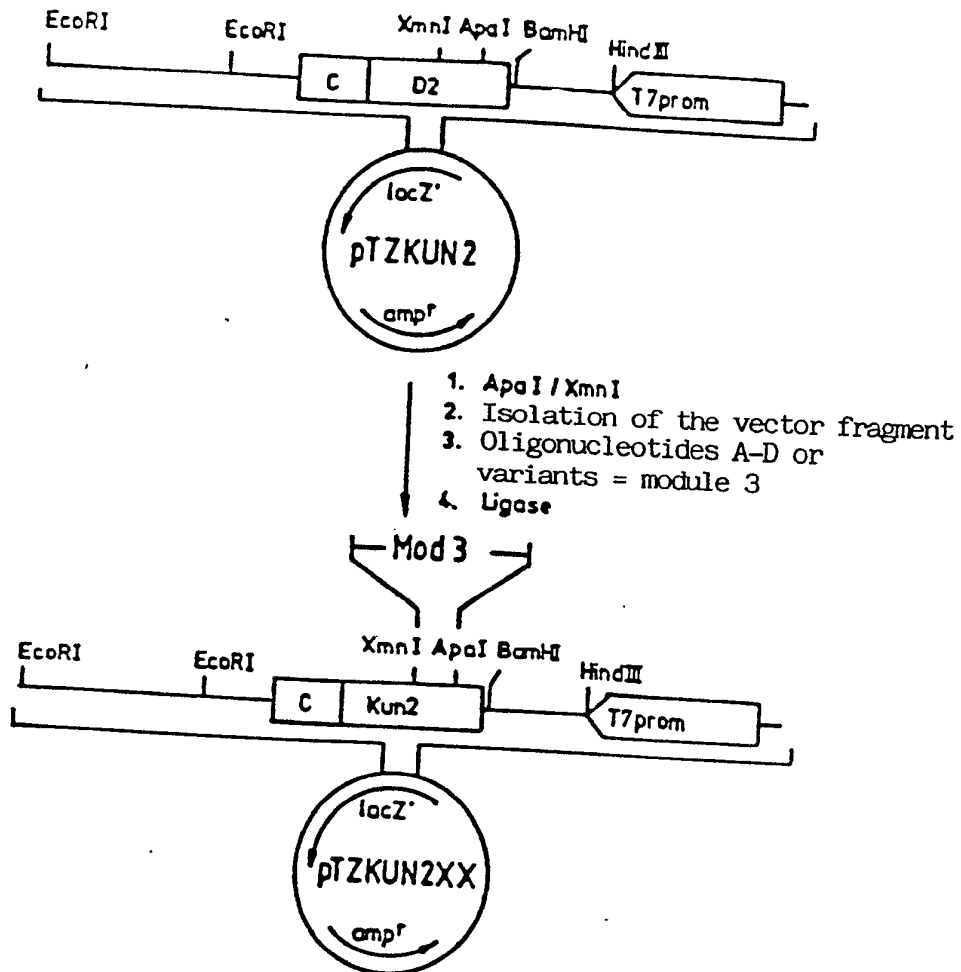


FIG.7

~~Handwritten scribbles~~

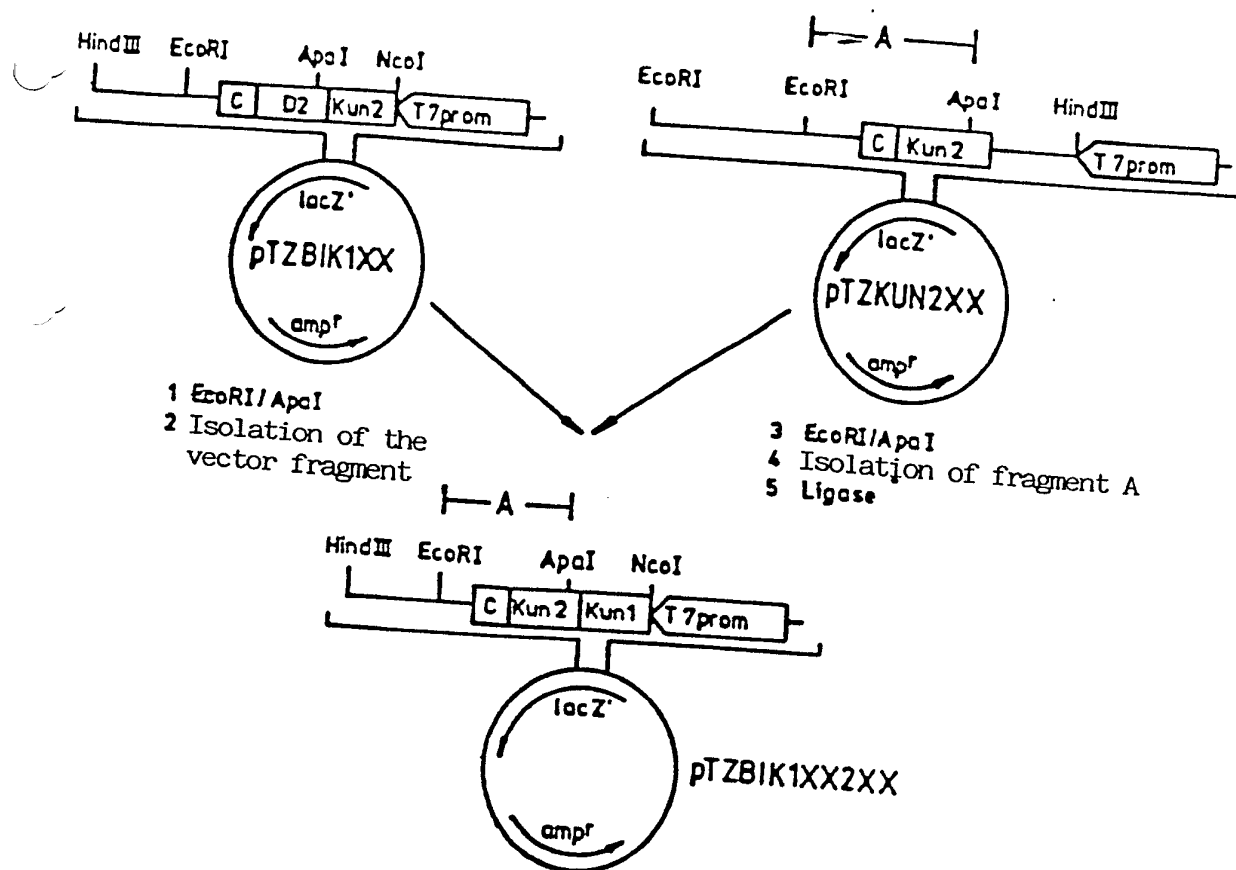


FIG. 8

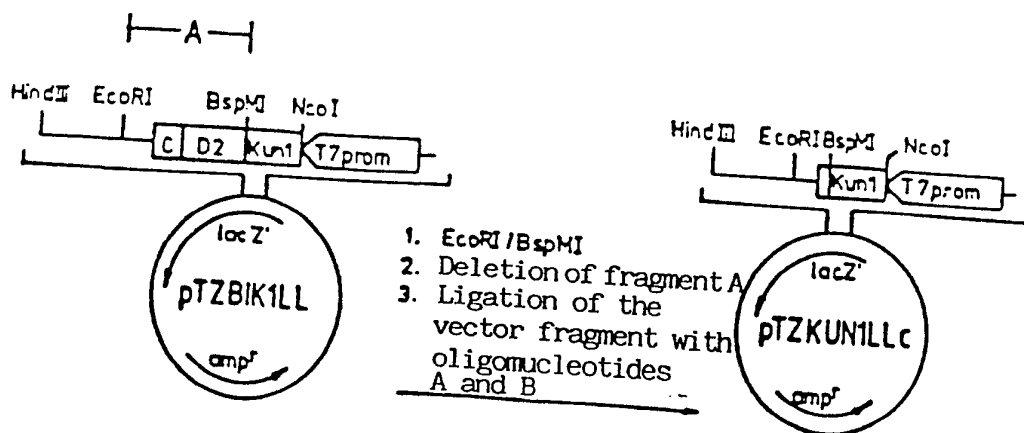


FIG. 9

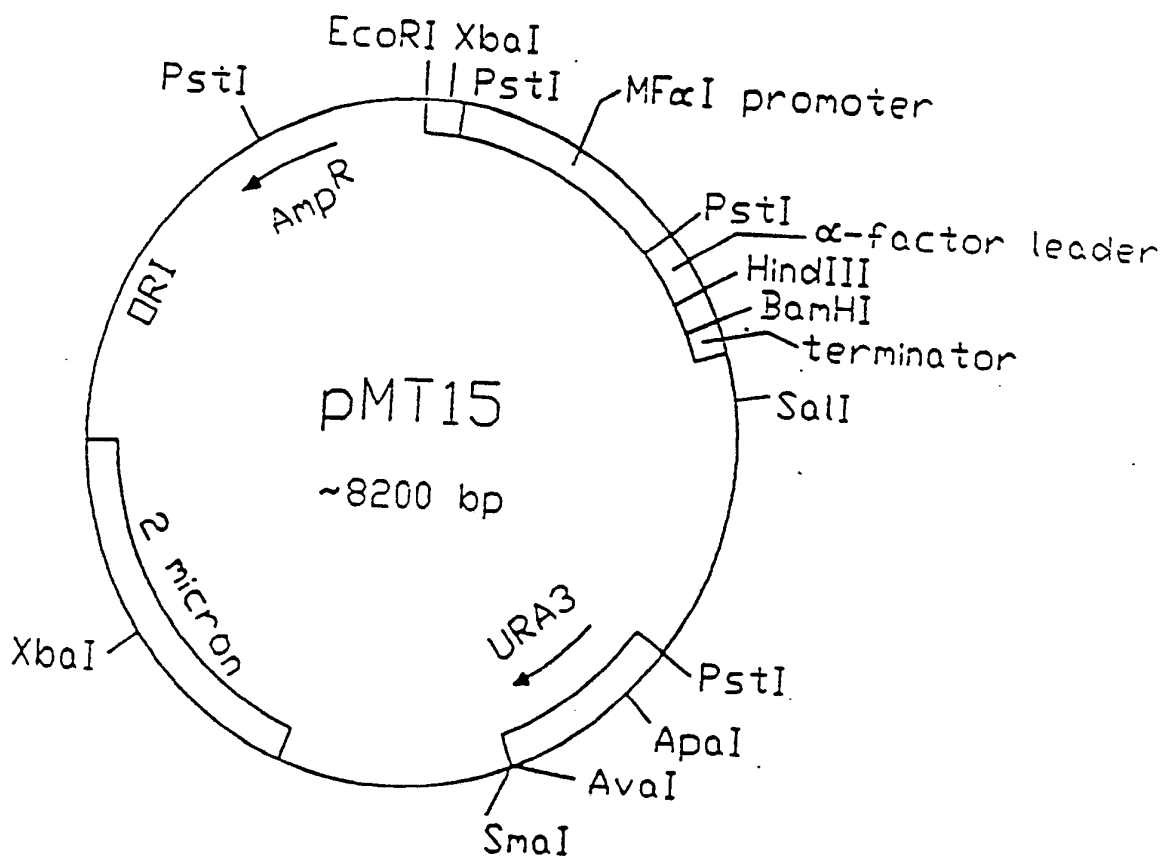


FIG.10

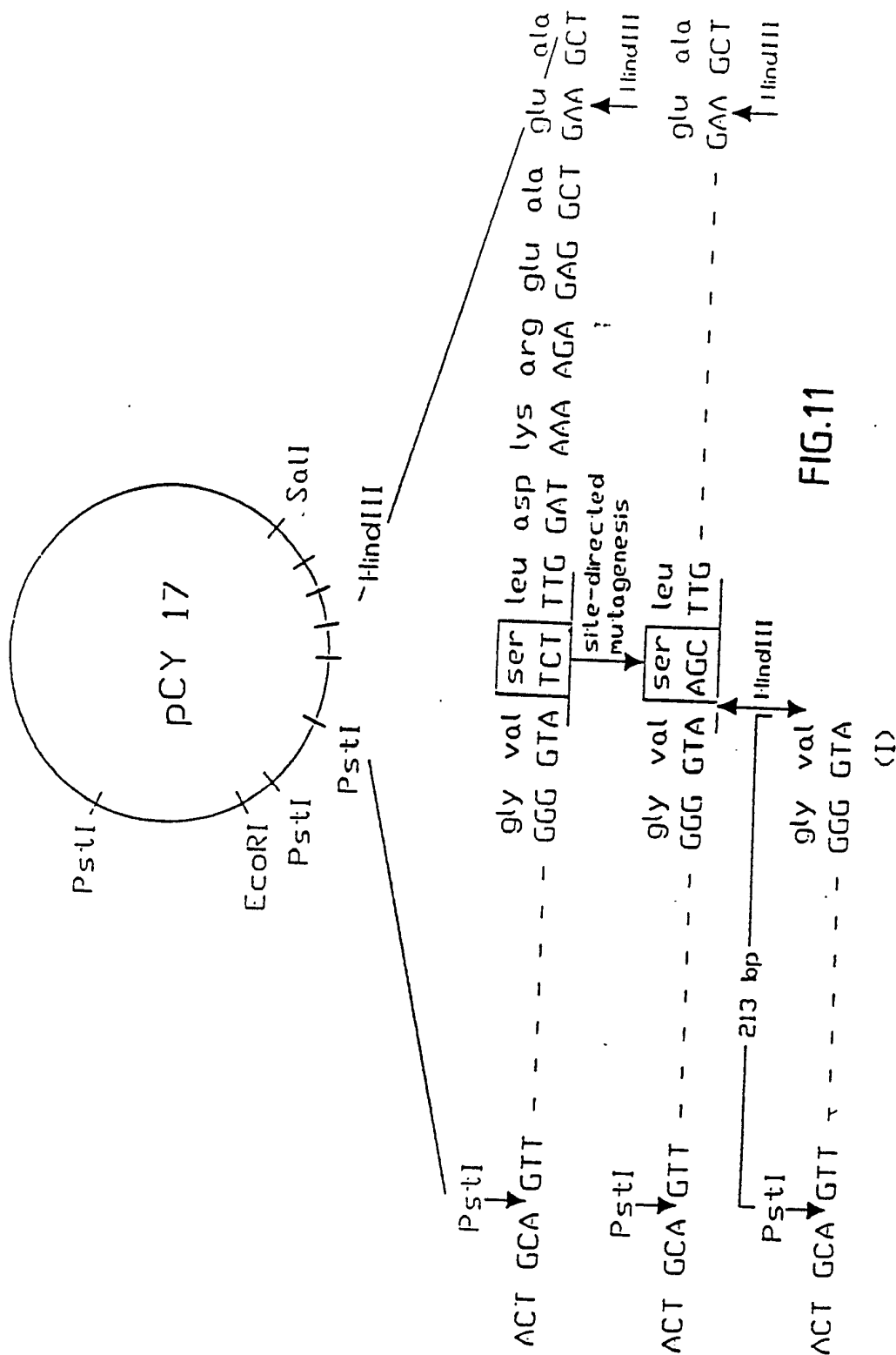
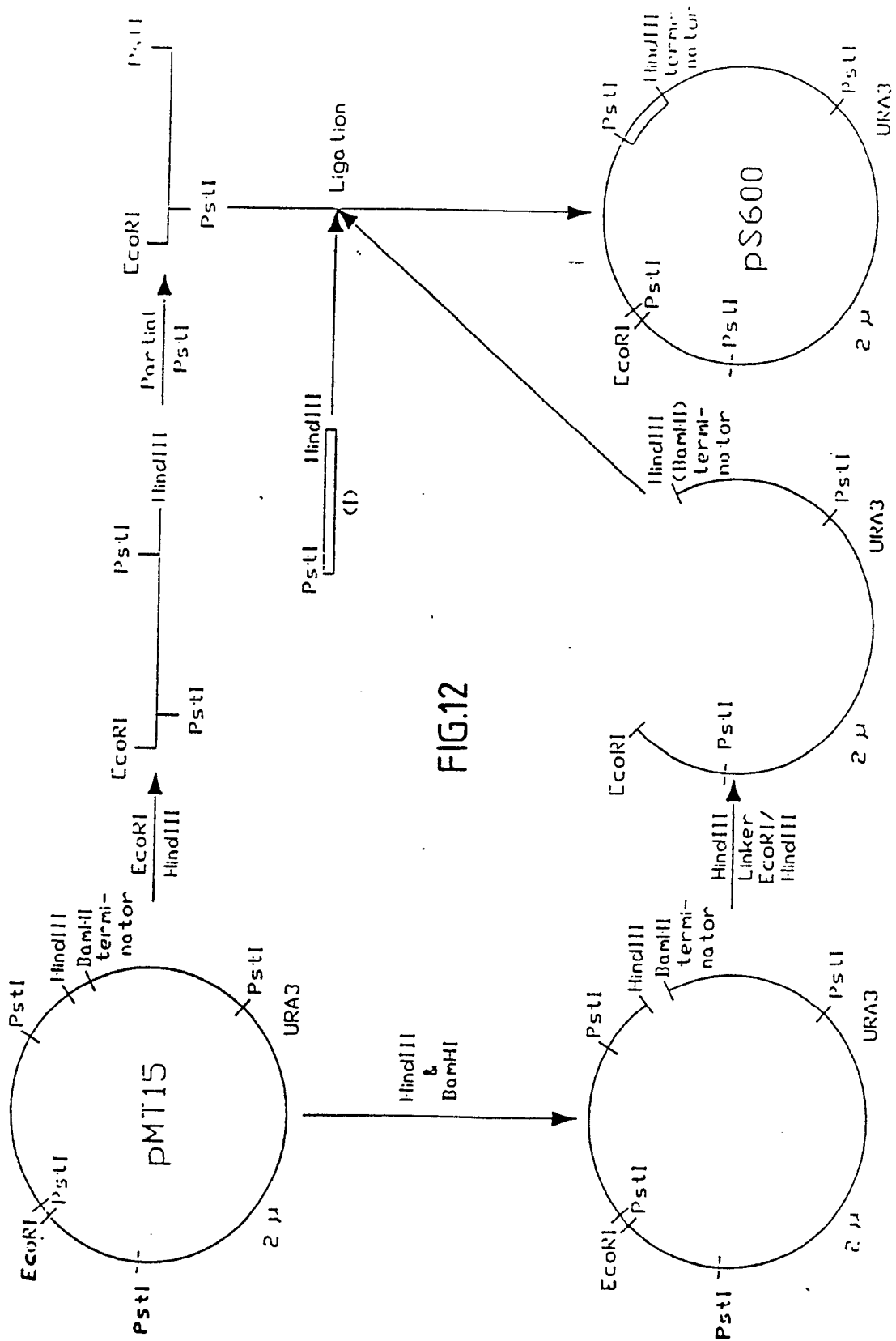


FIG.11

Handwritten signature or initials.



[Handwritten signature]

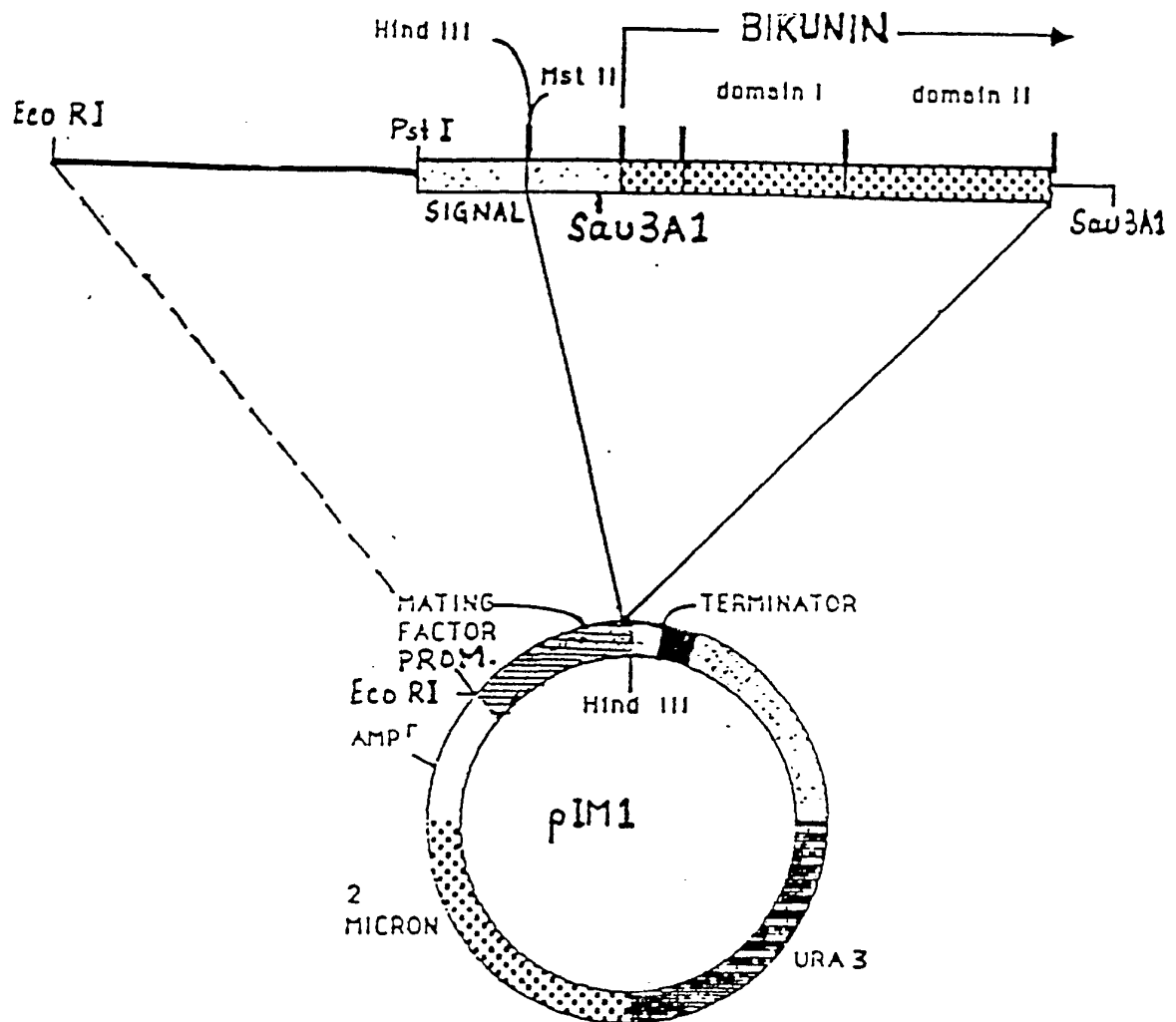


FIG. 13

[Handwritten signature]

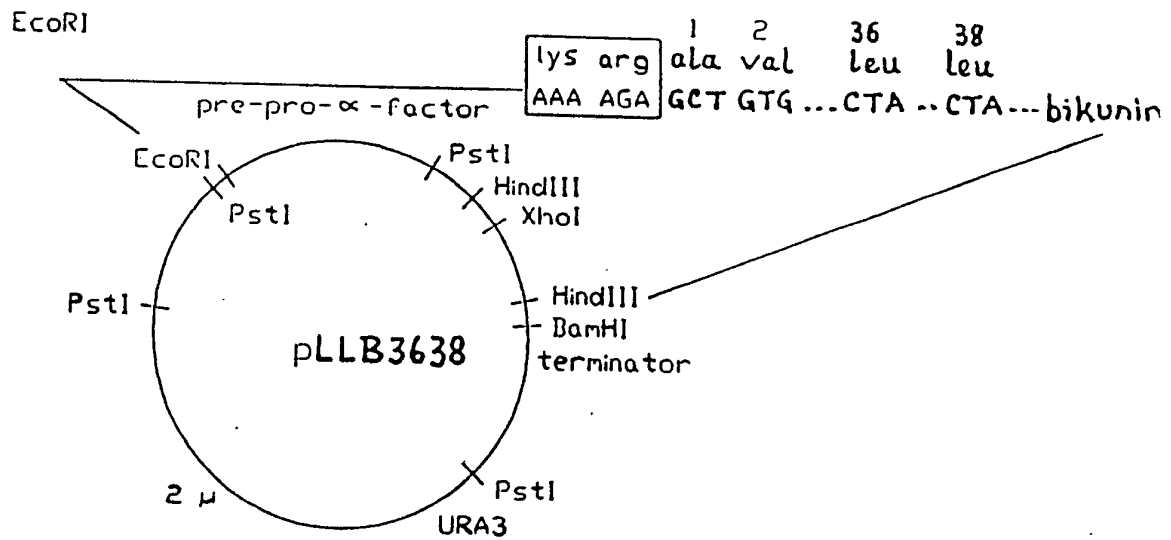


FIG.14

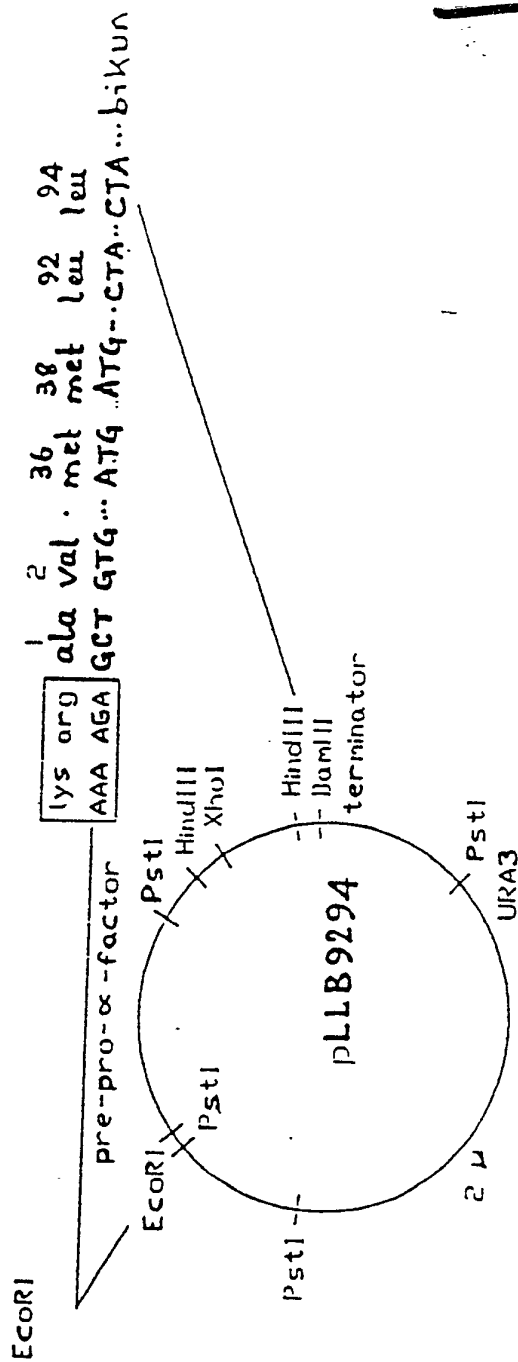


FIG.15

11

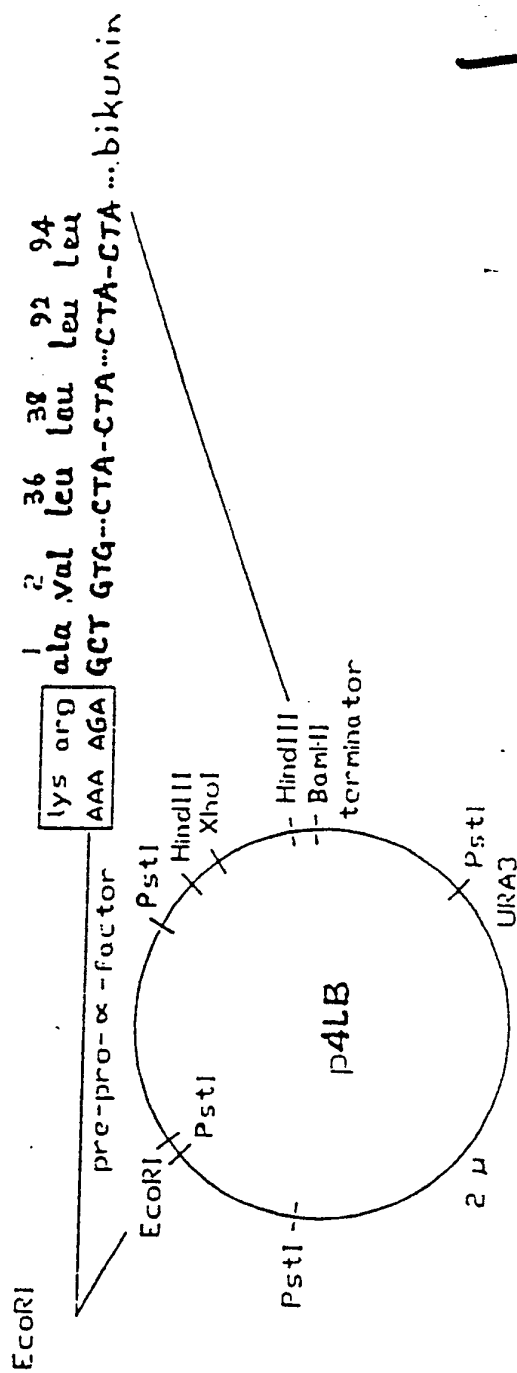


FIG.16

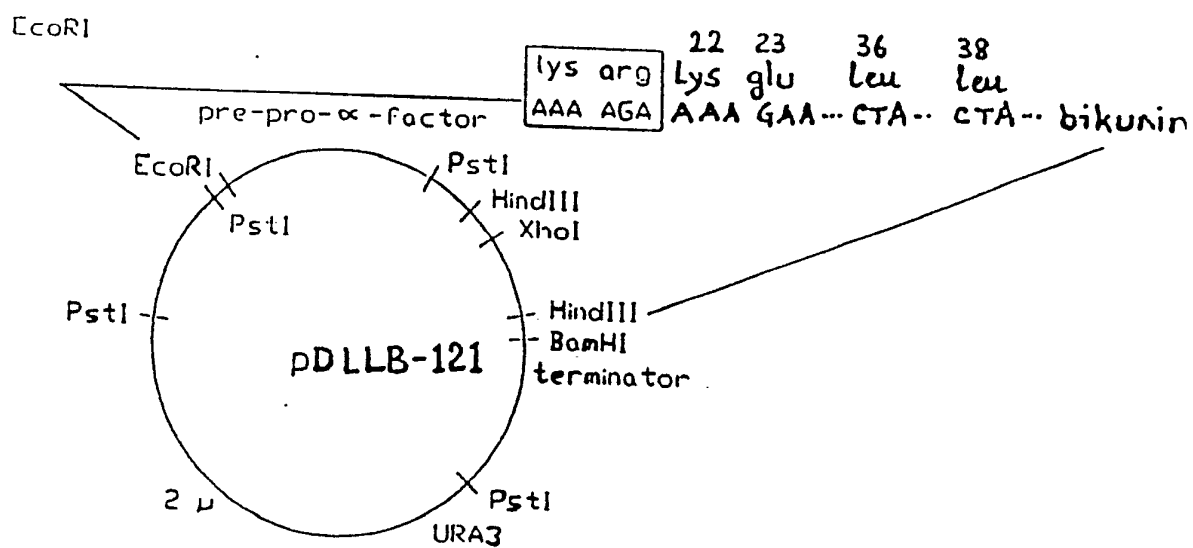


FIG.17