



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0811333-5 B1



(22) Data do Depósito: 16/06/2008

(45) Data de Concessão: 15/09/2020

(54) Título: PROTEÍNA DE FUSÃO COMPREENDIDA DE TACI TRUNCADO E DE IMUNOGLOBULINA FC, SEQUÊNCIA DE DNA, VETOR, MICRORGANISMO TRANSGÊNICO, USO DA PROTEÍNA DE FUSÃO, E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: C07K 19/00; C07K 14/705; C07K 16/00; C12N 15/12; C12N 15/62; (...).

(30) Prioridade Unionista: 15/06/2007 CH 200710111162.2.

(73) Titular(es): YANTAI RONGCHANG BIOTECHNOLOGIES CO., LTD.,.

(72) Inventor(es): ZHENG LIU; JIANMIN FANG.

(86) Pedido PCT: PCT CN2008001162 de 16/06/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/154814 de 24/12/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/12/2009

(57) Resumo: PROTEÍNA DE FUSÃO COMPREENDIDA DE TACI TRUNCADO E DE IMUNOGLOBULINA PC, SEQUÊNCIA DE DNA, VETOR, CÉLULA, USO DA PROTEÍNA DE FUSÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA. Trata-se de uma proteína de fusão otimizada que compreende a região extracelular truncada de N-terminal de TACI (ativador de transmembrana e interator de CAML) e Fc, uma sequência de DNA que codifica a proteína de fusão, um vetor e a célula hospedeira que compreende a proteína de fusão. Também são apresentados um método e uso na preparação da proteína de fusão para o tratamento de doenças.

PROTEÍNA DE FUSÃO COMPREENDIDA DE TACI TRUNCADO E DE IMUNOGLOBULINA FC, SEQUÊNCIA DE DNA, VETOR, MICRORGANISMO TRANSGÊNICO, USO DA PROTEÍNA DE FUSÃO, E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

5

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se à preparação de uma proteína de fusão otimizada, particularmente uma proteína de fusão de TACI-Fc, utilizando a tecnologia de recombinação genética e a sua aplicação para o tratamento de doenças imunológicas.

10

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O processo de desenvolvimento e diferenciação de linfócitos é controlado intensamente por várias citocinas. O estimulador de linfócitos B {BLYS, ou o chamado BAFF, TNSF13B, THANK, TALL-1, zTNF4} e um ligando de indução de proliferação (APRIL) são citocinas que desempenham papéis importantes na regulação da imunoresposta in vivo (Schneider, 2005, Current Opinion in Immunology, 17:282-289; Seyler et al., 2005/ The Journal of Clinic Investigation, 115:3083- 3092}. Elas estimulam o desenvolvimento e a proliferação de linfócitos B para aumentar a expressão de várias imunoglobulinas no sangue. BLYS e APRIL também têm efeitos reguladores essenciais na maturidade de linfócitos T e desse modo na imunidade celular (Wang et al., 2001, Nature Immunology, 2:532-637).

BLYS e APRIL regulam a imunoresposta dos linfócitos através dos receptores em superfícies de células de linfócitos. Ele se liga aos receptores de membrana de célula TACI (ativador de transmembrana e CAML-interator) e BCMA (antígeno de maturação de células B). Além disso, BLYS também pode se ligar a um outro receptor, BAFF-R. O linfócito B expressa TACI, BCMA e BAFF-R. O linfócito T maduro expressa TACT. BLYS e APRIL regulam a ativação, a proliferação e o desenvolvimento de linfócitos através de transduções de sinais mediadas por estes receptores, e desse modo

intensificam as imunorespostas. Além disso, em tumores derivados de linfócitos, BLyS e APRIL também promovem a proliferação de células de tumor e suprimem a apoptose, acelerando desse modo a progressão do tumor.

5 A expressão adicional de BLyS e APRIL é um dos fatores de patogênese para muitas doenças auto-imunes, que incluem mas não ficam a elas limitadas, lupus erythematosus sistêmico (SLE), artrite reumatoide (RA), síndrome de Sjögren, etc. Nas investigações clínicas é mostrado que a
10 concentração de BLyS está freqüentemente correlacionada positivamente à gravidade de doenças auto-imunes. Portanto, a inibição de BLyS e APRIL se transformou em um meio potencialmente eficaz para o tratamento de doenças auto-imunes relacionadas. Entrementes, uma vez que BLyS e APRIL
15 podem acelerar a progressão do tumor de linfócitos B, a inibição de BLyS e APRIL também pode ser utilizada no tratamento de tumores de linfócitos B, tais como a leucemia de linfócito crônica, o mieloma múltiplo, o linfoma de linfócitos B, etc.

20 Uma vez que TACI tem uma grande afinidade com cada um de BLyS e APRIL, é possível utilizar TACI solúvel (porção extracelular de TACI) para impedir as interações de BLyS ou APRIL com seus receptores de membrana (TACI, BCMA, BAFF-R), desse modo bloqueando a atividade biológica de BLyS ou APRIL
25 e tratando de doenças auto-imunes ou tumores.

Foi demonstrado nos estudos que a proteína de fusão da porção extracelular de TACI e o fragmento de IgG Fc (TACI-Fc) podem inibir eficazmente a progressão da doença causada por BLyS (Gross et al., 2001, *Imunity*, 15:289-302). No
30 entanto, nos estudos também é revelado que a proteína de fusão de TACI-Fc construída ao utilizar a porção extracelular de TACI nativo é fácil de ser degradada quando expressa nas células, e os produtos obtidos desse modo são frequentemente

heterogêneos. Portanto, a proteína de fusão de TACI-Fc de TACI nativo com fragmento de Fc não é apropriada para a produção industrial. O objetivo da presente invenção consiste na melhoria da proteína de fusão de TACI-Fc por meio da tecnologia de engenharia genética de modo a desenvolver uma composição farmacêutica aplicável para a produção industrial.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A invenção refere-se aos métodos para a construção e a produção de uma droga de proteína que bloqueia BLYS e APRIL, ao método da preparação da mesma e ao uso da mesma para o tratamento das doenças.

A invenção apresenta diversas proteínas de fusão que são obtidas pela fusão do fragmento de TACI com fragmento de Fc de imunoglobulina e podem bloquear a proliferação de linfócitos B, e a estrutura da proteína de fusão é caracterizada pelo fato de que:

a porção de TACI da proteína de fusão compreende uma sequência parcial da região de terminal amino da região extracelular, a sequência inteira da região rica em cisteína e uma sequência parcial da região de pedículo de TACI; ao passo que a imunoglobulina Fc na proteína de fusão compreende a região de dobradiça, a região CH2 e a região CH3; a sequência de TACI e a sequência de Fc são fundidas diretamente ou através de uma sequência de ligante;

em que o fragmento de TACI pode ser selecionado do grupo que consiste nas posições 13 a 108 ou 13 a 118 na sequência de aminoácido de TACI, e a dita sequência de ligante pode ser 9Gly, e

o fragmento de Fc de imunoglobulina pode ser derivado de Fc da imunoglobulina humana ou animal, e pode ser Fc de comprimento total ou sua sequência parcial; e adicionalmente Fc pode ser derivado de IgG, IgM, IgD e IgA, cada um dos quais inclui todos os isotipos, respectivamente,

tais como IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, e preferivelmente IgG1; e em que o dito fragmento de TACI pode ser selecionado do grupo que consiste em seqüências de TACI de seres humanos e animais.

5 Particularmente, uma proteína de fusão preferível da invenção pode ser:

a. proteína de fusão T1: a qual é produzida ao fundir os 13°-108° aminoácidos de TACI e a imunoglobulina IgG1 Fc (SEQ ID NO.: 1),

10 b. proteína de fusão T2: a qual é produzida ao fundir os 13°-118° aminoácidos de TACI e a imunoglobulina IgG1 Fc (SEQ ID NO.: 2), e

c. proteína de fusão T3: a qual é produzida ao fundir os 13°-118° aminoácidos de TACI, uma seqüência de
15 ligante de 9Gly e a imunoglobulina IgG1 Fc (SEQ ID NO.: 3); e

em que TACI é selecionado do grupo que consiste nas seqüências de regiões extracelulares para o TACI (ativador de transmembrana e interator de CAML) de seres humanos e animais.

20 A invenção também se refere a uma seqüência de DNA que codifica a proteína da invenção.

A dita seqüência de DNA é ilustrada nas SEQ ID NO: 5 a 7.

A proteína de fusão de TACI-Fc com seqüência de
25 TACI nativa não é aplicável para a produção industrial devido à fácil degradação da proteína. O documento PCT/US2002/015910 descreve que a fusão do fragmento de TACI, em que toda a região de terminal amino e uma seqüência parcial da região de pedículo são suprimidas, em que o fragmento de Fc pode
30 impedir a degradação de proteína da proteína de fusão. No entanto, foi relatado que a remoção da região de terminal amino reduz significativamente a atividade biológica de TACI. (Wu et al., 2000, The Journal of Biological Chemistry,

275:35478-35485).

A chave da invenção reside no fato que um sistema de software de computador de redes neurais artificiais de convertase de Pro-proteína (PC) é utilizado para analisar a seqüência de aminoácido da região extracelular de TACI. O resultado da análise mostrou que a seqüência da região extracelular de TACI inclui dois sítios de clivagem de PC (o 9° e o 135° aminoácido), e dois sítios adicionais (o 12° e o 120° aminoácido) têm uma contagem perto do valor limite para o sítio de clivagem de PC. Presume-se que estes sítios de clivagem de PC possam ser essencialmente responsáveis pela degradação de TACI no processo de expressão. Com base nesta descoberta, estes sítios de clivagem de PC foram removidos na otimização da molécula de TACI e os fragmentos de TACI foram fundidos sem os sítios de clivagem de PC a Fc. A experiência provou que a nova proteína de fusão impede eficazmente a degradação de TACI durante a expressão. Uma seqüência truncada de TACI, bem como outros métodos, podem ser utilizados para impedir esses sítios de clivagem de PC. Por exemplo, a mutagênese dirigida a sítio de DNA pode ser utilizada para remover esses sítios de clivagem de PC. Desse modo, vários métodos de otimização podem ser selecionados para atingir a mesma finalidade. A proteína de fusão de TACI-Fc otimizada da invenção retém a maioria dos resíduos na região de terminal amino e uma seqüência longa de aminoácido na região de pedículo da molécula de TACI. A proteína de fusão de TACI-Fc otimizada supera a questão da degradação da proteína. Em comparação com a fusão de TACI-Fc em que a região inteira do N-terminal foi removida, as proteínas de fusão de TACI-Fc otimizadas da invenção mostraram um nível biológico mais elevado de atividade e expressão da proteína.

A construção de proteínas de fusão na invenção é baseada na tecnologia molecular convencional de clonagem, e

os protocolos experimentais específicos podem ser consultados nos vários manuais de laboratório, tais como a segunda e terceira edições de Molecular Cloning: A Laboratory Manual.

O método de síntese de PCR foi utilizado para
5 clonar um DNA que codifica a proteína de fusão acima em um vetor. O vetor para expressar a proteína de fusão pode ser um plasmídio geralmente utilizado em biologia molecular. Uma sequência de peptídeo de sinal é incluída na parte dianteira do terminal amino da proteína de fusão de modo a assegurar a
10 secreção de proteína das células. A sequência de vetor inclui um promotor para dirigir a expressão do gene, sinais de início e interrupção para a translação da proteína, assim como a sequência de poliadenilação (polyA). O vetor pode incluir um gene de resistência dos antibióticos para
15 facilitar a replicação do plasmídio nas bactérias. Além disso, o vetor também pode incluir um gene de seleção de célula eucariótica para a seleção de cepas de células transfectadas estáveis.

Após a construção do plasmídio, a sequência de DNA
20 da proteína de fusão é confirmada pelo arranjo em sequência. Então, a proteína correspondente pode ser expressa pela transfecção do DNA de plasmídio em células. Muitos sistemas de expressão estão disponíveis para expressar tais proteínas de fusão, os quais incluem, mas sem ficar a eles limitados,
25 células de mamíferos, bactérias, levedura, células de insetos, etc.

As proteínas expressas em células de mamíferos são glicosiladas no processo de modificação pós-translacional. As
30 sequências de aminoácidos das proteínas de fusão de TACI-Fc da presente invenção contêm aminoácidos glicosilados; desse modo, as células de mamíferos são as mais preferíveis para expressar estas proteínas. Há várias células de mamíferos apropriadas para a expressão de proteína em grande escala,

tais como células CHO, células SP20, células NS0, células COS, células BHK, e células PerC6. Muitas outras células também podem ser utilizadas para a expressão e a produção destas proteínas, e desse modo são contempladas na invenção.

5 Os polipeptídeos de codificação de plasmídeo podem entrar nas células por meio de transfecção. Há muitos métodos para a transfecção das células, e incluem (mas sem ficar a elas limitados) a eletroporação, e a transfecção mediada por lipossoma ou cálcio, etc.

10 Além das células de mamíferos, outros sistemas de expressão também podem ser utilizados para a expressão destas proteínas de fusão, tais como bactérias, levedura e células de insetos, que também são contempladas na invenção. O rendimento da proteína nestes sistemas de expressão pode ser
15 mais elevado do que aquele em células de mamíferos, mas a proteína produzida nestes sistemas de expressão geralmente não apresenta glicosilação, ou tem uma forma de conjugado de açúcar que é diferente daquela nas células de mamíferos.

Após a expressão da proteína, o ensaio
20 imunosorvente ligado por enzima (ELISA) ou outros métodos podem ser utilizados para determinar as concentrações das proteínas de fusão em sobrenadantes de cultura de células. Devido ao fato que estas proteínas de fusão contêm o
fragmento de Fc de imunoglobulina, a cromatografia de
25 afinidade de proteína A ou G pode ser utilizada como uma etapa inicial de purificação para isolar estas proteínas de fusão.

A função fundamental da proteína de fusão de TACI-Fc da invenção é de bloquear BLyS e APRIL, ao passo que BLyS
30 e APRIL são fatores chaves para estimular o desenvolvimento de B-linfócitos e a maturação de T-linfócitos. Consequentemente, a proteína de fusão de TACI-Fc pode ser utilizada nas doenças relacionadas com a função imunológica

anormal e as doenças causadas pela proliferação anormal de B-linfócitos. Estas doenças incluem (mas sem ficar a elas limitadas) a artrite reumatoide, lupus erythematosus sistêmico, e tumor de linfócitos B. A proteína de fusão de TACI-Fc pode ser injetada no corpo humano como proteína recombinante purificada. Alternativamente, a sequência de DNA que codifica a proteína de fusão pode ser introduzida em um vetor apropriado para expressar a proteína de fusão no corpo do paciente por meio da terapia de genes ou da terapia de células. Portanto, há muitas abordagens para a utilização da proteína de fusão da invenção, as quais incluem o uso não somente da proteína em si, mas também do DNA que codifica a proteína de fusão.

A invenção também se refere a uma composição farmacêutica da proteína de fusão, a qual pode compreender um veículo farmacêuticamente aceitável. A composição farmacêutica pode ser qualquer forma de formulação farmacêutica, preferivelmente uma formulação para a injeção, incluindo a forma líquida e a forma liofilizada. A composição farmacêutica pode ser preparada de acordo com a metodologia farmacêutica convencional, a qual compreende a mistura do ingrediente ativo, isto é, a proteína de fusão da presente invenção, com um veículo farmacêuticamente aceitável para preparar uma forma desejada de dosagem baseada na tecnologia farmacêutica.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra a análise da sequência de aminoácido de TACI por redes neurais artificiais de convertase de pro-proteína (PC). O 9° e o 135° resíduos de aminoácido na região extracelular de TACI são indicados como sítios de clivagem de PC. O 12° e o 120° resíduos de aminoácido também têm um valor próximo ao limite para o sítio de clivagem de PC.

A Figura 2 mostra as estruturas da proteína de TACI nativa de comprimento total e quatro proteínas de fusão de TACI-Fc.

A Figura 3 mostra a comparação da expressão da proteína das células CHO para as quatro proteínas de fusão de TACI-Fc.

A Figura 4 mostra o ensaio para uma ligação de quatro proteínas de fusão de TACI-Fc a BLYS. Os resultados mostram que toda a proteína de fusão pode se ligar a BLYS, em que T3 tem maior afinidade com BLYS.

A Figura 5 mostra a análise de SDS-PAGE da proteína de fusão T3 purificada. A proteína de fusão T3 expressa em um sistema de expressão de CHO de alto desempenho apareceu como uma única faixa de proteína no gel, e tem um peso molecular aparente de aproximadamente 42 kD, que é consistente com a expectativa do peso molecular de proteína de fusão T3 glicosilada.

A Figura 6 mostra o efeito significativo contra as doenças auto-imunes da proteína de fusão T3 no modelo de artrite de camundongo induzida por colágeno. A progressão da artrite do camundongo foi medida por contagens clínicas de artrite. Os resultados mostram que os camundongos tratados com a proteína de fusão de TACI-Fc T3 têm contagens clínicas significativamente mais baixas do que aqueles do grupo de controle ($P < 0,01$).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção apresenta os seguintes exemplos ilustrando detalhadamente o projeto, a construção e a avaliação das proteínas de fusão de TACI-Fc. No entanto, o conteúdo e o uso da invenção não ficam limitados ao âmbito dos exemplos.

Exemplo 1: Análise da sequência de TACI

A convertase de Pro-proteína (PC) pode clivar

especificamente polipeptídeos nas células. Para muitas proteínas, a clivagem de PC é uma etapa importante durante a modificação pós-translacional da proteína. A família de PC consiste em um número de enzimas, que reconhecem e clivam seqüências específicas de aminoácidos. As redes neurais artificiais de PC são um sistema de software de computador que utiliza um banco de dados para sítios conhecidos de clivagem de PC para predizer os sítios de clivagem de PC que existem em uma seqüência de proteína. O sistema pode ser utilizado para analisar quaisquer sítios de clivagem de PC potenciais em uma proteína. A invenção analisou a seqüência de aminoácido de TACI utilizando a rede neural artificial de PC, e foi verificado que existem dois sítios de clivagem de PC (o 9° e o 135° aminoácidos) na região extracelular de TACI. Além disso, dois sítios adicionais (o 12° e o 120° aminoácidos) têm contagens próximas do limite para o sítio de clivagem de PC (Figura 1). Portanto, é possível projetar uma proteína de fusão de TACI-Fc otimizada ao remover esses sítios de clivagem de PC e ao fundir a seqüência de TACI sem de clivagem de PC potenciais a Fc, de modo a impedir a clivagem da proteína. Com base nessas descobertas, foram construídas diversas proteínas de fusão de TACI-Fc, em que as seqüências de TACI foram derivadas da seqüência de TACI nativa entre o 12° e o 120° aminoácido (Figura 2). As características comuns compartilhadas por estas novas proteínas de fusão de TACI-Fc são que: 1) a seqüência principal da região de terminal amino de TACI é compreendida, 2) toda a seqüência da região rica em cisteína é compreendida, e 3) a seqüência parcial da região de pedículo é compreendida.

Exemplo 2. Construção de proteínas de fusão e plasmídios que codificam as mesmas.

O RNA total foi isolado e purificado de células

mononuclear do sangue periférico humano utilizando o kit de purificação de RNA total Qiagen. O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total com transcriptase reversa. Então os fragmentos desejados de TACI foram obtidos através da amplificação da reação de cadeia de polimerase (PCR) com primers apropriados. O fragmento de Fc de imunoglobulina foi obtido através da amplificação de PCR de um plasmídio de IgG1 Fc clonado. Finalmente, as seqüências TACI e de Fc foram fundidas por meio de PCR, e conseqüentemente as seqüências de DNA de proteínas de fusão de TACI-Fc foram construídas com sucesso.

As reações de PCR compreendem: trinta ciclos de desnaturação a 95°C por trinta segundos; recozimento a 56°C por 45 segundos; e extensão a 72°C por dois minutos. Os produtos PCR de TACI e de Fc foram clonados respectivamente no plasmídio pCR2.1 ao utilizar o kit de clonagem TA. Os plasmídios foram transformados em E. coli. Colônias brancas de E. coli foram selecionadas e desenvolvidas no meio LB durante toda a noite. Os plasmídios foram então isolados ao utilizar o kit de plasmídio Qiagen. As seqüências de TACI e de Fc foram confirmadas através de digestões de enzimas de restrição e arranjadas em seqüência de DNA. Finalmente, os cDNA de TACI e de IgG Fc foram fundidos ao empregar um método de PCR de sobreposição. Os fragmentos de fusão de TACI-Fc foram introduzidos em um plasmídio de expressão de mamíferos, os plasmídios recombinantes foram transformados em E. coli, as colônias positivas foram selecionadas, e as seqüências alvo foram confirmadas através de digestão de enzimas de restrição e análise de arranjo em seqüência de DNA. Finalmente, os plasmídios resultantes foram utilizados para transfectar células CHO para expressar as proteínas de fusão.

aminoácidos 13-108 de TACI da proteína T1 + SEQ ID NO.: 1 e 5 de Fc

aminoácidos 13-118 de TACI da proteína T2 + SEQ ID NO.: 2 e 6 de Fc

aminoácidos 13-118 de TACI da proteína T3 + SEQ ID NO.: 3 e 7 de sequência de ligante de 9Gly + Fc

5 Além disso, este estudo também incluiu uma proteína T4 de fusão para a comparação. A diferença da proteína T4 de outras três proteínas de fusão é a ausência da região do N-terminal de TACI em T4. Realmente, T4 é uma proteína de fusão entre os resíduos de aminoácidos 30-110 de TACI e a sequência
10 de Fc (vide SEQ ID NO.: 4 e 8).

Sequências de primers para a proteína de fusão T1:

Primer de avanço: AGCCGTGTGGACCAGGAGGAG

Primer reverso: GAGCTTGTCTCACAGAAGTATG

Sequências de primers para a proteína de fusão T2:

15 Primer de avanço: AGCCGTGTGGACCAGGAGGAG

Primer reverso: GAGCTCTGGTGGAAGGTTCACTG

Sequências de primers para a proteína de fusão T3:

Primer de avanço: AGCCGTGTGGACCAGGAGGAG

Primer reverso: ACCTCCACCTCCACCTCCACCTCCACCGAGCTCT

20 GGTGGAAGGTTCACTGGGCTCCT

Sequências de primers para a proteína de fusão T4:

Primer de avanço: GCTATGAGATCCTGCCCCGAAG

Primer reverso: TGAAGATTTGGGCTCGCTCC

Exemplo 3: Expressão de proteínas de fusão de TACI-
25 Fc nas células.

A invenção ilustrou a expressão de proteínas de fusão de TACI-Fc em células de mamíferos, por exemplo. Quatro proteínas de fusão, T1, T2, T3 e T4 foram clonadas no plasmídio pcDNA3.1 (Invitrogen). Uma sequência de peptídeo de
30 sinal Flt-1 foi adicionada na extremidade 5' de cada proteína de fusão. Quatro plasmídios de TACI-Fc foram purificados ao utilizar o kit de purificação de DNA de plasmídio de alta pureza (QIAGEN). O DNA de plasmídio foi introduzido então em

células CHO, respectivamente, com o kit de transfecção FUGEN6 (ROCHE). O método de transfecção transiente foi utilizado para comparar os níveis de expressão das quatro proteínas de fusão de TACI-Fc. As células CHO foram cultivadas em placas de cultura de células no meio DMEM completo com soro fetal de vitela a 10%. Quando as células alcançaram uma determinada densidade, o complexo de DNA de plasmídio com o reagente FUGEN 6 (Roche) foi adicionado à cultura. Após um cultivo por três dias, os sobrenadantes foram coletados, os quais contêm proteínas de fusão expressas. As concentrações de proteínas de fusão foram determinadas com o método ELISA. Os resultados de concentrações de proteínas foram mostrados na Figura 3: T3 tem a expressão mais elevada, inter alia, seguida por T2. T4 tem o nível mais baixo de expressão. Desse modo, em vista da expressão da proteína, a proteína de fusão T3 é a melhor composição molecular.

Exemplo 4: Avaliação de atividades de ligação da proteína de fusão a BLyS.

Após a expressão de cada proteína de fusão, foi determinada a sua atividade de ligação a BLyS em um ensaio de ligação de BLyS. Neste ensaio, a proteína BLyS recombinante (R&D Systems) foi revestida primeiramente sobre placas ELISA de 96 cavidades. Os sítios de ligação de proteína não-específicos foram bloqueados com solução bloqueadora de BSA a 2%. As proteínas de fusão de TACI em várias concentrações foram adicionadas então nas respectivas cavidades. As placas foram incubadas por duas horas a 37°C e então lavadas antes da adição do conjugado de Ig anticorpo-HRP anti-humano de coelho. Finalmente, o substrato de peroxidase foi utilizado para o desenvolvimento da cor. Uma leitora de placa ELISA foi utilizada para medir o valor de OD para cada cavidade da placa de 96 cavidades, em que um valor aumentado de OD indica a ligação da proteína de fusão a BLyS.

Foi verificado que T3 tem a melhor ligação a BlyS, T1 e T2 têm ligações moderadas, e T4 tem a ligação mais baixa (Figura 4). Desse modo, em vista da expressão da proteína e da atividade de ligação a BlyS, a proteína de fusão T3 é a
5 melhor composição molecular.

Exemplo 5: Estabelecimento de linhagens de células de expressão elevada.

Depois de ter determinado que a proteína de fusão T3 é a melhor composição molecular, foi estabelecida uma cepa
10 estável e de elevada expressão de células CHO ao utilizar transfecção estável e amplificação de genes. O gene que codifica para a proteína de fusão T3 foi clonado em um plasmídio que contém o gene de DHFR. O DNA do plasmídio de alta pureza foi purificado ao utilizar o kit de purificação
15 de plasmídio QIAGEN, e as células CHO foram transfectadas com o plasmídio ao utilizar eletroporação. As células transfectadas foram cultivadas no meio de seleção para obter clones resistentes. Methotrexate (MTX) foi adicionado para amplificar o gene de T3 e para obter clones de células de
20 elevada expressão. Finalmente, as células CHO do clone selecionado foram expandidas na cultura, e a proteína de fusão foi produzida em grande escala no bioreator. A concentração da proteína de fusão foi determinada por meio de ELISA. Utilizando esta abordagem, a proteína de fusão T3 foi
25 produzida com sucesso em larga escala. O rendimento da proteína de fusão pode ser mais elevado de 20 pg por célula por dia. A proteína de fusão T3 pode ser purificada ao utilizar cromatografia de afinidade de proteína A ou G.

Exemplo 7: Identificação eletroforética da proteína
30 de fusão de TACI-Fc

A invenção demonstrou experimentalmente que nenhuma degradação da proteína de fusão ocorre durante a expressão da proteína de fusão otimizada. A cepa de células CHO para a

expressão elevada da proteína de fusão T3 foi cultivada no frasco da cultura de célula. Depois que as célula alcançaram a densidade elevada, o sobrenadante da cultura da célula foi coletado e a proteína de fusão foi purificada ao utilizar cromatografia de afinidade de proteína A. A proteína de fusão purificada foi misturada com o tampão de carga de SDS-PAGE e fervida por três minutos. A proteína de fusão foi separada em gel de poliacrilamida e tingida com o azul brilhante de Coomassie. As faixas da proteína foram visualizadas depois que o gel foi limpo com metanol. Foi mostrado que a proteína T3 apareceu como uma única faixa no gel (Figura 5), com um peso molecular aparente de aproximadamente 42 kD, que é consistente com a expectativa do peso molecular da proteína de fusão T3 glicolisada. É importante que nenhuma faixa de proteína a pesos moleculares menores do que 42 kD fosse observada. Este resultado demonstrou que a proteína de fusão de TACI-Fc otimizada da presente invenção pode impedir eficazmente a clivagem e a degradação da proteína no processo de expressão, e desse modo pode ser utilizada para a produção industrial em grande escala.

Exemplo 8: Efeitos terapêuticos da proteína de fusão de TACI-Fc otimizada na doença auto-imune

Foi demonstrado no modelo de artrite de camundongo induzida por colágeno que a proteína de fusão de TACI-Fc otimizada tem uma atividade biológica anti-auto-imune. Camundongos DBA/1 na idade de oito semanas foram divididos em dois grupos com dez animais em cada grupo. Cada um dos camundongos foi injetado intracutaneamente com 200 µg de colágeno do tipo II de bovino misturado com adjuvante de Freund completo. Após 21 dias, cada um dos camundongos foi injetado intracutaneamente com proteína de colágeno do tipo II de bovino misturada com adjuvante de Freund incompleto. A partir do dia 24, cada um dos camundongos no grupo de teste

foi injetado subcutaneamente com 100 µg da proteína de fusão T3 por três vezes na semana. Os camundongos no grupo de controle foram injetados com IgG humano normal à mesma dosagem. A progressão da artrite foi medida ao utilizar contagens clínicas de artrite. Foi demonstrado que a gravidade da artrite nos camundongos tratados com T3 é significativamente menor do que aquela nos camundongos de controle e que houve uma diferença significativa ($P < 0,01$) nas contagens clínicas entre os dois grupos (Figura 6).

Resumidamente, as proteínas de fusão de TACI-Fc otimizadas da invenção impedem a degradação da proteína no processo da expressão, têm uma atividade biológica mais intensa, e exibem níveis elevados de expressão da proteína, e desse modo elas podem ser utilizadas na produção industrial em larga escala.

REIVINDICAÇÕES

1. PROTEÍNA DE FUSÃO COMPREENDIDA DE TACI TRUNCADO E DE IMUNOGLOBULINA FC, caracterizada pela porção de TACI da proteína de fusão compreender uma sequência da região de terminal amino da região extracelular começando do décimo terceiro resíduo de aminoácido, toda a sequência da região rica em cisteína, e uma sequência parcial da região de pedículo de TACI; a porção de Fc de imunoglobulina da proteína de fusão compreender a região de dobradiça, a região CH2 e a região CH3; e a porção de TACI e a porção de Fc serem fundidas diretamente ou através de uma sequência de ligante; em que a porção TACI é selecionada do grupo que consiste no 13° ao 108° aminoácidos e no 13° ao 118° aminoácidos de TACI.

2. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela a sequência do ligante ser 9Gly; e a porção de Fc de imunoglobulina ser derivada de Fc de imunoglobulinas de seres humanos ou animais IgG, IgM, IgD e IgA, incluindo todos os isotipos de cada um.

3. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela porção de Fc de imunoglobulina ser derivada de IgG1.

4. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela sequência de aminoácido da proteína de fusão ser selecionada das sequências determinadas em ID SEQ NO.: 1 a 3.

5. SEQUÊNCIA DE DNA, caracterizada pela sequência ser determinada nas ID SEQ NO. 5 a 7.

6. VETOR, caracterizado por compreender a sequência de DNA, conforme definida na reivindicação 5, que está operacionalmente ligado a um promotor.

7. MICRORGANISMO TRANSGÊNICO, caracterizado por compreender o vetor, conforme definido na reivindicação 6, o qual é utilizado para a expressão da proteína de fusão correspondente, conforme definida na reivindicação 1.

5 8. USO DA PROTEÍNA DE FUSÃO, conforme definida na reivindicação 1, caracterizado por servir na manufatura de um medicamento para bloquear BLys ou APRIL.

10 9. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada por compreender a proteína de fusão, conforme definida na reivindicação 1.

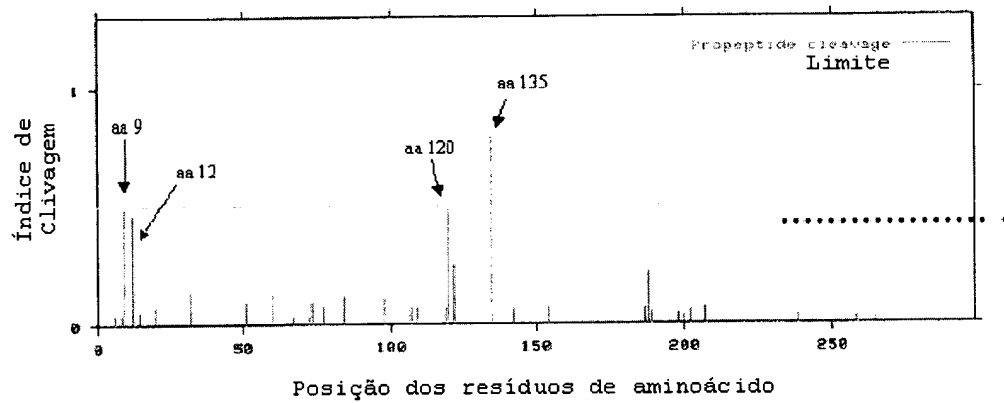


Fig1

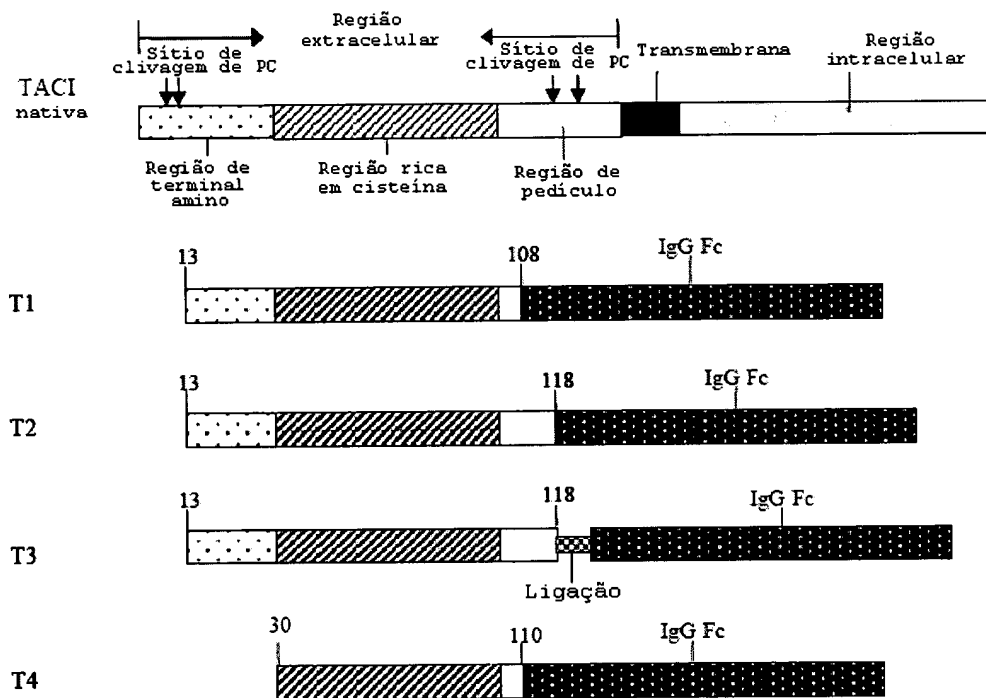


FIG 2

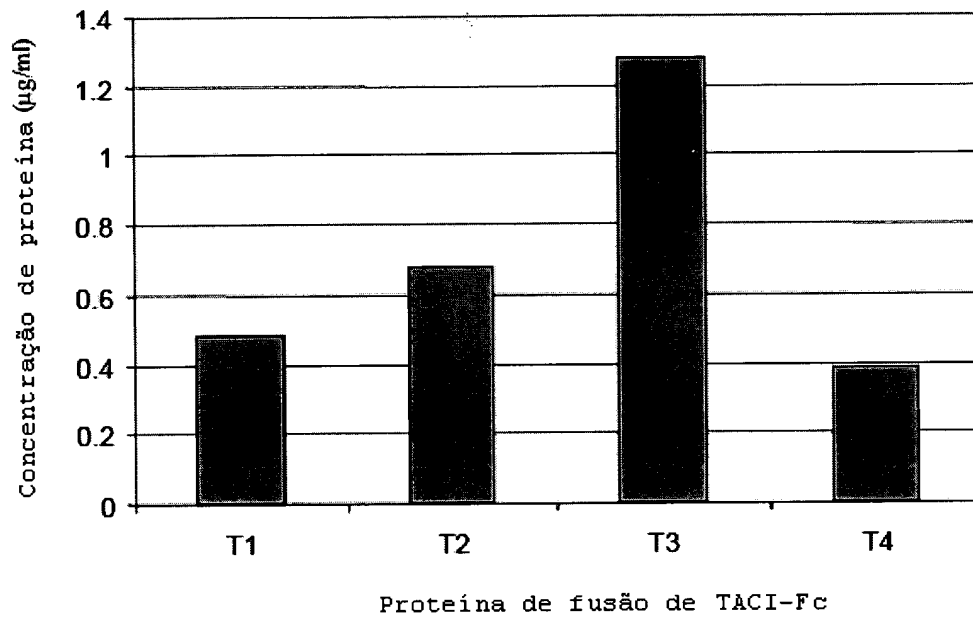


Fig3

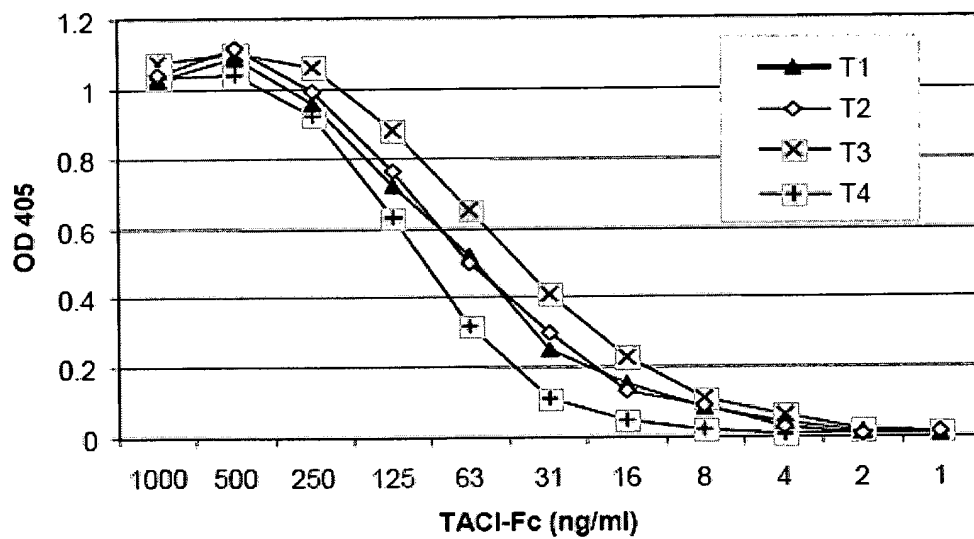


Fig 4

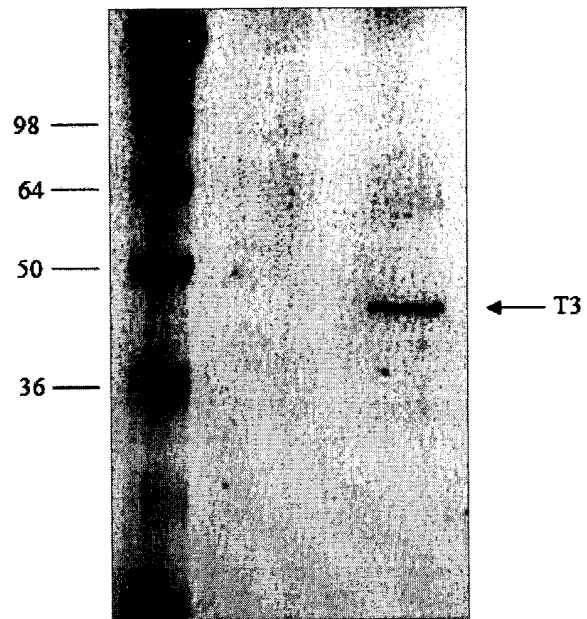


Fig 5

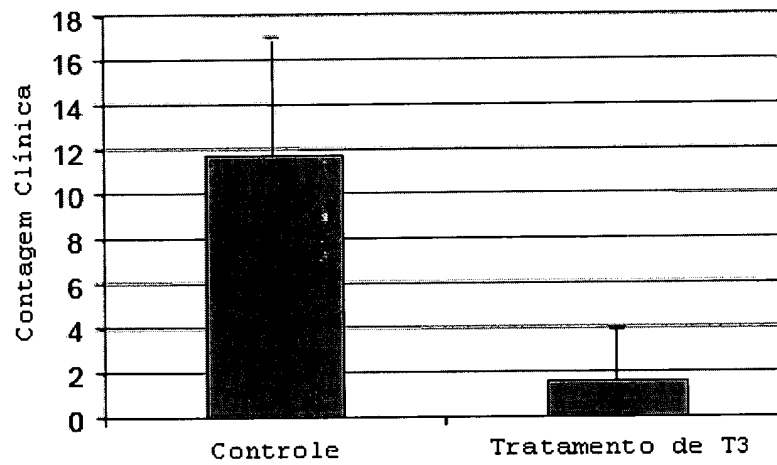


Fig 6