

(11) Número de Publicação: **PT 1310558 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/12 (2006.01) **C12N 15/62** (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1994.02.02	(73) Titular(es): XOMA TECHNOLOGY LTD.	
(30) Prioridade(s): 1993.02.02 US 13801	XOMA (US) LLC, 2910 SEVENTH STREET	US
(43) Data de publicação do pedido: 2003.05.14	BERKELEY, CA 94710	
(45) Data e BPI da concessão: 2007.05.30 075/2007	(72) Inventor(es): ARNOLD HORWITZ DAVID BURKE MANIK BALTAIAN LYNN GRINNA GEORGIA THEOFAN	US US US US US
	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **PRODUTOS ESTÁVEIS DE PROTEÍNAS BACTERICIDAS INDUTORAS DA PERMEABILIDADE E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM**

(57) Resumo:

RESUMO

PRODUTOS ESTÁVEIS DE PROTEÍNAS BACTERICIDAS INDUTORAS DA PERMEABILIDADE E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM

A presente invenção tem por objecto novos produtos de proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP) em que o resíduo de cisteína numero 132 ou número 135 é substituído por outro resíduo aminoácido, de preferência por um resíduo de alanina ou de serina e/ou em que o resíduo de leucina na posição i93 é o resíduo ao terminal carboxi. A presente invenção também tem por objecto as sequências de ADN que codificam os métodos para a produção das mesmas em células hospedeiras adequadas e ainda composições farmacêuticas homogêneas e estáveis que contêm análogos adequados para serem utilizados no tratamento de infecções bacterianas gram-negativas e das suas sequelas.

DESCRIÇÃO

PRODUTOS ESTÁVEIS DE PROTEÍNAS BACTERICIDAS INDUTORAS DA PERMEABILIDADE E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona novos produtos de proteínas bactericidas indutoras da permeabilidade e composições farmacêuticas estáveis que os contêm.

O lipopolissacárido (LPS) é um componente importante da membrana exterior das bactérias gram-negativas e é constituído pelos polissacáridos da cadeia lateral O, específicos do serotipo, ligados a uma região conservada do aligossacárido nuclear e ao lípido A. Ratz, *Ann. Rev. Biochem.* 59: 129-170 (1990). O LPS é um mediador importante na patogénese do choque séptico gram-negativo, que é uma das causas principais de morte nas unidades de cuidados intensivos nos Estados Unidos da América do Norte. Morrison et al., *Ann. Rev. Med.* 38:417-432 (1987).

As proteínas que se ligam ao LPS foram já identificadas em diversos tecidos de mamíferos. Morrison, *Microb. Pathol.*, 7: 389-398 (1998); Raeder, et al., *Infect. Immun.*, 57: 1054-1058 (1989). Entre as proteínas mais exaustivamente estudadas que se ligam ao LPS está a proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP), que é uma proteína básica existente nos grânulos azurofílicos dos leucócitos polimorfonucleares. A proteína BIP humana foi isolada a partir de neutrófilos polimorfonucleares por extracção em meio ácido combinada com a cromatografia de permuta iónica (Elsbach, *J. Biol. Chem.*, 254: 11000 (1979)).

ou por cromatografia de afinidade de *E. coli* [Weiss, et al., *Blood*, 69: 652 (1987)] e possui uma actividade bactericida poderosa contra um espectro amplo de bactérias gram-negativas.

Embora a proteína BIP seja citotóxica contra muitas bactérias gram-negativas, não há nenhuma referência sobre a actividade citotóxica contra bactérias gram-positivas, fungos ou células de mamíferos. A sequência aos aminoácidos de toda a proteína BIP humana e também da sequência do ADN que codifica tal proteína estão ilustradas na figura 1 da obra de Gray et al., *J. Biol. Chem.*, 264: 9505 (1989) que aqui se considera incorporada por referência (SEQ ID N^{os} 1 e 2). O trabalho publicado de Gray et al. descreve o isolamento do ADNc que codifica a BIP humana a partir de um banco de ADNc obtido a partir de células induzidas com DMSO, pertencentes a linhagem celular HL-60 da leucemia promiilocítica humana (ATTC CCL 240). Amplificações efectuadas por múltiplas RCP com o ADN proveniente de um banco de ADNc recentemente preparado, obtidas a partir de tais células HL-60 induzidas com DMSO, revelaram a existência de vários ADNc que codificam a BIP humana em que o codão que especifica a valina na posição 151 dos aminoácidos uuu e GTC (conforme ilustrado na SEQ ID N^o 1) ou GTG. Além disso, comprovou-se também que as espécies de ADNc que utilizam GTG para especificar a valina na posição 151 também especificam guu a lisina (AAG) para a posição do aminoácido 185 (conforme ilustrado nas sequências 1 e 2) guu um resíduo de ácido glutâmico (GAG) nessa posição.

O fragmento proteolítico correspondente à parte do terminal N da holoproteína BIP humana possui a eficácia antibacteriana da holoproteína BIP humana de 35 kDa obtida naturalmente. Em contraposição à parte do terminal N, a

região do terminal C da proteína BIP humana isolada revela apenas uma actividade antibacteriana ligeiramente detectável. Ooi et al., *J. Exp. Med.*, 174: 649 (1991). Foi já produzido um fragmento do terminal N da BIP, constituído aproximadamente pelos primeiros 199 aminoácidos da holoproteína BIP humana, por métodos recombinantes, formando uma proteína de 23 kDa. Gazzano-Santoro et al., *Infect. Immun.* 60: 4754-4761 (1992). Ver também o documento da patente de invenção WO 92/03535 (PCT/4591/03758) que descreve análogos e variantes da proteína BIP.

A planeada utilização clínica de produtos de BIP para o tratamento de sépsia gram-negativa nos seres humanos instigou esforços significativos para a produção de grandes quantidades de produtos de BIP recombinante (BIPr), adequados para incorporação em preparações farmacêuticas homogêneas e estáveis. Por exemplo, o pedido de patente de invenção norte-americana co-pendente e de que os requerentes são co-proprietários, com o número de série 08/072.063, publicada como patente de invenção WO 93/23540 [pedido de patente de invenção europeia n° 93913992.9], da autoria de Grinna, divulga métodos novos para a purificação de produtos de BIP recombinante, expressos e segregados por células hospedeiras de mamíferos transformadas geneticamente e criadas em cultura. A eficácia dos processos de purificação é ali demonstrada o propósito de produtos de células de CHC (em inglês CHO) transformadas que expressam ADN que codifica a sequência "líder" de 31 aminoácidos da BIL humana e os 199 resíduos iniciais do terminal amino da proteína perfeitamente desenvolvida (isto é, correspondentes aos aminoácidos desde -31 e -199 da SEQ ID N° 2). O pedido de patente de invenção norte-americana co-pendente, de os requerentes são co-proprietários, com o número de série 08/064.693, publicado como sendo a patente de

invenção Nº 93/23434, da autoria de Theofan *et al.*, e dos novos produtos análogos da proteína BIP produzida por via recombinante, resultantes da expressão do ADN que codifica a sequência líder da BIP e quer 191 quer 199 resíduos do terminal amino da BIP humana fundidos com o ADN que codifica uma região constante de uma cadeia pesada da imunoglobulina.

Os esforços desenvolvidos para a produção de produtos de BIP de qualidade farmacêutica para o tratamento de sepsia gram-negativa em seres humanos ainda não permitiram obter resultados uniformemente satisfatórios. Uma razão fundamental para isso é a natureza da sequência de aminoácidos da BIP humana e a natureza do ambiente da célula hospedeira recombinante em que os produtos são produzidos. Como exemplo, é possível purificar com bons rendimentos produtos de BIPr biologicamente activos que contenham os 199 resíduos iniciais da BIP [BIPr(1-199)] produzidos como produtos secretórios de células hospedeiras de OHC transfectadas. No entanto, os produtos de BIP isolados contêm inicialmente formas diméricas da BIP e também uma espécie de aducto de cisteína. Além disso, os produtos de BIP podem ser instáveis durante a armazenagem para valores de temperatura e de pH fisiológicos, daí resultando a formação de outras formas diméricas e de aductos. Tais formas diméricas e de aductos, apesar de conservarem a actividade biológica, não são adequadas para incorporação em preparações farmacêuticas destinadas a utilização pelos seres humanos. A formação de dímeros e a formação de aductos de cisteína são provavelmente uma consequência do facto de a BIP e três resíduos de aminoácidos de cisteína, todos eles colocados dentro da região do terminal amino da BIP biologicamente activa, isto é, nas posições 132, 135 e 175. A formação de uma única

ponte de dissulfureto entre dois àos três resíduos cisteína permite a formação de dímeros ou a formação de adutos de cisteína, ficando o restante radical cisteína livre no citoplasma da célula hospedeira e/ou no sobrenadante da cultura celular.

Os próprios produtos monoméricos da BIPr revelam graus variáveis de ~~alta~~ heterogeneidade em termos do número de resíduos do terminal carboxi presente em tais produtos. Por exemplo, é difícil detectar o produto de expressão de comprimento completo num meio que contenha as células hospedeiras transformadas ou transfectadas com o ADN que codifica a BIPr 1 - 199. Em vez disso, os produtos de expressão obtidos a partir de tais células representam um conjunto heterogêneo de formas truncadas no terminal carboxi do fragmento do terminal N da BIPr. Com efeito, o produto previsível de comprimento completo (1-199) não é frequentemente detectado como substância que esteja entre as Formas de BIPr presentes nesse conjunto heterogêneo. Presume-se que a heterogeneidade da sequência de aminoácidos do terminal carboxi dos produtos de BIPr (1-199) resulte da actividade das carboxipeptidases no citoplasma das células hospedeiras e/ou no sobrenadante da cultura.

Um outro problema observado aquando da preparação de produtos de BIP de qualidade farmacêutica é a formação e partículas macroscópicas que fazem diminuir a homogeneidade do produto e ~~também~~ fazem diminuir a sua actividade. Uma composição farmacêutica preferida, contendo produtos de BIPr em conformidade com a presente invenção, compreende a combinação de um agente tensioactivo que é um polioxâmico (copolímero de blocos de polioxipropilano - polioxietileno) e um agente tensioactivo que é um poliascorbato (um éster de

um ácido gordo com polioxietileno e sorbitano]. Tais combinações estão explicadas no pedido de patente de invenção norte-americana depositado simultaneamente, co-pendente e de que os requerentes são co-proprietários, com o número da série 08/012.360, publicado como sendo a patente de invenção NO 94/17819 (pedido de patente de invenção europeia nº 94907963.6) e ali se afirma que possuem efeitos sinérgicos na estabilização de polipeptídeos farmacologicamente activos, contra a formação de partículas. A preferência máxima vai para uma combinação em que o produto de BIPr se encontra presente numa concentração de 1 mg/mL em soluto salina tamponada com citrato (citrato 0,02 M, NaCl 0,15 M a pH 5,0), a qual contém 0,1 % em peso de poloxâmero 188 (Pluronic F-68, BASF Wyandotte, Parsippany, NJ) e 0,002 % em peso de polissorbato 80 (Tween 80, ICI Americas Inc., Wilmington, DE).

Nesta especialidade continua a ser necessário dispor de produtos aperfeiçoados de BIPr adequados para incorporação em preparações farmacêuticas homogêneas e estáveis. Tais produtos deveriam, de forma ideal, poder ser obtidos em grandes quantidades e rendimentos a partir de células hospedeiras transformadas, deveriam conservar as actividades biológicas bactericidas e de ligação ao LPS típicas da EIP e deveriam possuir uma capacidade limitada para constituírem formas diméricas e aductos de cisteína e ainda deveriam ser caracterizados por uma variação limitada no terminal carboxi.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona novos produtos de fragmentos proteicos e proteínas BIP produzidas por via recombinante e biologicamente activas ("BIPr") que se

caracterizam por uma resistência à dimerização e à formação de aductos de cisteína, o que faz com que tais produtos sejam muitíssimo convenientes para fins farmacêuticos. A invenção também proporciona produtos de BIPr que se caracterizam por uma menor heterogeneidade molecular no terminal carboxi. A invenção também proporciona novas sequências de ADN que codificam produtos de BIPr e produtos análogos, vectores plasmídicos que contêm esse ADN, células hospedeiras estavelmente transformadas ou transfectadas com os plasmidos, métodos preparatórios recombinantes, composições farmacêuticas estáveis e métodos de tratamento.

A presente invenção também tem por objecto análogos proteicos de BIPr que contêm um fragmento do terminal N da BIP em que um resíduo de cisteína na posição 132 ou 135 dos aminoácidos é substituído por outro resíduo de aminoácido, de preferência um aminoácido não polar, tal como a serina ou a alanina. De acordo com um exemplo preferido da presente invenção, o resíduo de cisteína na posição 132 de um polipéptido que compreenda os primeiros 199 resíduos do terminal N da BIP é substituído por um resíduo de alanina num produto recombinante designado por "BIPr(1-199)ala¹³²". Também num exemplo preferido a cisteína na posição 135 de um fragmento de BIP constituído pelas primeiros 199 resíduos do terminal N da BIP é substituído por um resíduo de serina, daí resultando um produto recombinante designado por "BIPr(1-199)ser¹³⁵". Considera-se muitíssimo preferível um produto recombinante designado por "BIPr(1-199)ala¹³²" que se caracteriza por uma menor heterogeneidade em termos da identidade do seu resíduo do terminal carboxi. Além disso, a presente invenção também divulga um polipéptido que compreende os primeiros 193 resíduos do terminal amino da BIP e que possui um códon de paragem imediatamente a seguir ao códon para a leucina na posição 193.

A presente invenção também tem por objecto sequências de ADN que codificam a proteína BIPr e os produtos de fragmentos proteicos descritos supra. Tais sequências de ADN também podem codificar a sequência líder da BIP de 31 resíduos e o sinal de poliadenilação da BIP. A presente invenção também proporciona vectores plasmídicos de ADN que se replicam de forma autónoma e que contêm ADN que codifica os produtos mencionados supra e os seus análogos e ainda células hospedeiras que são transformadas ou transfectadas estavelmente com esse ADN de uma forma suficiente para permitir a sua expressão. As células hospedeiras transformadas ou transfectadas de acordo com a presente invenção têm uma utilidade manifesta em métodos para a produção, em grande escala, de produtos da presente invenção que contêm a proteína BIPr.

A presente invenção contempla também produtos análogos da proteína BIPr, sob a forma de proteínas de fusão que compreendem, no terminal amino, os produtos análogos da proteína BIPr da presente invenção e que compreendem, no terminal carboxi, uma região constante de uma cadeia pesada da imunoglobulina ou uma sua variante alelica. As proteínas de fusão de tipo imunoglobulina/BIP de sequência natural vêm explicadas no pedido de patente de invenção norte-americana co-pendente, de que os requerentes são co-proprietários, com o número de série 08/064.693, publicada como sendo a patente de invenção WO 13123434, da autoria de Theofan, et al. A presente invenção contempla também métodos para a produção das proteínas de fusão mencionadas antes.

Também fazem parte do âmbito da presente invenção as sequências de ADN que codificam produtos de fragmentos de proteínas BIPr, biologicamente activos que possuem entre

cerca de 176 e cerca de 198 dos aminoácidos 13 terminal N da BIPr. Estes ADNs permitem a produção de produtos de BIP em células hospedeiras eucarióticas, tais como as células de CHO, possuindo tais produtos uma menor heterogeneidade em termos dos resíduos presentes no terminal carboxi. Preferem-se actualmente os ADNs que codificam 193 resíduos do terminal N da BIP (por exemplo, os ADNs que codificam a sequência líder de trinta e um aminoácidos da BIP, os 193 aminoácidos iniciais do terminal N e um ou mais códiões de paragem). Mais preferidos são os ADN que também codificam proteínas em que o resíduo de cisteína na posição 172 ou 135 está substituído (por exemplo, BIPr(1-193)ala¹³²)

De acordo com um outro aspecto, a presente invenção tem por objecto proteínas bactericidas que aumentam a permeabilidade de SEQ ID N° 2 em que o resíduo de aminoácido na posição 185 é seleccionado entre lisina ou ácido glutâmico ou um seu fragmento, com uma actividade bactericida e que aumenta a permeabilidade, em que um resíduo de cisteína na posição 132 está substituído por um aminoácido diferente.

De acordo com um outro aspecto da presente invenção, proporciona-se uma composição farmacêutica que contém uma proteína bactericida que aumenta a permeabilidade ou um seu fragmento com uma actividade bactericida que aumenta a permeabilidade, em que um resíduo de cisteína na posição 132 está substituído por um aminoácido diferente e um diluente, adjuvante ou veículo aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico, em que a composição farmacêutica é para ser utilizada no tratamento de infecções bacterianas ;~am-negativas e as suas sequelas, incluindo o choque relacionado com a endotoxina e uma ou mais condições associadas, incluindo coagulação intravascular disseminada,

anemia, trombocitopénia, leucopénia, síndrome do sofrimento respiratório do adulto, insuficiência renal, hipotensão, febre e acidose metabólica.

De acordo com um outro aspecto da presente invenção, providencia-se uma composição farmacêutica que compreende uma proteína de fusão híbrida e um diluente, adjuvante ou veículo aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico, em que a proteína de fusão híbrida compreende, no seu terminal amino, uma proteína bactericida que aumenta a permeabilidade ou um seu fragmento com uma actividade bactericida que aumenta a permeabilidade, em que um resíduo de cisteína na posição 132 está substituído por um aminoácido diferente e, no seu terminal carboxi, pelo menos um domínio constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina ou uma sua variante alélica, em que a composição farmacêutica se destina a ser usada no tratamento de infecções bacterianas gram-negativas e as suas sequelas, incluindo o choque relacionado com a endotoxina e uma ou mais condições associadas, incluindo coagulação intravascular disseminada, anemia, trombocitopénia, leucopénia, síndrome do sofrimento respiratório do adulto, insuficiência renal, hipotensão, febre e acidose metabólica.

De acordo com um outro aspecto da presente invenção, proporciona-se um ADN que codifica uma proteína bactericida que aumenta a permeabilidade de SEQ ID N° 2 em que o resíduo de aminoácido na posição 185 é seleccionado entre lisina ou ácido glutâmico ou um seu fragmento, com uma actividade bactericida e que aumenta a permeabilidade, em que um resíduo de cisteína na posição 132 está substituído por um aminoácido diferente.

De acordo com um outro aspecto da presente invenção, proporciona-se um ADN que codifica uma proteínas bactericidas que aumentam a permeabilidade de SEQ ID N° 2 ou um seu fragmento, com uma actividade bactericida e que aumenta a permeabilidade, em que um resíduo de cisteína na posição 132 está substituído por um aminoácido diferente e em que o codão para o resíduo de valina na posição 151 se selecciona entre CTC ou CTC.

Se acordo com um outro aspecto da presente invenção, proporciona-se um ADN que codifica a sequência líder do aminoácido 31 e os primeiros 193 resíduos de terminal N de uma proteína bactericida que aumenta a permeabilidade, em que um resíduo de cisteína na posição 132 esta substituído por um aminoácido diferente e em que o ADN tem um codão de paragem Imediatamente a seguir ao codão para o resíduo de leucina na posição 193 e em que a sequência que codifica os quatro primeiros aminoácidos dos 31 aminoácidos da sequência líder foi eliminada.

De acordo com um outro aspecto da presente invenção, proporciona-se um ACN que codifica a sequência líder do aminoácido 31 e os primeiros 199 resíduos de terminal N de uma proteína bactericida que aumenta a permeabilidade, em que um resíduo de cisteína na posição 132 está substituído por um aminoácido diferente e em que o ADN tem um codão de paragem imediatamente a seguir ao codão para o resíduo de leucina na posição 199 e em que a sequência que codifica os quatro primeiros aminoácidos dos 31 aminoácidos da sequência líder foi eliminada.

De acordo com um outro aspecto da presente invenção, proporciona-se um vector de ADN que replica autonomamente compreendendo um ADN que codifica uma proteína bactericida

que aumenta ou um seu fragmento, com umã actividade bactericida e que aumenta a permeabilidade, em que um resíduo de cisteína na posição 132 está substituído por um aminoácido diferente, em que o vector compreende ainda um gene marcador selectivo.

De acordo com um outro aspecto da presente invenção, proporciona-se uma célula hospedeira de OHC transformada ou transfectada de forma estável com um ADN que codifica uma proteína bactericida que aumenta ou um seu fragmento com uma actividade bactericida que aumenta a permeabilidade, em que um resíduo de cisteína na posição 132 está substituído por um aminoácido diferente, de uma forma que permite a expressão na referida célula hospedeira do referido polipéptido.

De acordo com um outro aspecto da presente invenção, proporciona-se uma célula de insecto, transformada ou transfectada de forma estável com um ADN que codifica uma proteína bactericida que aumenta a permeabilidade ou um seu fragmento com uma actividade bactericida que aumenta a permeabilidade, em que um resíduo de cisteína na posição 132 está substituído por um aminoácido diferente, de uma forma que permite a expressão na referida célula hospedeira do referido polipéptido.

De acordo com um outro aspecto da presente invenção, proporciona-se uma proteína bactericida que aumenta e permeabilidade ou um seu fragmento com uma actividade bactericida que aumenta a permeabilidade, em que um resíduo de cisteína na posição 135 está substituído por um aminoácido diferente.

De acordo com um outro aspecto da presente invenção, proporciona-se um ADN que codifica uma proteína bactericida que aumenta a permeabilidade o um seu fragmento com uma actividade bactericida que aumenta a permeabilidade, em que um residuo de cisteína na posição 135 está substituído por um aminoácido diferente.

Finalmente, a presente invenção também tem por objecto composições farmacêuticas estáveis compreendendo o produto de proteína BIPr da presente invenção no seio de diluentes, adjuvantes e veículos aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico. Essas composições farmacêuticas são resistentes à formação de partículas de produtos de BIPr. Essas composições são úteis no tratamento de infecções bacterianas gram-negativas e das suas sequelas, incluindo o choque relacionado com a endotoxina e uma ou mais condições associadas, incluindo coagulação intravascular disseminada, anemia, trombocitopénia, leucopénia, síndrome do sofrimento respiratório do adulto, insuficiência renal, hipotensão, febre e acidose metabólica.

Há muitos outros aspectos e vantagens da presente invenção que se tornarão evidentes para os especialistas na matéria tomando em consideração a memória descritiva pormenorizada subsequente, respeitante as suas variantes presentemente preferidas.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

A figura 1 traduz os resultados da análise dos produtos de BIPr(1-199) por EGPA-DSS (o mesmo que SDS-PAGE).

A figura 2 ilustra os resultados da análise de produtos de BIPr(1-193) e de BIPr(1-199)ala¹⁵² efectuada por ESEA-DOS.

A figura 3 mostra os resultados da análise de produtos de BIPr (1-199) efectuada por CLER de permuta catiónica.

A figura 4 mostra os resultados da análise de produtos de BIPr(1-199)ala¹⁵² efectuada por E de permuta catiónica.

A figura 5 mostra os resultados obtidos por CLER de fase inversa numa experiência efectuada com produtos de BIPr(1-199).

A figura 6 mostra os resultados obtidos por CLER de fase inversa numa experiência efectuada com produtos de BIPr(1-199)ala¹⁵²

A figura 7 mostra os resultados de estudos de turbidez efectuados em composições farmacêuticas que contêm produtos de BIPr e que podem conter ou não ingredientes tensioactivos de tipo poloxâmero/polissorbato a pH 7,0 e a 57°C.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A descrição detalhada subsequente incide sobre o fabrico e as propriedades de diversas preparações de produtos de BIPr que compreendem uma substituição de um aminoácido num resíduo de cisteína e/ou terminais carboxi múltiplos uniformes. Dito de forma mais específica, o exemplo 1 descreve um método exemplificativo segundo o qual as proteínas bacterianas que aumentam a permeabilidade

básicas são introduzidas na sequência nucleotídica que codifica um fragmento exemplar do terminal N da proteína BIP e descreve também a incorporação de tais sequências que sofreram mutação dentro dos vectores plasmídicos. O exemplo 2 tem por objecto a incorporação de vectores do exemplo 1 em células hospedeiras adequadas e descreve ainda a expressão de produtos polipeptídicos de proteínas 31P recombinantes de acordo com a presente invenção. O exemplo 3 descreve a Construção dos ADNs que codificam os produtos análogos de substituição do resíduo de cisteína, de acordo com a presente invenção e a sua utilização com procedimentos de transcrição/tradução *in vitro*. O exemplo 4 diz respeito as propriedades do polipéptidos de produtos de BIPr incluindo polipeptidos de produtos de BIPr da presente invenção.

EXEMPLO 1

Construção de vectores que contêm os análogos de BEP por substituição da cisteína

A. Construção dos plasmidos pING4519 e pING4520

Utilizou-se o vector de expressão pING4503 como uma fonte de ADN que codifica um produto de expressão recombinante designado por BIPr(1-199), isto é, que codifica um polipéptido que possui a sequência de sinal de 31 resíduos e os primeiros 199 aminoácidos do terminal N da BIP humana perfeitamente desenvolvida, conforme é explicitado nas SEQ ID NOS 1 e 2, com a excepção de a valina de posição 151 ser especificada por GTC em vez de GTC e o resíduo 188 ser o ácido glutâmico (especificado por GAG) em vez de lisina (especificado por AAG).

O plasmídeo pING4503 está descrito no pedido de patente de invenção norte-americana cs-pendente, de que os requerentes são co-proprietários, com o número de série 08/064 693, publicado como sendo o documento da patente de invenção WO 93/23434, da autoria de Theofan et al. Dito de forma abreviada, a construção do plasmídeo pING4503 baseia-se no plasmídeo pING2237N e contém o elemento intensificador da cadeia pesada 3.a imunoglobulina do murganho, o elemento LTR intensificador-promotor retirado do ADN do vírus da leucemia dos murinos de Abelson (A-MuLv), a junção da união 19S/16S do SV40 na extremidade 5' do gene que se pretende exprimir e o local de poliadenilação γ -1 genómico humano na extremidade 3' do gene que se pretende exprimir. O plasmídeo pING2237N possui também um marcador seleccionável di-hidrofolato-redutase de murganho (DHFR). O ADN que codifica a BIPr (1-199), incluindo 30 pb da região natural não traduzida em 5' e as bases que codificam a sequência de sinal de 31 aminoácidos e também os 199 aminoácidos do terminal N da BIP, e inserido entre os locais de restrição exclusivos *SalI* e *SstII* no pING4503.

Foram construídos dois vectores, designadamente o pING4519 e o pING4520, com base no pING4503, para a expressão de análogos por substituição da cisteína da BIPr(1-199) em que um dos três resíduos de cisteína que ocorrem naturalmente, pertencentes a BIP, foi substituído com outro aminoácido. Para a construção destes arquétipos foi utilizado um local *PvuII* (CAGCTG) que ocorre apenas uma vez no ADN que codifica a BIPr(1-199) e que está localizado entre a cisteína 132 e a cisteína 135. Uma vez que além deste há outros locais *PvuII* no pING4503, foi necessário isolar em primeiro lugar o fragmento de *SalI*-*SstII* que contém o segmento intercalar que codifica a BIPr(1-199)

proveniente de pING4503, por digestão com *Sall* e *SstII*. O segmento intercalar purificado de BIPr(1-199) *Sall*-*SstII* foi depois digerido com *PvuII*, daí resultando um fragmento de *Sall*-*PvuII* que possui aproximadamente 529 pb e um fragmento de *PvuII*-*SstII* que possui aproximadamente 209 pb, tendo cada um deles sido purificado separadamente.

O plasmídeo pING4519 é idêntico ao plasmídeo pING4503, com a exceção de o pING4519 conter um segmento intercalar de ADN que codifica uma BIPr(1-199) em que o códon que especifica a cisteína natural na posição 132 é substituído pelo códon para a alanina. Conforme se disse antes, o produto recombinante resultante da expressão da célula hospedeira e da transformação secretória de tal segmento intercalar recebe a designação de "BIPr(1-199)ala¹³". Para se gerar o pING4519, as sequências de ADN da EIP foram amplificadas por RCP a partir do pING4503, utilizando os iniciadores BIP-6: AAGCTTGTCGACCAGGCCITGAGGT (SEQ ID N° 3), que incorporou um local de restrição *Sall* na extremidade 5' da região não traduzida da BIP de 30 pb e o BIP-14: CIGGAGGCGGTGATGGTG (SEQ ID N° 4), que incorporou metade do local *PvuII* e as substituições de bases necessárias para codificar a alanina na posição 132. A amplificação por RCP foi realizada utilizando o kit de RCP GeneAmp (Ferkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) em conformidade com as instruções do fabricante. O fragmento de RCP resultante foi digerido com *Sall*, daí resultando um fragmento de *Sall* com aproximadamente 529 pb com extremidades a condizer, que foi depois utilizado numa ligação de três peças, conjuntamente com o fragmento *PvuII*-*SstII* com aproximadamente 209 pb descrito supra e com o fragmento grande resultante da digestão do pING4503 com *Sall* e *SstII*, para gerar o pING4519.

O plasmídeo pING4520 é idêntico ao pING4510, com a excepção de o pING4520 conter um segmento intercalar de ABN que codifica um análogo de BIPr(1-199) em que o codão que especifica a cisteína natural na posição 135 é substituído por um codão da serina. Conforme se disse antes, o produto recombinante que resulta da expressão da célula hospedeira de tal segmento intercalar recebe a designação de "BIPr(1-199)ser¹³⁵". Para se gerar o pING4530, efectuou-se a amplificação das sequência da ADN da BIP por RCL a partir do pING4513 que é um plasmídeo essencialmente idêntico ao pING4503, com a excepção de o marcador seleccionável sei c *gpt* em vez de DHFR e de o segmento intercalar de ADN codificar a sequência de sinal e a BIP de comprimento completo (456 resíduos) em vez de codificar apenas a parte da BIPr(1-199).

A amplificação por RCP foi realizada utilizando o iniciador BIL-15: CTCCAGCAGCCACATCAAC (SEQ ID N° 5), em que a extremidade 5' incorpora metade de um local *PvuII* que sofreu mutação (em que "CTG" é trocado por "CTC") e as substituições de bases necessárias para codificar a serina na posição 135; e o iniciador BIF-7: GAACTTG GTTGT CAGTCG (SEQ ID N° 6) que representa as sequências que codificam a BIPr, localizadas a jusante da região que codifica o resíduo 199 da EIP. Este fragmento resultante da RCP foi digerido com *BstBI*, que corta a jusante do local da mutagenese da cisteína 135, tendo o fragmento *BstBI*, com aproximadamente 100 pb de extremidades abruptas, sido purificado em gel. Realizou-se então uma ligação de três peças com o fragmento de restrição *Sall*-*PvuII* de 529 pb da BIP, descrito supra, com o fragmento *BstBI* de 100 pb de extremidades abruptas e com um fragmento grande resultante da digestão de pING4503 com *BstBI*-*Sall*, para gerar o pING4520.

B. Construção do plasmídeo pING4530

Construiu-se um outro vector, c pING4530, que continha a substituição da cisteína por alanina, tal como no pING4519, mas que continha o marcador seleccionável gpt (que confere resistência ao ácido micofenólico) em vez do marcador DHFR, partindo do pING4503 para chegar ao pING4519. Para se construir o pING4530 isolou-se um fragmento de restrição *Sall*-*DraIII* de 1629 pb a partir do pING4519. Este fragmento continha a totalidade da região codificadora de BIPr(1-199)ala¹³² e também mais uma sequência vectorial com aproximadamente 895 pb na extremidade 3' da região de codificação. Ligou-se este fragmento ao fragmento vectorial grande *DraIII*-*Sall* (com aproximadamente 7230 pb) isolado a partir do pING4513 para gerar o pING4530.

C. Construção do plasmídeo pING4533

Construiu-se o plasmídeo pING4533 para a expressão de BIPr(1-199)ala¹³², em que o codão que especifica o quinto aminoácido da sequência do sinal da BIP, a metionina (ATG), na posição -27 foi substituído no contexto da sequência de consenso de Kozak de início da tradução GCCACCRCTGG (SEQ ID N° 7) [Kozak, *Nucl. Acid Res.*, 15: 8125 (1987)] e em que a sequência de ADN que codifica os primeiros quatro aminoácidos do sinal da BIP foi removida. Isto foi realizado amplificando por RCP as sequências da BIP e partir de um plasmídeo que continha a ADNc da BIP humana de comprimento completo [em pGEM-7zf(+)], utilizando para RCP o iniciador BIP-23: ACTGTTCAGAGGCCACCAATGCGCCAGGGGC (SEQ ID N° 8), que incorpora o local de restrição *Sall* e os nucleótidos GCCACC em frente de ATG na posição -27 do sinal da BIP, e o iniciador BIP-2:

CCGCGGCTCGACATATATTTTGGTCAT (seq ID N° 9), correspondente à extremidade 3' da sequência de codificação da BIPr(1-199).

O ADN amplificado por RCP, com aproximadamente 700 pb, foi digerido com *SalI* e *EcoRI* e depois purificou-se o fragmento resultante, de 270 pb, incluindo aproximadamente o primeiro terço da sequência de codificação da BIP(1-199). Ligou-se este fragmento de *SalI*-*EcoRI* a outros dois fragmentos: (1) um fragmento de *EcoRI*-*SstII* de 420 pb obtido a partir de pING4519, que codifica a parte restante da BIP(1-199); em que a alanina substitui a cisteína na posição 132 e (2) um fragmento vectorial de *SstII*-*SalI* aproximadamente com 8000 pb obtido a partir de pING4502 (um vector essencialmente semelhante ao pING4503, com a exceção de não conter a sequência de 30 pb não traduzida em 5' e de possuir um marcador *gpt* em vez do marcador DHFR), para gerar o pING4533 que contém um marcador *gpt*.

D. Construção dos plasmídeos pING4221, pING4222 e pING4223

Foram construídos vectores semelhantes ao pING4533 possuindo um segmento intercalar que continha o local de Kozak optimizado de inicio da tradução correspondente ao resíduo de metionilo -27 da sequência de sinal e com uma substituição da cisteína por alanina na posição 132. No entanto, nestes arquétipos assim construídos, a sequência codificadora do fragmento da BIP terminava no resíduo 193. Conforme se disse antes, o produto recombinante que resulta da expressão deste ADN da célula hospedeira recebe a designação de "BIPr(1-199)ala¹³²". Os vectores que continham os segmentos intercalares foram obtidos fazendo digerir em primeiro lugar o pING4533 com *SalI*, que realiza o corte na extremidade 5' do segmento intercalar de ADN da BIP e com *AluNI*, que deixa ficar um apêndice de 3 pb em 3' no resíduo

192. A seguir codificou-se o fragmento resultante que possui aproximadamente 700 pb. Ligou-se novamente este fragmento dentro do fragmento grande resultante da digestão do pING4533 com *Sst*II-*Sal*I, conjuntamente com dois oligonucleótidos complementares recombinados, designadamente o BIP-30: CTGTAGCTCGAGCCCG (SEQ ID NO 10) e o BIP-31: GGCTCGAGCTACAGAGT (SEQ ID NO 11). Isto substituiu a região entre os locais *Alu*NI e *Sst*II com o codão para o resíduo 193 (leucina), um codão de parada e um local de restrição *Xho*I de 5' para o local *Sst*II, daí resultando a regeneração dos dois locais *Alu*NI e *Sst*I e a colocação do codão de parada, TAG, imediatamente a seguir ao codão (CTG) para o aminoácido 193 (leucina). O plasmídeo resultante recebeu a designação de pING4223 e tinha um marcador *gpt*. Foram produzidos arquétipos exactamente conforme descrito para o caso do pING4223, com a excepção de se ter utilizado fragmentos vectoriais *Sst*II-*sal*I diferentes para gerar vectores com diferentes marcadores de selecção. Por exemplo, o pING4221 é idêntico ao pING4223, com a excepção de conter o marcador *his* (que confere resistência ao histidinol) em vez do marcador *gpt* e o pING4222 é idêntico ao pING4223, com a excepção de conter um marcador DHFR em vez do marcador *gpt*.

E. Construção dos plasmídeos pING4537, pING4143, pING4146, pING4150 e pING4154

Construiu-se um conjunto de vectores que continham um segmento intercalaz que codifica a BIP(1-193)ala¹⁹³ o local de Kozak optimizado de início da tradução e diferentes marcadores de selecção essencialmente idênticos aos descritos a propósito dos plasmídeos pING4221, pING4222 e pING4223, com a excepção da a região de transcrição e de poliadenilação da cadeia pesada γ -1 humana na

extremidade 3' do local *Sst*II ter sido substituída por uma sequência de poliadenilação da cadeia leve humana seguida pelas sequências de terminação da transcrição genômica da cadeia leve (k) do murganho. Em estudos colaterais de expressão dos genes, concluiu-se que a região de terminação da transcrição e o sinal de poliadenilação da cadeia leve eram aparentemente responsáveis por aumentos de 2,5 a 5 vezes nos níveis de expressão da BIP em células Sp2/O e OHC-K1 (em inglês CHO-K1).

Os vectores anteriormente referidos foram construídos preparando em primeiro lugar o plasmídeo pING4537 que é um vector semelhante ao pING4533 que contém o segmento intercalar da BIPr(1-199)ala¹³⁹. No entanto, o pING4537 contém as sequências de poliadenilação da cadeia leve humana em vez da sequência da cadeia pesada humana. As sequências k do murganho na extremidade 3' foram obtidas a partir do pING3170 que é um vector de expressão que codifica um ADNc da cadeia leve humana e contém uma sequência de terminação da transcrição em 3' da cadeia leve genômica do murganho. Isto foi conseguido fazendo a digestão com *Sst*I que efectua o corte 35 pb a montante do codão de paragem da cadeia leve do murganho, realizando o tratamento com polimerase ao ADN das T4 para pôr as extremidades abruptas e cortando depois com *Bam*HI e purificando um fragmento de aproximadamente 1350 pb que contém as sequências k de 3' do murganho. O fragmento resultante é constituído aproximadamente por 250 pb da parte de 3' do ADNc da i constante da cadeia leve humana e pelo sinal de poliadenilação seguido por um ligador *Bam*HI, conforme descrito a propósito do arquerio designado por 28 na obra de Lai et al., *J. Immunol* 139: 3044 (1987). A parte restante do fragmento, que possui aproximadamente 1350 pb, é constituída por um fragmento

genômico *BglIII-BamHI* da cadeia k de 3' do surgenho [fragmento "D" de Xu et al., *J. Biol. Chem.* 261: 3838, (1986)] que fornece as sequências de terminação da transcrição. Este fragmento foi utilizado numa ligação de três peças com dois fragmentos provenientes de pING4533: um fragmento de 3044 pb que contém todo o segmento intercalar da BIP e uma parte do vector obtido por digestão com *SacII*; tratamento com a polimerase das 14 e digestão com *NotI* (que compreende a totalidade do segmento intercalar da BIP e uma parte do vector) e um fragmento de *BamHI-NotI* que possui aproximadamente 4574 pb. O vector resultante, o pING4537, é idêntico ao pING4533, com a exceção das diferenças anteriormente assinaladas na região genômica não traduzida em 3'.

Foram construídos outros vectores contendo as sequências não traduzidas da cadeia k em 3', utilizando o plasmídeo pING4537 como fonte do fragmento k em 3'. As sequências não traduzidas da cadeia k em 3' foram isoladas por digestão do pING4537 com *XhoI* (um local único que ocorre imediatamente a seguir ao codão de paragem da BIP) e com *BamHI*. O fragmento de *XhoI-BamHI* resultante, possuindo aproximadamente 1360 pb, foi utilizado um conjunto de ligações de três peças para gerar os quatros vectores a seguir indicados, possuindo todos eles segmentos intercalares que codificam a BIPr(1-193)ala¹⁰⁰ e que possuem o local de Kozak optimizado de início de tradução no resíduo -27 do sinal: (1) o pING4143 (marcador gpt), obtido mediante a ligação de um fragmento *BamHI-NotI* de 4574 pb do pING4223 (marcador gpt), um fragmento que contém o segmento intercalar da BIP *NotI XhoI* do pING4223 que possui aproximadamente 3019 pb e o fragmento *XhoI-BamHI* do pING4537; (2) o pING4146 (marcador DHFR), obtido mediante a ligação de um fragmento *BamHI-NotI* do pING4223 que possui

aproximadamente 4159 pb (marcador DHER), um fragmento que contém o segmento intercalar de BIP NotI XhoI do pING4223 que possui aproximadamente 3919 pb e o fragmento XhoI-BamHI do pING4537; (3) o pING4150 (marcador *his*), obtido mediante a ligação de um fragmento de BamHI-NotI que possui aproximadamente 4772 pb que contém o marcador *his* do pING4221, um fragmento que contém o segmento intercalar de BIP NotI XhoI do pING4222 e o fragmento a XhoI-BamHI do pING4537; e (4) o pING4154 (marcador *neo*), obtido mediante a ligação de um fragmento de BamHI-BsaI que possui aproximadamente 4042 pb que contém o marcador *neo* do pING3174, um fragmento que possui aproximadamente 3883 pb que contém o segmento intercalar de BIP BsaI XhoI do pING4221 e o fragmento XhoI-BamHI do pING4537. O plasmídeo pING3174 contém um segmento intercalar que codifica o ADN da cadeia pesada de anticorpos e possui um marcador *neo*, o gene *neo* e as suas sequências de flanking foram obtidos a partir do plasmídeo pSv2 *neo* divulgado por Southern *et al.*, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1: 327 (1982).

Construção dos plasmídeos pING4144 e pING4151

Foram construídos dois plasmídeos, pING4144 e pING4151, que são idênticos respectivamente aos plasmídeos pING4143 e pING4150, com a exceção de as sequências de codificação da BIPr estarem sob o controle do intensificador cuja expressão é imediata e ocorre em primeiro lugar do citomegalovírus humano (CMVh) em vez do promotor LTR do vírus de Abelson da leucemia dos murinos (A-MuLV). Assim sendo, qualquer dos plasmídeos pING4144 e pING4151 possui a mutação da cisteína na posição 132 por ~~leucina~~ com a alanina, a sequência de Kozak otimizada de início da tradução e a região de terminação genômica do ~~cadeia~~ k do ~~argenino/apêndice~~ poli-A da cadeia leve humana. A região

entre os nucleótidos 879 e 1708 dos vectores originais (pING4143 e pING4150) foi substituída por uma região do intensificador/ promotor do CMVh, correspondente aos nucleótidos desde -598 até +174, conforme ilustrado na figura 3 da obra de Boshart et al., Cell 41: 521 (1983). Para se introduzir a região do promotor do CMVh nos vectores de expressãz da BIP, construiu-se em primeiro lugar o plasmido pING4538 substituindo o fragmento de pING4222, aproximadamente com 1117 pb, que contém o promotor *EcoRI-SalI/IA-MuLv*, por um fragmento obtido a partir do plasmido pING2250, que possui aproximadamente 1054 pb, que contém o promotor *EcoRI-SalI/CMVh*, o qual possui o promotor de CMVh que comanda a expressão de um segmento intercalar da cadeia leve de um anticorpo. Para se construir o plasmido pING4144 foram ligados conjuntamente três fragmentos: (1) o fragmento *NotI-XhoI*, obtido a partir do plasmido pING4538, que contém a BIPr(1-193), que possui aproximadamente 2955 pb; (2) o fragmento *XhoI-BamHI*, obtido a partir do plasmido pING4537, que possui aproximadamente 1360 pb; e (3) o fragmento de *BamHI -NotI* que possui aproximadamente 4770 pb e que contém o gene *his* do plasmido pING4221.

G. Construção aos plasmidos pING4145, pING4148 e pING4152

Foram construídos também os plasmidos pING4145, pING4148 e pING4152 respectivamente idênticos aos plasmidos pING4143, pING4146 e pING4150, com a excepção de conterem um resíduo de cisteína de tipo natural ('sequência natural) na posição 132, em vez de uma substituição de alanina. Assim, os três possuíam um segmento intercalar de BIPr(1-193); a sequência de Rozak optimizada de início da tradução e a região de terminação da transcrição genómica da cadeia k de murganho/apêndice de polI-A da cadeia leve humana. Os

três plasmídeos foram construídos conforme a seguir se descreve. Para se construir o plasmídeo pING4145 foram ligados conjuntamente três fragmentos: (1) o fragmento que contém a BIP(1-193) *NotI*-*XhoI* que possui aproximadamente 3000 pb, obtido a partir do plasmídeo pING4140 (o plasmídeo pING4140 é idêntico ao plasmídeo pING4221, com a exceção de conter a cisteína de tipo natural na posição 132); (2) o fragmento *XhoI*-*BamHI* que possui aproximadamente 1360 pb, obtido a partir do plasmídeo pING4537; e (3) o fragmento *BamHI*-*NotI* que possui aproximadamente 4570 pb e que contém o gene *gpt*, obtido a partir do plasmídeo pING4223. Para se construir o plasmídeo pING4148 foram ligados conjuntamente três fragmentos: (1) o fragmento *NotI*-*XhoI* obtido a partir do plasmídeo pING4140; (2) o fragmento de *XhoI*-*BamHI* obtido a partir do plasmídeo pING4537; e (3) o fragmento *BamHI*-*NotI* que possui aproximadamente 4150 pb e que contém o gene DHFR, obtido a partir do plasmídeo pING4222. Para se construir o plasmídeo pING4152 foram ligados conjuntamente três fragmentos: (1) o fragmento *NotI*-*XhoI* que possui aproximadamente 3000 pb, obtido a partir do plasmídeo pING4142 (o plasmídeo pING4142 é idêntico ao plasmídeo pING4223, com a exceção de conter a cisteína de tipo natural na posição 132); (2) o fragmento *XhoI*-*BamHI* obtido a partir do plasmídeo pING4537; e (3) o fragmento *BamHI*-*NotI* que possui aproximadamente 4770 pb e que contém o gene *his*, obtido a partir do plasmídeo pING4221.

C quadro I subsequente agrupa, de forma abreviada, o conteúdo dos plasmídeos cuja preparação foi descrita nas seções A a G anteriores.

QUADRO I

Clonagem	Produto de BIP	Seq. de sinal	Restrição	Terminal 3'	Proteína
pING4113	1-198; Ala ¹⁹⁸	11AA	DHFR*	Apêndice poli-A da cadeia pesada γ-1 genômica humana	AMuLv
pING4130	1-188 Ser ¹⁸⁸	11AA	DHFR*	Apêndice poli-A da cadeia pesada γ-1 genômica humana	AMuLv
pING4133	1-199 Ala	31AA	gpt	Apêndice poli-A da cadeia pesada γ-1 genômica humana	AMuLv
pING4133	1-188; Ala ¹⁸⁸	Seq de iniciação de Kozak; sinal de 27AA	gpt	Apêndice poli-A da cadeia pesada γ-1 genômica humana	AMuLv
pING4223	11-181; Ala ¹⁸¹	Seq de iniciação de Kozak; sinal de 27AA	gpt	Apêndice poli-A da cadeia pesada γ-1 genômica humana	AMuLv
pING4221	11-183; Ala ¹⁸³	Seq de iniciação de Kozak; sinal de 27AA	his	Apêndice poli-A da cadeia pesada γ-1 genômica humana	AMuLv
pING4221	11-193; Ala ¹⁹³	Seq de iniciação de Kozak; sinal de 27AA	DHFR	Apêndice poli-A da cadeia pesada γ-1 genômica humana	AMuLv
pING4137	11-188; Ala ¹⁸⁸	Seq de iniciação de Kozak; sinal de 27AA	gpt	Terminação da transcrição da cadeia k do murganho/apêndice poli-A da cadeia k humana	AMuLv
pING4141	11-181; Ala ¹⁸¹	Seq de iniciação de Kozak; sinal de 27AA	gpt	Terminação da transcrição da cadeia k do murganho/apêndice poli-A da cadeia k humana	AMuLv
pING4143	11-188; Ala ¹⁸⁸	Seq de iniciação de Kozak; sinal de 27AA	DHFR	Terminação da transcrição da cadeia k do murganho/apêndice poli-A da cadeia k humana	AMuLv
pING4133	11-183; Ala ¹⁸³	Seq de iniciação de Kozak; sinal de 27AA	his	Terminação da transcrição da cadeia k do murganho/apêndice poli-A da cadeia k humana	AMuLv
pING4144	11-181; Ala ¹⁸¹	Seq de iniciação de Kozak; sinal de 27AA	Gpt	Terminação da transcrição da cadeia k do murganho/apêndice poli-A da cadeia k humana	AMuLv
pING4141	11-188; Ala ¹⁸⁸	Seq de iniciação de Kozak; sinal de 27AA	gpt	Terminação da transcrição da cadeia k do murganho/apêndice poli-A da cadeia k humana	AMuLv

		de 27AA		cadeia k humana	
plasmídeo	1-193	Seq de iniciação de Kozak; sinal de 27AA	DHFR	Terminação da transcrição da cadeia k do murganho/apêncide polx-A da cadeia k humana	AMuLv
plasmídeo	1-197;	Seq de iniciação i- Kozak; sinal de 27AA	his	Terminação da transcrição da cadeia k do murganho/apêncide poli-A da cadeia k humana	AMuLv
plasmídeo	(1- 193)dx TM	Seq de iniciação de Kozak; sinal de 27AA	his	Terminação da transcrção da cadeia k do murganho/apêncide poli-A da cadera k humana	AMuLv
plasmídeo	1- 193)dx TM	Seq se iniciação de Kozak; sinal de 27AA	neo	Terminação da transcrição da cadeia k do murganho/apêncide poli-A da cadeia k humana	AMuLv
* Um gene DHFR alterado conforme descrito no pedido de patente de invenção norte-americana co-pendente, de que os requerentes são co-proprietários, com o número de série 08/064 693, publicada como sendo a patente de invenção WO 93/23434.					

EXEMPLO 2

Transfecção de Células para Expressão dos Análogos de BIPr por Substituição da Cisteína

Os melhores hospedeiros para a produção dos análogos da proteína BIPr de acordo com a presente invenção são as células de mamíferos, uma vez que permitem uma secreção conveniente, a reconstituição e a modificação pós-traducional das proteínas expressas. As células hospedeiras actualmente preferidas, provenientes de mamíferos, para a produção de análogos da invenção são as células de fibroblastos e de origem linfóide, tais como: células K1 de CHO (o mesmo que CHO-K1) (ATCC CCL61); as células DG44 de CHO (o mesmo que CHO-DG44), que são células de CHO de um mutante de Toronto com insuficiência de di-hidrofolato

reductase [DHFR], forecido pelo Dr. Lawrence Chasin da Universidade de Columbia; células DXB-11 de OHC (o mesmo que CHO-DXB-11), que são células K1 de OHC de um mutante com insuficiência em DHFR, forecido pelo Dr. Lawrence Chasin; células Vero (ATCC CRL81); células de rim de hamster chinês bebé (RCE, o mesmo que BHK) (ATCC CCL10); células do híbrido Sp210-Ag14 (ATCC CRL1581) e células do mieloma NSO (ECACC n° 85110503).

A transfeccão das células de mamíferos pode ser efectuada segundo vários métodos. Um processo vulgar cconsiste em recorrer a precipitação, com fosfato de cálcio, do ADN do vector de expressão, o qual é depois incorporado pelas células hospedeiras. Outro processo também vulgar é a electroporação que faz com que as células incorporem ADN através dos poros das membranas, criados graças à geração de um forte campo eléctrico [(Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Laboratory Harbor Press, 16.30-16.3 1 (1989)1. A selecção das células transfectadas é facilitada incorporando no vector de expressão um gene cujo proauto peimita a sobrevivência e o crescimento das células transfectaaas em condições selectivas. Foram já identificados diversos genes desses. Entre outros, é possível referir os seguintes: (1) *neo*, que é um gene procariótico que codifica a resistência ao antibiótico aminoglicosídico G418; (2) *gpt*, que é a guanina-fosforibosil-transferase de *E. coli*, que codifica a resistência ao ácido micofenólico (AMF) na presença de xantina [Mulligan *et .* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 78: 2072-2076 (1981,)], (3) di-hidrofolato-redutase (DHFR), que permite c crescimento de células DHFR na ausência de nucleósidos e a amplificação génica na presença de concentrações cada vez maiores de metotrexato; (4) o gene *hisB* de *Salmonella typhimurium* que permite o crescimento na

presença de histidinol [Hartman et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85: 8047-8051, 1988] (5) o gene *trpB* de *E. coli* [Hartman et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. EUA*, 85: 8047-8051, (1988)] que permite o crescimento na presença de indol (sem triptofano); e (6) o gene da glutamina-sintetase, que permite o crescimento em meios em que falta glutamina. A disponibilidade destes marcadores selectivos, por si sós ou em combinações diversos, confere flexibilidade a geração de linhagens de células de mamíferos que exprimem produtos recombinantes em quantidades elevadas.

A. Transfecção das células K1 de OHC (CHO-K1) com o pING4533

O plasmido pING4533 contém sequências génicas que codificam a BIPr(1-199)ala¹³² fundida com o promotor A-MuLv, a sequência de Kozak optimizada de início da tradução, a região não traduzida em 3' da cadeia pesada γ -1 humana e o marcador *gpt* para selecção de células resistentes ao AMP.

A linhagem de células K1 de OHC é mantida em meio F12 de Ham com mais 10% de soro fetal de bovino (SFB) enriquecido com glutamina/penicilina/estreptomicina (Irvine Scientific, Irvine, CA). As células foram transfectadas por electroporação com 40 μ g de ADN de pING4533 que havia sido digerido em primeiro lugar com *NotI* e havia sido extraído depois com fenol-clorofórmio e precipitado com etanol. A seguir à electroporação deixas-se as células em repouso durante 24 horas em meio F12 de Ham não selectivo. As células foram então tripsinizadas, novamente colocadas em suspensão segundo uma concentração de 5×10^5 células/mL de meio F12 de Ham enriquecido com AMP (25 μ g/mL) e xantina (250 μ g/mL) e depois foram aplicadas em placas à razão de

104 células/cavidade, em placas com 96 cavidades. As células K1 de OHC não transfectadas não conseguiram crescer neste meio devido à inibição da síntese de pirimidina por acção do AMP.

Decorridas 2 semanas, foram observadas colónias constituídas pelas células transfectadas nas placas de 96 cavidades. Os sobrenadantes provenientes das cavidades que continham colónias singulares foram analisados para se pesquisar a presença de proteína reactiva à EIP, em conformidade com um protocolo de EISLE (o mesmo que ELISA) anti-BIP, utilizando como padrão a BIPr(1-199). Nesta experiência, as placas de 96 cavidades de tipo Immunolon-II (Dynatech, Chantilly, VA) foram pré-recobertas com anti-soro de coelho anti-BIPr(1-199), purificado por afinidade. Juntou-se as amostras de sobrenadante e efectuou-se a detecção utilizando anti-soro de coelho anti-BIPr(1-199), biotinilado e purificado por afinidade, e ainda avidina marcada com peroxidase.

Por este processo foram pesquisadas aproximadamente 800 colónias. Foram transfectadas 31 colónias, para as quais a produção atingiu os valores máximos, para placas de 24 cavidades para se fazer uma avaliação da produtividade. Deixou-se as células crescerem até à confluência numa placa de 24 cavidades em meio F12 de Ham enriquecido com 10% de SFB. No momento em que as células chegaram à confluência, retira-se o meio F12 de Ham e acrescenta-se 1 mL de meio HB-CSE (o mesmo que HB-CNO) isento de soro (Irvine Scientific) mais 10 µL de esferulas de S-sepharose estéreis (Pharmacia, Piscataway, NJ), conforme descrito no pedido de patente de invenção norte-americana co-rendente e de que os requerentes são co-proprietários, com o número de série 081072 063, publicado como sendo o documento WO 93/23540

(pedido de patente de invenção europeia n.º 93913992.9), da autoria de Grinna. As células ficaram então a incubar durante 7 dias, após o que se efectuou a remoção das esférulas de S-sepharose e se fez a lavagem com NaCl 0,1 M em tampão Tris 10 (pH 7,5). Efectuou-se a eluição do produto a partir das esférulas por adição de NaCl 1,0 M em tampão Tris e fez-se uma avaliação quantitativa em conformidade com o protocolo de EISLE, conforme descrito supra. O transformante produtor, da parte de cima, designado por A153, segregou aproximadamente 3 µg/mL nesta experiência e foi adaptado para crescer em meio Excell 301 isento de soro (JRH Scientific, Lenexa, KS). As células adaptadas cresceram em fermentadores de 1,5 L em meio Excell 301 na presença de esférulas de S-sepharose. Avaliou-se a produtividade ao fim de 120 a 140 horas, por análise através de CLER em C4 efectuada ao produto resultante da eluição das esférulas de 'S-sepharose' (alíquotas de 50 mL). A produtividade foi de 15 a 25 µg/L nestas fases da fermentação.

E. Transfecção de células DG44 de OHC (o mesmo que CHO-DG44) com o pING4222

O plasmido pING4222 contém ACN que codifica o análogo de BIPr(1-193)ala¹³³ fundido com o promotor A-MuLv, a sequência de Kozak optimizada de início da tradução, a região não traduzida em 3' da cadeia pesada γ-1 humana e o gene DHFR do murganho, para selecção de células transfectadas em meio isento de nucleósidos.

Manteve-se a linhagem de células DG44 de OHC em meio F12 de Ham mais 10 % de SFB com glutamina/penicilina/estreptomicina. Efectuou-se a transfecção das células com ADN linearizado do pING4222 (40 µg digeridos

com PvuII, tendo a extracção sido efectuada com fenol-clorofórmio e a precipitação realizada em etanol), utilizando ~ a tal o método do fosfato de cálcio de Wigler et al., Cell, 11: 223 (1977). A seguir ao tratamento com o fosfato de cálcio fez-se uma aplicação das células sobre placas de 96 cavidades, à razão aproximada de 10^5 células/cavidade, tendo os transfectantes sido obtidos por crescimento em meio selectivo constituído por meio MEMa a que faltavam os nucleósidos (Irvine Scientific) e enriquecido com SFB dialisado (100 mL de soro dialisado em presença de 4 L de NaCl 0,15 M frio, utilizando para tal uma membrana a deixar passar até ao valor de MW 6000-8000, durante 16 horas a 4°C). As células DG44 de OHC não transfectadas não conseguem crescer neste meio devido a mutação do DHFR e à falta de nucleósidos num meio enriquecido com o soro dialisado.

Ao fim de 2 semanas, cada cavidade continha aproximadamente 2-3 colónias. Efectuou-se uma análise dos sobrenadantes das cavidades de uma placa de 96 cavidades para se pesquisar a presença da BIPr(1-193)ala¹³² em conformidade com o protocolo de EISLE referido na secção A. Efectuou-se uma ampliação dos clones que mais produziram em 24 horas, em placas de 24 cavidades com meio MEMa selectivo enriquecido com 0,5 μ M de metotrexato para induzir a amplificação génica do ADN que codifica o análogo da BIPr. Ao observar o crescimento, efectua-se a transferência das células para uma nova placa de 24 cavidades e avaliou-se a produtividade a partir dos produtos da eluição das esferulas de S-sepharose, conforme descrito na secção A a propósito dos transfectantes de pINC1533/K1 de ORC. Combinou-se os cinco clones que mais produziram e efectua-se a sub-clonagem por diluição limitativa em placas de 96 cavidades. Recorrendo ao protocolo de EISLE efectua-se uma

pesquisa dos níveis de BIPr(1-193)ala¹³² nas cavidades com os sobrenadantes que continham colónias singulares. Os 20 clones que mais produziram foram a seguir expandidos em placas de 24 cavidades e submetidos a nova amplificação para se pesquisar a presença de metotrexato 0,4 μ M, tendo sido determinados pelo protocolo de EISLE os níveis de expressão do produto das células amplificadas. Os melhores produtores, a saber, os clones 4, 75 e 80, segregaram 25-37 μ g/mL em 7 dias numa placa de 24 cavidades que continha as esférulas de 'S-sepharose'.

C. Transfecção das células Sp2/O com o pING4223 e o pING4221

Uma estratégia adoptada numa tentativa para se conseguir a expressão óptima dos produtos de BIPr desejados implicou a transfecção de células, possuidoras de um primeiro plasmido de expressão, com um primeiro marcador, a pesquisa dos produtores de níveis mais elevados e a subsequente transfecção das mesmas células com um segundo plasmido de expressão, possuidor de um marcador diferente. Seguidamente descreve-se tal estratégia, utilizando células Sp2/O.

O plasmido pING4223 contém o ADN que codifica a BIPr(1-193)ala¹³² fundida com o promotor A-MuLV, a sequência de Kozak optimizada de início da tradução, as sequências não traduzidas em 3' da cadeia pesada γ -1 humana e o marcador gpt para selecção das células resistentes ao AMP.

Manteve-se a linhagem de células Sp2/O em MEMO (o mesmo que DMEM) enriquecido com 10 % de SFB com glutamina/penicilina/estreptomicina. Efectuou-se a transfecção das células Sp2/O por electroporação com 40 μ g de ADN de

pING4223 que havia sido digerido com NotI, realizou-se a extracção com fenol-clorofórmio e fez-se precipitar com etanol. A seguir à electroporação deixou-se as células em repouso durante 48 horas em MEMD não selectivo. A seguir efectuou-se a centrifugação das células que foram novamente colocadas em suspensão segundo uma concentração de 5×10^4 células/mL de MEMD enriquecido com AMP (6 µg/mL) e xantina (250 µg/mL), tendo sido feita depois uma aplicação de 10^4 células/cavidade em placas com 96 cavidades. As células Sp2/O não transfectadas não foram capazes de crescer neste meio, devido à inibição da síntese da pirimidina por acção do AMP. Ao fim de 1,5 - 2 semanas foram observadas nas placas de 96 cavidades colónias constituídas pelas células transfectadas. Efectuou-se uma análise dos sobrenadantes das cavidades que continham colónias singulares para se pesquisar a presença da proteína reactiva ao produto, utilizando o protocolo de EICL. As colónias de produção mais elevada foram transferidas para uma placa de 24 cavidades e avaliou-se a sua produtividade em culturas extintas das 24 cavidades onde havia células a crescer na presença e na ausência de dexametasona 10^{-7} M, que é uma substância que induz um aumento da expressão pelo promotor A-MuLv em consequência das interacções com o receptor glicocorticoide. O melhor produtor, o clone 2X3, segregou aproximadamente 3 µg/mL e 7 µg/mL respectivamente na ausência e na presença de dexametasona.

A seguir transferiu-se o clone 2X3 por electroporação, conjuntamente com o pING4221, que contém o gene *his* para selecção de transfectantes. Após a recolha, por um período de 3 horas em MEMD mais 10 de G⁴¹⁸ as células foram aplicadas em placas de 96 cavidades a razão aproximada de 10^4 células/cavidade em MEMD/SFB enriquecido. AMP na concentração de 6 µg/mL, xantina na concentração de 250

µg/mL e histidinol 8 mM. As células não transfectadas não foram capazes de crescer na presença do histidinol e do AMP. Ao fim de um período de 1,5 a 2 semanas, foram observadas células transfectadas nas placas de 96 cavidades. Efectuou-se uma análise das sobreculturas retiradas das cavidades que continham colónias singulares para se pesquisar a proteína reactiva à BIPr, em conformidade com o protocolo de EISLE.

Os produtores que mais produziram foram transferidos para uma placa de 24 cavidades. Avaliou-se a produtividade nas culturas extintas das 24 cavidades para células a crescerem na presença e na ausência de dexametasona 10^{-7} M. O melhor produtor, a saber, o clone 2X3-130, segregou aproximadamente 15 µg/mL e 30 µg/mL respectivamente na ausência e na presença de dexametasona. Este isolado foi depois sub-clonado por diluição limitativa em placas de 96 cavidades. As cavidades que continham colónias singulares foram analisadas em conformidade com o protocolo de EISLE e os melhores produtores foram expandidos e novamente testados em culturas de 24 cavidades, na presença e na ausência de dexametasona 10^{-7} M. 3 sub-clone que mais produziu, ou seja, o n° 25, segregou aproximadamente 16 µg/mL e 33 µg/mL respectivamente na ausência e na presença de dexametasona.

D. Transfecção de células Sp2/O com pING4143 e pING4150

O plasmido pING4143 contém o ADN que codifica a BIPr(1-1983)ala¹³⁷ fundida com o promotor A-MuIv, a sequência de Kozak optimizada de início da tradução, as sequências não traduzidas em 3' da cadeia leve e do sur-reanho conjuntamente com o gene *gpt* para selecção das células resistentes ao AMP. As células Sp2/O foram

transfectadas por electroporação com 4C µg de ADN do pING4243 que foi digerido em primeiro lugar com NotI, ~~extraído~~ extraído com fenol-clorofórmio e precipitado com etanol. A seguir à electroporação deixou-se ficar as células em repouso durante 48 horas em MEMD não selectivo. As células foram então centrifugadas e novamente colocadas em suspensão, segundo uma concentração de 5×10^4 células/mL de MEMD enriquecido com AMF na concentração de 6 µg/mL e com xantina na concentração de 250 µg/mL, tendo sido aplicadas em placas de 96 cavidades a razão aproximada de 10^4 células/cavidade.

Decorridas aproximadamente 2 semanas observou-se nas placas de 96 cavidades colónias constituídas por células transfectadas. Efectuou-se uma análise dos sobrenadantes retirados das cavidades que continham colónias singulares para se pesquisar a presença da proteína reactiva a BIP, em conformidade com o protocolo de EISLE. As colónias que mais produziram foram transferidas para uma placa de 24 cavidades. Avaliou-se a produtividade em culturas extintas das 24 cavidades efectuadas com células a crescerem na presença e na ausência de dexametasona 10^{-7} M. O melhor produtor, isto é, o clone 134, segregou aproximadamente 12 µg/mL e aproximadamente 28 µg/mL respectivamente na ausência e na presença de dexametasona.

Efectuou-se a transfecção do clone 134 por electroporação com um vector, a saber o pING4150, que contém o ADN que codifica a BIPx(1-193)HisTM fundido com o promotor A-MuLV e com a região não traduzida em 3' da cadeia leve do surdão que possui o gene His para selecção de transfectantes. Antes da electroporação fez-se digerir primeiro o vector e extraiu-se com fenol-clorofórmio e fez-se precipitar com etanol. Depois de um período de repouso

de 48 horas em MEMVID mais 10 % de SLB, as células foram aplicadas em placas de 96 cavidades à razão aproximada de 10^4 células/cavidade em MEMD/SFB enriquecido com AMF plus na concentração de 6 µg/mL mais xantina na concentração de 250 µg/mL e histidinol 8 mM. As células não transfectadas não foram capazes de crescer na presença do AMF e do histidinol. Ao fim de 2 semanas aproximadamente, foram observadas colónias constituídas por células transfectadas nas placas de 96 cavidades. Efectuou-se uma análise dos sobrenadantes retirados das cavidades que continham colónias singulares para se pesquisar a presença da proteína reactiva à BIP, em conformidade com o protocolo de EISLE. As colónias que mais produziram foram transferidas para uma placa de 24 cavidades. Avaliou-se a produtividade em culturas extintas de 24 cavidades em que havia células a crescer na presença e na ausência de dexametasona 10^{-7} M. O clone que mais produziu, isto é, o clone 134-11, recebeu a nova designação de C 1770. O clone C1770 segregou 36 µg/mL sem dexametasona e segregou mais de 42 µg/mL na presença de dexametasona. Este clone (C1770) foi depositado na colecção americana de culturas tipo (American Type Culture Collection, 21301 Parklawn Drive, Rockville, MD 26852) com o número de acesso HB 11247.

E. Transfecção das células K1 de OHC com o pING4143

Transfectou-se a linhagem de células K1 de OHC com ADN do pING4143 conforme descrito na secção A a propósito da transfecção das células K1 de OHC com o pING4533. Decorridas cerca de 2 semanas efectuou-se uma análise dos sobrenadantes retirados de aproximadamente 800 cavidades que continham colónias singulares para se pesquisar a presença da proteína reactiva à BIP, em conformidade com o protocolo de EISLE. As colónias que mais produziram foram

transferidas para placas de 24 cavidades. As colónias que mais produziram, tendo segregado aproximadamente entre 9 e 13 $\mu\text{g/mL}$, podem ser adaptadas depois a um meio sem soro numa preparação para crescimento em fermentadores. Também podem ser novamente transfectadas com um vector, por exemplo, o pING4150 ou o pING4154 que possuem respectivamente os marcadores selectivos *his* ou *neo*, para se obter uma linhagem de células que produz níveis ainda mais elevados do produto BIPr.

F. Transfecção de células K1 de OHC com o pING4144

O plasmídeo pING4144 é semelhante ao plasmídeo pING4143 com a excepção de conter o promotor de citomegalovírus humano (CMVh) em vez do promotor A-MuLv. Efectuou-se a transfecção da linhagem de células de OHC com ADN do pING4144 pelo processo descrito supra na secção A. Decorridas cerca de 2 semanas, efectuou-se uma análise dos sobrenadantes retirados de aproximadamente 200 cavidades que continham colónias singulares para se pesquisar a presença da proteína reactiva a BIP, em conformidade com o protocolo de EISLE. As colónias que mais produziram foram transferidas para placas de 24 cavidades e determinou-se a expressão da BIPr em placas de 24 cavidades que continham butirato de sódio. O clone que mais produziu: (o clone 174) segregou aproximadamente entre 3 a 5 $\mu\text{g/mL}$ sem butirato e segregou aproximadamente 15 a 18 $\mu\text{g/mL}$ na presença de butirato 5 mM nesta experiência. Este clone, redominado C 1771, foi depositado na colecção americana de culturas tipo (American Type Culture Collection, 21301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852) como sendo a organismo ATCC com o número de acesso CRL 11246. Os clones que mais produzem podem ser adaptados depois a um meio sem soro na preparação para o crescimento em fermentadores. Também podem ser

novamente transfectados com um vector, tal como o pING4151 ou o pING4155, que contenha o gene da BIPr sob o controlo do promotor CMVh, mas respectivamente com os marcadores *his* e *neo*, para se obter uma linhagem de células que produzam níveis ainda mais elevados de BIP.

G. Transfecção de células NSO com o pING4143

Efectuou-se a transfecção de células NSO com ADN do pING4143 por electroporação. Decorridas aproximadamente 3 semanas foram observadas colónias de células transfectadas nas placas de 96 cavidades. Zfectuou-se uma análise dos sobrenadantes recolhidos das cavidades que continham colónias singulares para se pesquisar a presença da proteína reactiva a BIP, em conformidade com o protocolo de EISLE. As colónias que mais produziram foram transferidas para uma placa de 24 cavidades. Avaliou-se a produtividade em culturas extintas de 24 cavidades. As colónias que mais produziram segregaram entre 15 a 16 µg/mL. As colónias que mais produziram podem ser novamente transfectadas com um vector, tal como o plasmido pING4150, conforme descrito supra, para se obter colónias que produzam ainda mais.

H. Transfecção de células NSO com o pING4232

Efectuou-se a transfecção de células NSO por electroporação com o pING4132 que contém o ADN que codifica a BIPr(1-193)_{ala}¹³² fundida com a sequência de Kozak optimizada de início da tradução, clonada dentro do vector pEX13 [Hebbington et al. *Biotechnology*, 10: 169-175 (1992)]. O vector pEX13 contém o gene da glutamina - sintetase para a selecção de transfectantes que são capazes de crescer num meio a que falta a glutamina. Decorridas aproximadamente 3 semanas, foram observadas colónias de

células transfectadas nas placas de 96 cavidades. Efectuou-se uma análise dos sobrenadantes retirados das cavidades que continham colónias singulares, em conformidade com o protocolo de EISLE. As colónias que mais produziram foram transferidas para uma placa de 24 cavidades. Avaliou-se a produtividade em culturas extintas de 24 cavidades. As colónias que mais produziram, tendo segregado entre 7 e 15 pg em culturas extintas de 24 cavidades, podem ser submetidas seguidamente a uma amplificação na presença de diversas concentrações de metionina-sulfoximina.

III. Transfecção de células Sp2/O com o pING4145

O plasmido pING4145 contém ADN que codifica a BIPr(1-193)ala¹³² fundida com o promotor A-MuLv, a sequência de Kozak optimizada de início da tradução, as sequências não traduzidas em 3' da cadeia leve k do murganho e um gene *gpt* para selecção de células resistentes aos AMF. As células Sp2/O foram transfectadas por electroporação com 40 µg de ADN o pING4145 que foi digerido em primeiro lugar com *NotI*, extraído com fenol-clorofórmio e precipitado em etanol. A seguir a electroporação, deixou-se as células em repouso durante 48 horas em MEMD não selectivo, efectuou-se a centrifugação e colocou-se as células novamente em suspensão, a uma concentração de 5×10^4 células/mL em MEMD enriquecido com AML numa concentração de 6 µg/mL e xantina na concentração de 250 µg/mL. Depois fez-se uma aplicação das células em placas de 96 cavidades à razão aproximada de 10^4 células/cavidade. Decorridas aproximadamente 2 semanas foram observadas colónias constituídas por células transfectadas nas placas de 96 cavidades. Efectuou-se depois uma análise dos sobrenadantes retirados das cavidades que continham colónias singulares para se pesquisar a presença da proteína reactiva à BIP, em

conformidade com o protocolo de EISLE. As colónias que mais produziram foram transferidas para uma placa de 24 cavidades e avaliou-se a produtividade em culturas extintas de 24 cavidades para as células a crescerem na presença e na ausência de dexametasona 10^{-7} M.

Com o intuito de maximizar a expressão da BIP, o transfectante Sp2/O que mais produziu pode ser transfectado por electroporação com um vector que contém as sequências génicas que codificam a BIPr(t-193)alaⁱ³² fundida com o promotor A-MuLv e com a região não traduzida em 3' da cadeia leve do ~~marçanho~~ que possui o gene *his* para selecção de transfectantes.

Transfecção das células KI de OHC com o pING4145

Efectuou-se a transfecção da linhagem de células KI de OHC com ADN do pING4145, conforme descrito supra na secção A. Decorridas cerca de 2 semanas é possível analisar os sobrenadantes provenientes de aproximadamente 500 a 800 cavidades que contêm colónias singulares para se pesquisar a presença da proteína reactiva à BIP, em conformidade com o protocolo de EISLE. As colónias que mais produziram foram transferidas para placas de 24 cavidades e determinou-se a expressão da BIP em placas de 24 cavidades que continham 'S-sepharose'. As colónias que mais produziram foram depois adaptadas a um meio sem soro na preparação para o crescimento em fermentadores. Estas colónias também podem ser novamente transfectadas com um vector que contenha um marcador selectivo diferente, para se obter uma linhagem celular que produza níveis ainda mais elevados de produto de BIPr.

K. Expressão dos produtos de BIPr a partir de células de insectos

Um outro sistema eucariótico em que os produtos de BIPr podem ser expressos é constituído por células de insectos que tenham sido infectadas com baculovírus recombinante que contenha o ADN que codifica um produto de BIPr. Os sistemas para gerar vírus recombinantes e para se conseguir a expressão de produtos recombinantes a partir deles encontram-se comercialmente disponíveis (Invitrogen, San Diego, CA). O ADN que codifica a BIPr(1-199), incluindo a sequência de sinal de 31 aminoácidos, foi clonado dentro de um local *NheI* num vector de transferência pBlueBac (Invitrogen). As células de insectos Sf9 (BRL; ATCC CRL 1711) foram co-transfectadas com este vector e com o VPnMac (o mesmo que AcMNPV) de tipo selvagem (vírus da poliohidrose nuclear múltipla *Autographa californica*) (Invitrogen). As placas virais recombinantes foram depois identificadas, purificadas e utilizadas para se obter lotes virais recombinantes de elevada concentração, conforme descrito nos protocolos fornecidos por BRL.

O baculovírus recombinante produzido foi utilizado para infectar mais células Sf9. Para se fazer isso foram utilizados 8 pratos independentes de 60 mm que continham células Sf9 infectadas com o baculovírus. De cada um desses 8 pratos foram retiradas amostras em momentos diferentes durante o dia, sendo para tal colhido o meio de um prato com células infectadas. Após a colheita, centrifugou-se o meio a 100 rpm durante 10 minutos e guardou-se o sobrenadante a 4 °C. As células foram depois enxagoadas uma vez com 4 mL de STP e submetidas ao processo de citólise com tampão de citólise NP40 à razão de 100 µL/prato (tampão constituído por 1 % de NP40, NaCl 150 mM Tris-HCl 50 mM, pH

8/0}, efectuando a incubação sobre gelo durante 30 minutos. As células foram depois recolhidas para dentro de um tubo de Eppendorf com um raspador de células. Os lisados celulares foram então centrifugados numa microcentrifugadora durante 2 minutos. Transferiu-se o sobrenadante do lisado para um novo tubo e guardou-se a -20°C . As amostras médias de cada altura ao dia foram analisadas para pesquisa do teor em BIP, em conformidade com protocolo de EISLE, e os lisados foram analisados pelo método de Western, utilizando para tal um anticorpo anti-BIP.

Não houve nenhum produto de BIP detectável nesses meios, em conformidade com o protocolo de EISLE, nos dias 1 a 4 após a infecção. No entanto, nos dias 5 a 6 após a infecção, detectou-se nas amostras dos meios um pico de produto de BIP da ordem de 200 a 500 ng/mL. A análise pelo método de Western efectuada aos lisados revelou a existência de uma banda reactiva a BIP que tinha aproximadamente 23 kDa, no segundo dia após a infecção. Essa banda revelou uma intensidade crescente até ao 6º dia.

O quadro II subsequente agrupa, de forma resumida, as transfectões pormenorizadas descritas nas secções A a J supra

QUADRO II

Célula hospedeira	Transfectada com
ORC-DG44	pING4222
NI de ORC	pING4232, pING4143, pING4144, pING4145
NSO	pING4143, pING4232
SP2/O	pING4223 e depois pING4221, pING4143 e depois pING4150, pING4145

EXEMPLO 3

Construção de plasmídeos para transcrição e tradução in vitro dos produtos BIPr(1-199)_{ala}¹³² e BIPr(1-199)_{ser}¹³³

Foram realizados estudos de transcrição/tradução in vitro, utilizando o plasmídeo pIC 127 como a fonte de ADN codificadora de BIPr(1-199). A Construção do plasmídeo pIC 127 foi efectuada conforme a seguir se descreve. Amplificou-se por RCP o ADN que codifica a BIPr(1-199), incluindo a sequência de sinal de 31 aminoácidos, a partir de um plasmídeo que continha o ADNc de comprimento completo que codifica a BIP em pGEX-72f(+). A amplificação foi realizada de tal modo que o local *SalI* foi incorporado na extremidade 5' e os locais *XhoI* e *SstII* foram incorporados na extremidade 3' da sequência que codifica a BIPr, mediante a utilização dos iniciadores BIP-3: GTCGACGCATGCGAGAGAACATGGC (SEQ ID N° 12) e BIP-2: CCGCGGCTCGAGCTATATTTGGTCAT (SEQ ID N° 9). O fragmento resultante amplificado por RCL foi cortado com as extremidades a condizer e clonado dentro do local *SmaI* da região de clonagem múltipla do plasmídeo pT7T3 18u (Pharmacia LKB Technology, Piscataway NJ), com a finalidade de se gerar o pIC 102.

O segmento intercalar pIC102 que codifica a BIPr(1-199) e a sequência de sinal de 31 aminoácidos foi depois excisado por digestão do plasmídeo com *BamHI* e *Asp718I*. Há um local *BamHI* a flanquear o local *SalI* no pIC 102 e há um local *Asp718I* a flanquear o local *SstII* no pIC102. As extremidades do fragmento excisado foram cortadas com as pontas a condizer, utilizando para tal polimerase de ADN das T4, e o fragmento com as pontas cortadas a condizer foi depois clonado no plasmídeo pGEM1 (Promega, Madison, WI) que

havia sido digerido previamente com *Pst*I e *Eco*RI e cortado com as pontas a condizer com a polimerase do ADN das T4. O arquétipo resultante recebeu a designação de pIC124 e contém nele o segmento intercalar que codifica a BIPr(1-199), orientado de tal modo que a sua extremidade 5' fica adjacente ao promotor Sp6 no pGEM1.

Excisou-se depois a sequência de sinal de 31 aminoácidos existente no segmento intercalar pIC124 removendo a região entre os dois locais *Hind*I existentes no pIC124 para se criar o pIC127. A região excisada foi substituída com um ligador que reconstituiu o codão de início (ATG) e a sequência codificadora do primeiro aminoácido da BIP. Foram isolados dois fragmentos a partir da digestão do pIC 124 com *Hind*I e *Sst*I: (1) o fragmento *Hind*I-*Sst*II que contém a região de codificação da BIPr(1-199), com exclusão do codão do primeiro aminoácido; e (2) o fragmento *Sst*II-*Hinc*II constituido pela parte restante do plasmido. O primeiro codão na sequência de codificação da BIP e um codão para metionina em frente da sequência da BIP foram inseridos mediante a utilização do ligador formado a partir dos dois oligonucleótidos complementares recombinados, designadamente o BIP-28: GACGCCACCATGGTC (SEQ ID N° 13) e o BIP-29: GACCATGGTGGCGTC (SEQ ID N° 14). Esses dois oligonucleótidos foram ligados conjuntamente com os fragmentos *Hinc*I-*Sst*II e *Sst*II-*Hinc*II provenientes de pIC 124 para proporcionar o pIC 127.

Foram construídos dois plasmídeos, a saber o pML101 e o pML102, utilizando o pIC127 para transcrição/tradução *in vitro* da BIPr(1-199)ala¹³² e da BIPr(1-199)ser¹³². Para se fazer isto, fez-se digerir o pIC 127 com *Sst*II e *Eco*RI e purificou-se o fragmento grande de *Sst*II-*Eco*RI. Para se construir o plasmídeo pML101, que contém um segmento

intercalar BIPr(1-199)ala¹³², ligou-se o fragmento de EcoRI-SstII, obtido a partir do pING4519, ao fragmento de SstII-EcoRI proveniente do pIC 127. Para se construir o plasmídeo pML 102, que contém o segmento intercalar BIPr(1-199)ser¹³⁵, ligou-se o fragmento de EcoRI-SstII, obtido a partir do pING4520, ao fragmento de SstII-EcoRI proveniente do pIC 127.

As substâncias BIPr(1-199), BIPr(1-199)ser¹³⁵ e BIPr(1-199)ala¹³² foram expressas *in vitro* a partir dos plasmídeos pIC 127, pML 101 e pML 102 utilizando o Sistema do Lisado Reticulocítico da ProMega (Madison, WI) acoplado ao SP6 da GPT. Tal sistema permite a transcrição e a tradução acopladas de genes clonados *in vitro*, utilizando um sistema de tradução eucariótico. Cada transcrição/tradução acoplada foi efectuada em conformidade com os protocolos dos fabricantes, utilizando 2 µg de ADN plasmídico num volume total de 25 µL, incluindo a ³⁵S-metionina, para gerar a proteína marcada. Os produtos proteicos marcados foram acrescentados em alíquotas de 5 µL a 20 µL de tampão de amostra de ureia e foram aquecidos a 95°C durante 3 minutos. Foram aplicadas alíquotas de 10 µL de cada amostra sobre um gel de poliacrilamida com 15 % de DSS^d na presença ou na ausência de DTT (50 mM). Depois de se fixar e secar o gel, as bandas proteicas marcadas foram visualizadas por auto-radiografia. Os resultados das auto-radiografias demonstram que o ADN que codifica a BIPr(1-199), a BIPr(1-199)ala¹³² e a BIPr(1-199)ser¹³⁵ exprimem produtos proteicos com o tamanho previsto de aproximadamente 23 kDa para um fragmento terminal da BIP. Além do mais, os três produtos se expressam BIPr(1-199), BIPr(1-199)ala¹³² e BIPr(1-199)ser¹³⁵. r . capazes de r espécies de peso molecular superior, com o tamanho previsto para os químeros da BIP(1-199), e também espécies maiores, sendo

desaparecido todas por redução com DTT. Presume-se que a expressão de espécies dimerizadas nos produtos BIPr(1-199)ols¹³⁹ e BIPr(1-199)ala¹⁴⁰ possa ser resultado se ter utilizado um sistema de transcrição/tradução *in vitro* isento de células. Um tal sistema não permite uma correcta transformação pós-traducional, a reconstituição, etc., que normalmente iriam ocorrer na tradução celular. Assim, pode suceder que as pontes de dissulfureto adequadas nem sempre se formam no sistema *in vitro*, levando à formação de dímeros em alguns casos.

As proteínas marcadas, geradas no sistema de expressão *in vitro* descrito supra, foram testadas depois para se pesquisar a sua actividade de ligação ao LPS. As cavidades das placas de microtitulação foram recobertas com LPS proveniente de *Salmonella minnesota* R7 (mutante Rd) (5 mg/mL numa cultura de reserva em metanol) em Na₂CO₃ 0,1 M/EDTA 20 mM (ácido etileno-diamina-tetracético) a pH 9,4 (um total de 2 µg de LPS numa cavidade de 50 µL). A seguir a incubação efectuada de um dia para o outro a 4°C fez-se o enxaguamento das cavidades com água e a secagem a 37 °C. As cavidades foram então bloqueadas com 215 µL de meio de Dulbecco - STP/0,1% de ASB durante 3 horas a 37 °C. Depois deitou-se fora a solução de bloqueio e efectuou-se uma lavagem das cavidades com STP/0,2 % de Tween 20. A seguir adicionaram-se as amostras de BIPr (2 µL do reagente de tradução) a um volume total de 50 µL em STP/0,2 % de Tween. A seguir a uma incubação efectuada de um dia para o outro a 4°C efectuou-se a lavagem das cavidades 3 vezes com STP/0,2 % de Tween e determinou-se, por contagem de cintilação em meio líquido, a quantidade de proteína marcada que ficou em cada cavidade. Os resultados demonstraram que houve uma ligação ao LPS aproximadamente equivalente para as três espécies de BIP referidas supra. A espécie BIPr(1-199)

revelou uma ligação de 48.690 cpm; a espécie BIPr(1-199)da-¹³² revelou uma ligação de 59.911 cpm; e a espécie BIPr(1-199)cis¹³¹ revelou uma ligação de 52.537 cpm. Cada um destes valores representa a média de determinações efectuadas em triplicado. A ligação média à contraprova (sem nenhum ADN) foi de 5-395 cpm.

EXEMPLO 4

Caracterização do Produto

A. Caracterização Física

Efectuou-se a caracterização dos produtos de BIPr recorrendo à CLER de fase inversa (em C4), a CLER de permuta catiónica (MA7C), a EGPA-DSS e à espectrometria de massa por ionização por electropulverização (EP-IPP). Os produtos de BIPr que se pretendia caracterizar foram purificados a partir de colheitas retiradas de garrafas cilíndricas ou de uma fermentadora de 10 litros, quer em conformidade com um procedimento de purificação de um só passo, quer em conformidade com um procedimento de purificação de vários passos. O procedimento de purificação de um só passo foi essencialmente aquele que está descrito na pedido de patente de invenção norte-americana co-pendente, de que os requerentes são co-proprietários com o número de série 08/972.863, publicado como a patente de invenção WO 93/23540 (pedido de patente de invenção europeia nº 93913992.9) da autoria de Grinna, tendo sido realizado mais um segundo passo de lavagem. Dito de forma abreviada, juntaram-se as esférulas de S-sepharose a um meio de crescimento que continha os produtos de BIPr. Depois as esférulas de S-sepharose foram retiradas desse meio e ~~as~~ com acetato de sódio 20 . e cloreto de

sódio 100 mM a pH 4,0. Efectuou-se um segundo passo de lavagem com acetato de sódio 20 mM e cloreto de sódio 700 mM a pH 4,0. A eluição dos produtos de BIPr purificados foi efectuada com acetato de sódio 20 mM e cloreto de sódio 1000 mM a pH 4,0.

O procedimento de purificação em vários passos implicou a purificação dos lotes reunidos dos produtos de BIPr que haviam sido previamente purificados separadamente, conforme descrito supra. A seguir à purificação de cada um dos 20 lotes individuais de produtos de BIPr pelo método de um só passo, juntaram-se os Lotes e fez-se uma nova purificação realizando em primeiro lugar uma diluição da concentração salina dos lotes saturados, até se chegar ao valor de 200 mM. Aplicou-se depois uma amostra dessa mistura a uma coluna de S-sepharoze e lavou-se, a pH 4,0, com acetato de sódio 20 mM e cloreto de sódio 200 mM seguindo-se o tratamento com cloreto de sódio 700 mM. A eluição dos produtos de BIPr foi realizada utilizando acetato de sódio 20 mM e cloreto de sódio 1000 mM a pH 4,0. Efectuou-se depois a análise dos produtos de BIPr purificados para se determinar as suas características físicas.

1. Análise dos produtos de BIPr por EGPA-DSS

Efectuou-se a análise dos produtos de BIPr por EGPA-DSS utilizando géis de poliacrilamida a 14 % e um sistema tampão de "rig-glycine" em condições redutoras e não redutoras. As bandas proteicas foram contrastadas quer com o corante azul de Coomassie quer por contraste com prata, para efeitos de visualização.

Conforme se observa na figura 1, o produto BIPr(1-199) não surgiu sob a forma de uma banda principal aproximadamente com 23 kDa e uma banda secundária aproximadamente com 40 kDa. A banda principal foi identificada como sendo o produto BIPr(1-199) por comparação de padrões que foram experimentados simultaneamente e a banda secundária foi identificada como sendo uma forma dimerica do produto BIPr(1-199) por imunoelectrotransferência. A seguir à adição de 1/20 de volume de ditiotreitol 0,4 M (DDT) a uma amostra separada de BIPr(1-199), a análise por EGPA-DSS revelou a existência de uma única banda bem definida correspondente à espécie monomérica de 23 kDa da BIPr(1-199) identificada em condições não redutoras, conforme descrito supra.

A análise efectuada por EGPA-DSS ao produto BIPr(1-199)ala¹³² revelou a existência de uma banda única que migrou com a banda única de 23 kDa da BIPr(1-199) em condições redutoras. Em condições não redutoras a BIPr(1-199)ala¹³² migrou com a banda que migra mais rapidamente, pertencente ao conjunto das duas bandas bastante próximas observadas para a BIPr(1-199) (correspondente à banda de 23 kDa). Estes resultados, ilustrados na figura 2, indicam que o produto BIPr(1-199)ala¹³² existe essencialmente sob a forma monomérica após a purificação. Posto isto, os produtos de BIPr em que o resíduo de cisteína está substituído por um resíduo de alanina revelam uma resistência significativa à formação de dímeros.

2. Análise dos produtos de BIPr por CLER de permuta catiónica

Para se medir o teor em dímeros nos produtos de BIPr recorreu-se também à CLER de permuta catiónica, utilizando

uma coluna MA7C. Utilizou-se para tal um carregador MA7C da Bio-Rad (4,6 mm x 30 mm, N° de catálogo 125-00556 da Bio-Rad) equilibrado com 40 % de tampão B (MES 20 mM, NaCl 1 mM e pH 5,5), com um caudal de 1,0 mL/minuto. Analisou-se o produto de BIPr(1-199) diluindo uma amostra de 1 mL até à concentração de 100 µg/mL e injectando na coluna 200 µL da amostra diluída. Efectou-se a eluição do produto de BIPr com um gradiente de tampão B a variar entre 4 0% a 100 % ao longo de 6 minutos. O tampão A continha MES 20 mM e pH 5,5. Verificou-se a absorvência a 229 nm.

A análise da BIPr(1-199) revelou a existência de dois picos. A eluição de um primeiro pico ocorreu com um tempo de retenção de aproximadamente 3 minutos, conforme se observa na figura 3. A eluição de um segundo pico, mais pequeno, ocorreu com um tempo de retenção de aproximadamente 6 minutos. O primeiro pico, indicado na figura 3, representa o monómero da BIPr(1-199) e o segundo pico, ilustrado na figura 3, representa o dímero da BIPr(1-199), conforme determinado por meio de comparações com os tempos de retenção dos padrões monoméricos e diméricos purificados. O segundo pico (dímero) não surgiu quando as amostras foram reduzidas com DTT antes de terem sido injectadas na coluna.

Foram praticados procedimentos Idênticos para se determinar o padrão de eluição do produto de BIPr(1-199)ela¹²³. Conforme se observa na figura 4, a eluição do produto de BIPr(1-199)ela¹²³ tem lugar sob a forma de um pico único com um tempo de retenção correspondente àquele que foi observado para o pico do monómero de BIPr(1-199). Não houve sinais de existência de dímeros na amostra de BIPr(1-199)ela¹²³.

3. Análise dos produtos de BIPr por CLER de fase inversa (em C4) v por espectrometria de massa por ionização por electropulverização

A micro-heterogeneidade dos produtos de BIPr foi revelada por CLER de fase inversa e por espectrometria de massa por ionização por electropulverização (EM-IEP). Para a análise por CLER, equilibrar-se uma coluna Brownlee BU-300 C4 com 37 % de fase móvel B (é constituída por 60 % de acetonitrilo/0,063 % de TFA), a trabalhar com um caudal de 0,5 mL/min e As amostras (cada uma de 1 mL) de BIPr(1-199) foram diluídas até a concentração de 100 µg/mL, tendo sido injectados 50 µL de cada amostra. Lavou-se a coluna com a fase móvel B a 37 % durante 2,5 minutos e depois fez-se a eluição trabalhando com um gradiente de fase móvel B a variar entre 37 % e 50 %, durante 20 minutos. A fase móvel A era constituída por 5 % de acetonitrilo/0,1 % de TFA, tendo a absorvência sido verificada a 220 nm.

Os resultados da análise dos produtos de BIPr(1-199) por CLER de fase inversa estão indicados na figura 5. A eluição dos produtos de BIPr(1-199) ocorre revelando um segundo pico (principal) com um primeiro pico (secundário) parcialmente resolvido no bordo de ataque do segundo pico. Ao ser feita a redução com DTT apenas ocorre a eluição de um pico na coluna, correspondente ao segundo pico.

Foram praticados procedimentos idênticos para se analisar os produtos de BIPr(1-199) e a¹³². Conforme se observe na figura 6, a eluição do produto de BIPr(1-199) e a¹³² teve lugar como um pico único correspondente ao segundo máximo (principal) referido supra.

Os produtos de eluição correspondentes ao primeiro e ao segundo picos de CLER descritos supra, a partir dos três lotes separados de BIPr(1-199), foram isolados e analisados por EM-IEP para se determinar os seus conteúdos. A análise dos produtos da eluição que originaram o segundo pico (principal) na experiência efectuada com a BIPr(1-199) revelaram uma massa ligeiramente menor do que aquela que seria de esperar a partir de uma proteína de 199 aminoácidos. Tais dados indicam que a massa mais abundante encontrada no produto de eluição do segundo pico correspondia a um fragmento proteico de BIPr(1-193). No entanto, também estão presentes outras espécies com um tamanho desde 1-198 até 1-194. A análise do produto de eluição que originou o pico único obtido por CLER efectuada ao produto de BIPr(1-199)ala¹³² revelou resultados semelhantes aos que foram obtidos a partir do produto de eluição que originou o segundo pico (principal) referido supra. Estes resultados são consistentes com os dados de cartografia de péptidos que revelam a existência de terminais carboxi truncados nos produtos de BIPr(1-199).

Quando se fez a mesma análise com produtos de BIPr(1-193), observou-se uma heterogeneidade do terminal C significativamente reduzida. Os dados de EM-ESI obtidos a partir dos produtos de BIPr(1-193) revelaram que aproximadamente 85 % das proteínas contêm quer os primeiros 191, 193 ou 193 (+ um resíduo de alanina no terminal N) aminoácidos do terminal N da BIP. Estes resultados estão agrupados no quadro III.

QUADRO III

Resultados da espectrometria de massa por ionização por electropulverização para os picos monoméricos de CLER da BIPr(1-193) e da BIPr(1-199)			
Produto de BIPr previsto	Massa molecular aproximada	Resíduos de aminoácidos previstos	Intensidade relativa aproximada
BIPr(1-199)	21407	1-193	50,9 %
	21506	1-195	28,9 %
	21505	1-194	20,1 %
	21708	1-196	< 10 %
	21846	1-197	< 10 %
	21965	1-198	< 10 %
(1-193)	21408	1-193	36,2 %
	21183	1-191	34,1 %
	21293	1-192	< 10 %
	21477	1-193 + alanina do terminal N	14,5 %
	20924	1-189	15,2 %
Apenas foram quantificadas as espécies detectadas que estavam presentes em quantidades superiores a 10%. Estas espécies foram depois normalizadas para o valor de 100%.			

Estes dados comprovam que o AYN que codifica a BIPr(1-193) não produziu quantidades significativas da proteína BIPr(1-1993) de comprimento completo, ao passo que o ADN que codifica a BIPr(1-199) produziu quantidades significativas da proteína BIPr(1-1993). Com base nestes e noutros dados, presume-se que seja possível obter reduções significativas na heterogeneidade e aumentos significativos na produção da proteína pretendida (isto é, aquela para a qual é possível obter os códigos de inserção do ADN), ao mesmo tempo que é mantida a actividade óptima bactericida e de ligação ao LPS, utilizando formas truncadas do ADN que codifica a BIPr. Estima-se que o truncamento do ADN que se pretende exprimir venha a produzir reduções significativas de heterogeneidade dos produtos da expressão, na medida em que o ADN que se pretende exprimir não é truncado para além

da cisteína da posição 175 dos resíduos de aminoácidos. Também se presume que os produtos de expressão de formas truncadas do ADN que codificam as proteínas BIPr que estejam no intervalo dos primeiros 175 aminoácidos do terminal N da BIP até aos primeiros 199 aminoácidos do terminal N da BIP conservem a totalidade da actividade bactericida e de ligação ao LPS.

Os dados obtidos por EM-IEP revelaram também a presença de micro-heterogeneidade no terminal amino dos produtos de BIPr. Foram encontradas formas de produtos da BIPr que possuem um resíduo de alanina no terminal amino, tendo a confirmação sido realizada por sequenciação dos péptidos tripsínicos.

Conforme se observa na figura 5, o estudo de EM-TEP efectuado com o produto da eluição que produziu o primeiro pico (secundário) na CLER de fase inversa revelou a existência de proteínas que possuem uma distribuição de massas semelhante às que formaram o segundo pico (principal), com a excepção de cada valor de massa ser mais elevado aproximadamente 119-120 daltons. Estes resultados sugerem que a substância resultante da eluição e que produz o primeiro pico (secundário) na CLER, descrito supra, contém um aducto de cisteína ligado por uma ponte de dissulfureto, na medida em que isso responderia pela desvio uniforme observado nos valores de massa.

Para se testar a hipótese de que o primeiro pico (secundário) observado na CLER de fase inversa, produzido pela BIPr(1-199) representa aductos de cisteína, expõe-se a BIPr(1-199) ao reagente de Ellman (ácido ditionitroben-zênico, DTNB) que se liga aos grupos sulfidrílico livres com equivalentes grosseiramente molares. Tal tratamento

demonstrou que há menos de uma mole de grupos sulfidrilo livres por cada mole de I - j . Dada a presença de três resíduos de cisteína na BIP (nas posições 132, 135 e 178), estes resultados fundamentam a noção de que há que uma ponte de dissulfureto intramolecular nos produtos de BIPr quer a hipótese de haver dois dos grupos sulfidrilo espacialmente inacessíveis. O produto BIPr(1-199)als^{III} demonstrou não ter qualquer tipo de reactividade com o reagente de Ellman.

4. Estabilidade dos produtos de BIPr(1-199) durante a armazenagem

Efectuou-se uma análise de amostras de BIPr(1-199) (1 mg/mL) num tampão constituído por citrato de sódio 20 mM, tampão de cloreto de sódio 0,15 M, 0,1 % de poloxâmero e 0,302 C de polissorbat 80 a pH 5,0 para se determinar a sua estabilidade durante a armazenagem ao longo de um período de 8 semanas à temperatura de armazenagem recomendada de 2 °C e 8 °C e a temperaturas superiores compreendidas entre 22 °C e 37 °C.

Os resultados da estabilidade para a armazenagem a temperaturas entre 2 °C e 8 °C, agrupados no quadra IV, revelam um aumento da presença do dímero (entre 1 % e 4 %), mas não revelam nenhum aumento significativo no aducto de cisteína ou na formação de partículas na amostra.

QUADRO IV

Período de armazenagem	Aspecto lar	pH	Injetante desminhidado (%)	Dímeros (% por CLER)	Proteínas supel. (%)	Adueto de cisteína (%)	Inibido de LAL (% agglut.)	Partículas ind. ≥ 10µm	Partículas ind. ≥ 25µm
normal	líquido laravel	5,0	98,5	1,0	1,04	12	10	230	3
4 semanas	líquido laravel	5,0	98,5	3,2	1,02	11	11	113	2
8 semanas	líquido laravel	5,0	98,5	4,4	1,02	14	9	121	3

Pelo entanto, a armazenagem As temperaturas mais elevadas compreendidas entre 22 °C e 37 °C comprovou que a presença de dímeros e de partículas na amostra aumentava extraordinariamente e que a quantidade de aducto de cisteína aumentava de forma moderada. Estes resultados estão agrupados no Quadro V. Além disso, quando a BIPr(1-199) ¹³² foi guardada a uma temperatura entre 22 °C e 37 °C, não foi detectado nenhum dímero após um período de armazenagem de duas semanas. Em condições idênticas, a BIPr(1-199) denota aumentos significativos.

QUADRO V

Temperatura	Período de armazenagem	Aspecto lar	pH	Injetante desminhidado (%)	Dímeros (% por CLER)	Proteínas supel. (%)	Adueto de cisteína (%)	Inibido de LAL (% agglut.)	Partículas ind. ≥ 10µm	Partículas ind. ≥ 25µm
22°C	normal	líquido laravel	5,0	98,5	1,0	1,04	12	10	230	3
		líquido laravel	5,0	98,5	1,0	1,04	12	10	230	3
	4 semanas	líquido laravel	5,0	98,5	4,5	1,02	12	10	190	4
		líquido laravel	5,0	98,5	4,5	1,02	12	10	190	4
	8 semanas	líquido laravel	5,0	98,5	6,8	1,02	14	9	126	3
		líquido laravel	5,0	98,5	6,8	1,02	14	9	126	3
37°C	4 semanas	alguma partícula	5,0	98,5	3,9	1,04	10	12	130	20
	8 semanas	nenhuma partícula	5,0	98,5	1,0	1,04	12	10	230	3

5.1. Turbidez das composições farmacêuticas com o produto BIPr

Foram realizadas experiências para se determinar a turbidez de diversas composições farmacêuticas contendo a BIPr. Neste contexto, o termo turbidez designa a tendência das composições farmacêuticas no sentido do desdobramento (isto é, perda da estrutura proteica terciária) e/ou a formação de partículas (interações entre proteínas individualizadas que vão formar partículas de grandes dimensões (> 10µm)). As composições farmacêuticas testadas continham qualquer uma das substâncias BIPr(1-199), BIPr(I-199)ala¹⁹⁸ ou BIPr(1-193)ala¹⁹⁹, quer em tampão citrato (citrato de sódio 20 mM/cloreto de sódio 150 mM a pH 5,0) quer num tampão citrato que continha 0,1 % de poloxâmero 188 (um agente tensioactivo poloxamérico constituído por um copolímero de blocos de polioxipropileno-polioxietileno) e 0,002 % de polissorbato 80 (um agente tensioactivo polissorbato constituído por um éster de um ácido gordo de polioxietileno-sorbitano). Conforme se disse antes, a utilização de uma combinação de sistemas tensioactivos do tipo poloxâmero/polissorbato estabiliza as composições farmacêuticas, conforme preceituado no pedido de patente de invenção norte-americana co-penaente, de que os requerentes são co-proprietários, com o número de série 08/012.360, depositado a 2 de Fevereiro de 1993 e publicado como sendo a patente de invenção WO 94/17819 (pedido de patente de invenção europeia n° 94907963.6) da autoria de McGregor et al.

Efectuou-se uma análise das amostras para se determinar a sua resistência à turbidez ao longo do tempo para valores crescentes da temperatura e alternativamente aos valores de pH 7,0 ou pH 5,0. Antes da análise, todas as

amostras foram diluídas até a uma concentração de 0,1 mg/mL quer em solução de fosfato de potássio 50 mM quer em tampão de citrato 20 mM a pH 7,0. As medições de turbidez foram obtidas colocando as amostras em cadinhos de quartzo utilizáveis num espectrofotômetro de tipo Shimadzu UV-160 UV-Vis (Shimadzu, Pleasanton, CA) equipado com o suporte de cadinhos com regulação de temperatura ligado a um dispositivo de banho de água recirculante. Depois de se colocar em equilíbrio o suporte dos cadinhos a temperatura pretendida (57 °C, 65 °C ou 85 °C, ver infra), mediu-se a absorvência a 290 nm para se confirmar que as amostras haviam sido diluídas para uma concentração correcta. Depois disto, efectuou-se a medição da absorvência das amostras a 353 nm de dois em dois minutos durante 1 hora para se determinar as variações de absorvência ao longo do tempo.

Os resultados estão apresentados na figura 7 em que o termo "formulado" se refere a um produto de BIPr em tampão de citrato que contém a combinação de poloxâmico/lipolissorbatato referida supra e o termo "não formulado" se refere aos compostos de BIPr em tampão de citrato por si só. Uma taxa reduzida de variação da turbidez (isto é, uma taxa baixa de aumento da absorvência ao longo do tempo) indica um aumento de estabilidade ao desdobramento e à formação de partículas. Conforme se observa na figura 7, a adição da combinação de agentes tensioactivos referida anteriormente origina um aumento de estabilidade (resistência à formação de partículas e ao desdobramento) para todas as composições testadas. Além disso, as substâncias BIPr(1-199)ala¹²² e (1-193)ala¹²³ revelaram uma resistência muitíssimo maior ao desdobramento e à formação de partículas, comparativamente com as composições de tipo natural, independentemente do facto de estar presente a combinação de agentes tensioactivos. Foram

obtidos resultados semelhantes trabalhando com os valores de pH 5,0 e 65 °C e pH 5,0 e 75 °C e 85 °C, respectivamente.

As composições com a combinação de agentes tensio-activos e/ou com a supressão do resíduo de cisteína revelaram sobretudo uma estabilidade bastante maior ao longo do tempo e em função dos aumentos de temperatura, comparativamente com as composições que não tinham nenhum agente tensioactivo e/ou que possuíam o arquétipo do terminal N da BIPr(1-199) de tipo natural.

B. Caracterizações de actividade in vitro

Determinou-se a actividade *in vitro* dos produtos de BPIr(1-199)ala¹³² mediante a ligação dos produtos ao LPS, pelo teste de inibição de LAL e pela potência bactericida dos produtos.

1. Ligação da BIPr(1-199)ala¹³² ao LPS

Recorreu-se a utilização de amostras (cada um com 20 µg a 60 µg) de lipopolissacárido da estirpe 0111-BA de *E. coli* ou do mutante Rd de 3. minnesota (Sigma Chemical, St. Louis, Mo) para se determinar a capacidade que têm os produtos de BIPr(1-199)ala¹³² para se ligarem ao LPS.

Reduziu-se o tamanho das amostras de LPS por fraccionamento, em conformidade com o protocolo de EGPA-DSS, tendo sido contrastada com prata para visualização ou então electrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (BA25, Schleicher and Schuell, , N.M.) com padrões adequados de pré-contrastação. A revelação das manchas do LPS foi obtida embebendo a membrana numa mistura

de Tris 50 mM, NaCl 0,2 M (STT; TBS em inglês) e albumina de soro de bovino (ASB) a uma concentração de 30 mg/mL a pH 7,4 durante 30 minutos e à temperatura de 37 °C. Depois efectuou-se a incubação das membranas numa solução que continha 2 a 4 µg de BIPr(1-199)ala¹³² purificada ou parcialmente purificada e uma proteína de contraprova (quer a BIPr(1-199) quer a holoproteína BIPr) durante 12 a 18 horas a uma temperatura entre 21 °C e 42 °C. A seguir à incubação efectuou-se a lavagem das membranas com STT-ASB. A solução foi substituída pelo menos três vezes ao longo de um período de 30 minutos. As membranas lavadas foram depois incubadas durante 3 horas numa solução de anti-BIPr(1-199) diluída a 1:1000 em STT que continha ASB na concentração de 1 mg/mL. A seguir efectuou-se a lavagem das membranas três vezes e fez-se a revelação utilizando o sistema de detecção quimioluminescente da Tropix Systems (Bedford, MA), em conformidade com as instruções do fabricante, utilizando para tal STP 5X e gelatina a 0,25 % (Bio-Rad) em vez de bloco 1.

Os resultados obtidos demonstram que a BIPr(1-199)ala¹³² se liga ao LPS fixado à nitrocelulose tão bem ou melhor do que a BIPr(1-199).

2. Ensaio de inibição do crescimento de *E. coli*

Realizou-se o ensaio de inibição do crescimento de *E. coli* em caldo de cultura para se determinar a potência bactericida dos produtos de BIPr, mediante o tratamento de *E. coli* com análogos de BIPr(1-199) ou de BIPr(1-199)ala¹³² e verificando a inibição do crescimento do caldo de cultura, o que serviu de parâmetro para medição da actividade bactericida. Utilizou-se nesta experiência uma estirpe "irregular" de *E. coli* com LPS de cadeia curta,

designada por J5 (é uma estirpe i 0111:B4 de *E. coli* menos mutante com UDP-4-epimerase). As células cresceram no meio que continha sais minerais, tamponado com trietanolamina (Simon, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 51: 877 (1964)) que faz com que o microrganismo de *E. coli* fique especialmente sensível à BIP. Efectuou-se a lavagem das células que foram novamente colocadas em suspensão numa solução de NaCl a 0,9 até se obter uma densidade aproximada de 5×10^8 células/mL.

Efectuou-se a incubação de aproximadamente 5×10^8 a 1×10^7 células de *E. coli* durante 30 a 60 r com análogos quer de BIPr(1-199) quer de BIPr(1-199)ala¹³², para uma concentração de 5 µg/mL numa solução tamponada (sais equilibrados de Hanks c 10 %, 4 mM de Tris 40-HCl, pH 7,5; 0,1 % de casaminoácidos) num volume entre 200 e 400 mL. Além disso, efectuou-se a experiência separadamente com análogos quer de BIPr(1-199) quer de BIPr(1-199)ala¹³² e com MgCl₂ 100 mM. A seguir a incubação efectuou-se a diluição das células em 10 volumes de caldo nutriente enriquecido com 0,9 % de NaCl. Os caldos de cultura foram depois verificados durante várias horas.

Os resultados obtidos demonstram que os análogos de BIPr(1-199)ala¹³² possuem uma actividade bactericida tão ou mais potentes do que a BIPr(1-199). A actividade bactericida dos dois análogos de BIPr(1-199)ala¹³² e de BIPr(1-199) foi reduzida, conforme estava previsto, pelo NaCl.

3. Ensaio de Inibição do LAL

Recorreu-se ao ensaio de inibição do LAL para se determinar a capacidade da BIPr(1-199)ala¹³² para se ligar ao LPS. Há um protocolo do ensaio de inibição do LAL que

foi descrita por Gazzano-Santoro em *Infect. Immun.*, 63: 4754-4761 (1992). Os resultados do ensaio de inibição do LAL demonstram que a BIPr(1-199)ala¹³² possui um valor CI-50 igual a 10 que é igual ao valor obtido para a BIPr(1-199). Esses dados indicam que o análogo compete tão bem como o produto da BIPr de tipo natural na ligação ao LPS.

C. Eficácia da BIPr(1-199)ala¹³² num modelo de endotoxemia letal com animais.

Utilizou-se um modelo de endotoxemia com animais para se avaliar a eficácia comprovativa das substâncias BIPr(1-199)ala¹³² e BIPr(1-199) contra o choque endotóxico.

Em murganhos da estirpe ICR (machos) injectou-se por via intravenosa actinomicina D à razão de 800 µg/kg e também uma endotoxina (estirpe 011:84 de *E. coli*) à razão de 0,5 µg/kg ou então 1,0 µg/kg. Imediatamente a seguir à injeção da endotoxina administrou-se aos murganhos por injeção por via intravenosa as substâncias BIPr(1-199) ou BIPr(1-199)ala¹³² (nas doses de 0,5 mg/kg ou de 5,0 mg/kg). Utilizou-se como contraprova o veículo tamponado. Depois efectuou-se a contagem dos animais mortos ao longo de um período de 7 dias. Os resultados obtidos estão agrupados no quadro VI subsequente.

QUADRO VI

	Dose de BIP	Nº de animais mortos/nº total de animais	Mortalidade (%)
Apenas turpão	0	14/15	93
BIP ₁₂₃	0,5 mg/kg	7/15	47
	5,0 mg/kg	8/15	53
BIP ₁₂₃ -cis	0,5 mg/kg	14/15	93
	5,0 mg/kg	8/16	50

Conforme se conclui do quadro VI, qualquer das substâncias BIP₁₂₃(1-199)ala¹³² e BIP₁₂₃(1-199) proporcionou uma protecção significativa contra os efeitos letais da endotoxina. Embora a presente Invenção tenha sido descrita em termos das suas variantes preferenciais, qualquer especialista na matéria conclui que há inúmeras modificações e substituições que estão dentro do âmbito dos preceitos aqui descritos. Por exemplo, a invenção contempla a substituição do resíduo de cisteína na posição 132 ou na posição 135 do fragmento do terminal N da BIP com outros aminoácidos não polares diferentes da alanina ou da serina. Assim, o $\rightarrow$ da presente invenção fica definido pelas reivindicações anexas e de todas as correções futuras que lhe vierem a ser feitas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTES: Theofilan, Georgia
Horwitz, Arnold
Burke, David
Maltsian, Manik
Gringe, Lynn S

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: "Produtos estáveis de proteínas bactericidas indutoras da permeabilidade e composições farmacêuticas que os contêm"

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 14

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) ENDEREÇO: Marshall, O'Toole, Gerstein, Murray
& Bicknell
(B) RUA: Two First National Plaza
(C) CIDADE: Chicago
(D) ESTADO: Illinois
(E) PAÍS: E.U.A.
(F) CÓDIGO POSTAL: 60603

(v) FORMA LEGÍVEL POR COMPUTADOR:

(A) SUPORTE: disquete
(B) COMPUTADOR: compatível com PC da IBM
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) PROGRAMA INFORMÁTICO: Patent In Release #1.0,
Versão #1.25

(vi) DADOS ACTUAIS DO PEDIDO:

(A) NÚMERO DO PEDIDO:

(B) DATA DE DEPÓSITO:

(C) CLASSIFICAÇÃO:

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE O REPRESENTANTE/AGENTE:

(A) NOME: Meyers, Thomas C.

(B) NÚMERO DO PEDIDO: P-36.989

(C) REFERÊNCIA/ETIQUETA DO PROCESSO: 27129/30911

(ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:

(A) TELEFONE: 312/346-5750

(B) TELEFAX: 312/346-9740

(C) TELEX: 25-3856

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:1:

(1) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 1813 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNC

(ix) PARTICULARIDADE:

(A) NOME/CÓDIGO: mat peptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 124..1491

(x1) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 1:

CAGGCTTTCG TTTTTCCTCA GTCTCTGAGG ATG ASA CAG AAC ATG GTC AGG GGC 34
 Met Arg Glu Asn Met Ala Arg Glu
 -31 -30 -28

 CCT TCC AAC GCG CGG AGA TGG CTG TCC CTG ATG GTG CTC CTC GGC ATA 102
 Pro Glu Asn Ala Pro Arg Trp Val Ser Leu Met Val Leu Val Ala Ile
 -20 -15 -10
 GCG AGC GCG CTG ACA GCG GGT CTG AAC CCT GGC CTC GTG GTC AAG ATC 150
 Glu Trp Ala Val Trp Ala Ala Val Asn Pro Glu Val Val Val Arg Ile
 -5 1 5
 TCC CAG AAG GCG CTG GAG TAC GTC AGC CAG CAG GCG AGG GCG GGT CTG 198
 Ser Gln Lys Glu Leu Asp Tyr Ala Ser Gln Glu Glu Trp Ala Ala Leu
 10 15 20 25
 CAG AAG GAG CTG AGG AGG ATC AAG ATT CCT GAG TAC TCA GAC AGC TTT 246
 Gln Lys Glu Leu Lys Arg Ile Lys Ile Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Phe
 30 35 40
 AAG ATC AAG CAT CTT GCG AAG GCG CAT TAT AGC TTC TAC AGC ATG GAC 294

 ATC CTT GAA TCC CAG CTT CCC AAT TCC CAG AAT AGC ATG GTG CCC AAT 342
 Ile Arg Glu Phe Gln Leu Pro Ser Ser Gln Ile Ser Met Val Pro Asn
 60 65 70
 CTG GCG CTT AAG TTC TCC ATC AGC AAC GCT AAT ATC AAG ATC AGC GCG 390
 Val Glu Leu Lys Phe Ser Ile Ser Asn Ala Asn Ile Lys Ile Ser Glu
 75 80 85
 AAA TCG AAG GCA CAA AAG ACA TTC TTA AAA ATG AGC GCG AAT TTT GAC 438
 Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys Met Ser Glu Asn Phe Asp
 90 95 100 105
 CTG AGC ATA GAA GCG ATG TCC ATT TCG GCT GAT CTG AAG CTG GCG AAT 486
 Leu Ser Ile Glu Glu Met Ser Ile Ser Ala Asp Leu Lys Leu Glu Ser
 110 115 120
 AAC GCG AGG TCA GCG AG CCC AGC AGC AGC TCC TCC AGC TCC AGC AGC 534

AGG Pro Thr Ser Gln Lys Pro Thr Ile Thr Cys Ser Ser Cys Ser Ser	
125 130 135	
CAC ATC AAC ACT CTC CAC CTC CAC ATC TCA AAG AGC AAA GTC GGG TGG	582
His Ile Asn Ser Val His Val His Ile Ser Lys Ser Lys Val Gln Trp	
140 145 150	
CTG ATC CAA CTC CTC CAC AAG AAA ATT CAG TCT GCG CTT CCA AAC AAG	630
Leu Thr Gln Leu Phe His Lys Lys Ile Gln Ser Ala Leu Arg Arg Lys	
155 160 165	
ATG AAC ACC CAG CTC TGC CAG AAG CTC ACC AAT TCT GTA TCT TCC AAG	678
Met Asn Ser Gln Val Cys Gln His Val Thr Asn Ser Val Ser Ser His	
170 175 180 185	
Cys CAA CCT TAT TAC CAG ACT CTC GCA GTA ATG ACC AAA ATA GAT TCT	726
Leu Gln Pro Tyr Phe Gln Thr Leu Pro Val Met Tyr Lys Ile Asp Ser	
190 195 200	
CTG GCT GGA ATC AAC TAT GGT CTC GTC GCA GGT CCA GCA ACC ACC GGT	774
Val Ala Gln Ile Asn Tyr Gln Leu Val Ala Pro Pro Ala Thr Thr Ala	
205 210 215	
GAG ACC CTC GAT GTA CAG ATG AAG GCG GAG TTT TAC ACT GAG AAC CAC	822
Gln Tyr Leu Asp Val Gln Met Lys Gln Gln Phe Tyr Ser Glu Asn His	
220 225 230	
CAC AAT CCA GGT GCG TTT GCT GGA CCA GTC ATG GAG TTT GCG GGT GCC	870
His Asn Pro Phe Pro Phe Ala Pro Pro Val Met Glu Phe Pro Ala Ala	
235 240 245	
GAT GAC GGC ATG GTA TAC CTC GGC CTC TCA GAG TAC TTC TTC AAC ACA	918
His Asp Arg Met Val Tyr Leu Gln Leu Ser Asp Tyr Phe Phe Asn Thr	
250 255 260 265	
GCG GCG GTT GTA TAC CAA GAG CTT GCG CTC TTT AAG ATG ACC CTT ACA	966
Ala Gln Leu Val Tyr Gln Glu Ala Gln Val Leu Lys Met Thr Leu Arg	
270 275 280	
GAT GAC AAT ATT CCA AAG GAG TCT AAA TTT CCA CTC ACA ACC AAG TTC	1014
Asp Asp Met Ile Pro Lys Gln Ser Lys Phe Arg Leu Thr Thr Lys Phe	

TTT GGA ACC TTT CTA CTT GAG GAG GGC AAG AAG TTT CCC AAC ATG AAG 1082
 Phe Glu Trp Phe Leu Pro Glu Val Ala Lys Lys Phe Pro Asn Met Lys
 300 303 313

ATA CAG ATC CAT GTC TCA GGC TGC ACC CGC CCA CAC CTC TCT GTG CAG 1110
 Ile Glu Ile His Val Ser Ala Ser Trp Pro Pro His Leu Ser Val Glu
 313 320 323

CCG ACC GGC CTT ACC TTT TAC CTT GGC GTG CAT GTC CAG GCC TTT GTC 1138
 Pro Trp Glu Leu Trp Phe Trp Pro Ala Val Asp Val Glu Ala Phe Ala
 330 333 340 343

GTC CTC CCC AAC --- TCC CTC GCT TCC CTC TTC CTC ATT GGC ATG CAC 1206
 Val Leu Pro Asn Ser Ser Leu Ala Ser Leu Phe Leu Ile Glu Met His
 350 355 360

ACA ACT GGT TCC ATG GAG GTG ACC GGC GAG TCC AAC AAG GTT GTT GGA 1234
 Trp Trp Glu Ser Met Glu Val Ser Ala Glu Ser Asn Arg Leu Val Glu
 365 370 375

GAG CTC AAC CTG CAT AGG CTG CTC CTC GAA CTC AAG CAC TCA AAT ATT 1302
 Glu Leu Ile Leu Asp Arg Leu Leu Leu Glu Leu Lys His Ser Asn Ile
 380 383 390

GGC CCC TTC CCG GTT GAA TTT CTC CAG CAT ATC ATG AAC TAC ATT GTA 1330
 Glu Pro Phe Pro Val Glu Leu Leu Glu Asp Ile Met Asn Trp Ile Val
 395 400 405

CCC ATT GTT CTC CTC CCC AGG GTT AAC GAG AAA CTA CAG AAA GGC TTC 1398
 Pro Ile Leu Val Leu Pro Arg Val Asn Glu Lys Leu Glu Lys Glu Phe
 410 413 420 423

CTT CTC CCG ACC CCG GGC AGA CTC CAG CTC TAC AAC GTA CTC CTT CAG 1446
 Pro Leu Pro Trp Pro Ala Arg Val Glu Leu Trp Asn Val Val Leu Glu
 430 433 440

CTT CAC CAG AAC TTC CTC CTC TTC GGT GCA GAC GTT GTC TAT AAA 1491
 Pro His Glu Asn Phe Leu Leu Phe Glu Ala Asp Val Val Trp Lys
 443 450 453

TGAACGACAC AGAGATGCGG GAGAGTGTCA GAGGACATTA TTGCTGATAG AGCTGTATGAC 1551

```

ACCGGCTGCTT TTTCCTCAGG GAATGCTCTC CAGATCTTAA CCGAGAGCTT CTTGCACACT 1611
TCTTCGACTC AGATTGAGAA ATGATCTAAN CAGGAGGAAA CATTATTCAT TCGGAAAGTG 1621
CATGCTCTCT ATTTTACGGA TTATGAGCTT CTTTCAAGG CTAAGGCTCT ACACATATT 1731
CCTUCAGGAA TGGTGTCTTA ATTGTAGCA AGAATTTCG ATTGTGCTT CATTGAAAAA 1791
AAGTCTGCTT TTTTCTGATG TG                                     1813

```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) CONTEÚTO: 487 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NU: 2:

```

Met Arg Gln Asn Met Ala Arg Gln Phe Cys Asn Ala Phe Arg Trp Val
-31 -30 -25 -20
Ser Leu Met Val Leu Val Ala Ile Gln Trp Ala Val Trp Ala Ala Val
-15 -10 -5 1
Asn Pro Gln Val Val Val Arg Ile Ser Gln His Gln Leu Asp Tyr Ala
5 10 15
Ser Gln Gln Gln Trp Ala Ala Leu Gln His Gln Leu His Arg Ile His
20 25 30
Ile Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Phe Lis Tle His His Leu Gln His Gln
35 40 45
His Tyr Ser Phe Met Ser Met Asp His Arg Glu Phe Gln Leu Pro Ser
50 55 60 65
Ser Gln Ile Ser Met Val Phe Asn Val Gln Leu His Phe Ser Ile Ser
70 75 80
Asp Ala Asn Ile His Ile Ser Gln His Trp His Ala Cys His Arg Phe
85 90 95
Leu His Met Ser Gln Asn Phe Asp Leu Ser Ile Gln Gln Met Ser Ile
100 105 110
Ser Ala Asp Leu His Leu Gln Ser Asn Pro Trp Ser Gln His Pro Trp
115 120 125
Ile Trp Ser Ser Ser Cys Ser Ser His Ile Asn Ser Val His Val His
130 135 140 145

```

Ile Ser Lis Ser Lys Val Gln Tyr Leu Ile Gln Leu Phe His Ala Lys
 150 155 160
 Ile Glu Ser Ala Leu Arg Asp Lys Met Asn Ser Gln Val Cys Glu Lys
 165 170 175
 Val Thr Asn Ser Val Ser Ser Lys Leu Gln Pro Tyr Phe Gln Thr Leu
 180 185 190
 Pro Ala "e- ?-e h~ ~-e Asn Ser Ia? Ala Gln Ile Asn -ir Gln LE.~
 195 200 205

Val Ala Phe Pro Ala Thr Thr Ala Gln Tyr Leu Asp Val Gln Met Lys
 210 215 220 225
 Gln Gln Phe Tyr Ser Glu Asn His His Asn Pro Pro Phe Phe Ala Pro
 230 235 240
 Pro Val Met Glu Phe Pro Ala Ala His Asp Arg Met Val Tyr Leu Gln
 245 250 255
 Leu Ser Asp Tyr Phe Phe Asn Thr Ala Gln Leu Val Tyr Gln Glu Ala
 260 265 270

Gln Val Asn Lys Met Thr Leu Arg Asp Asp Met Gln Pro Lys Glu Ser
 275 280 285
 Lys Phe Arg Leu Tyr Thr Lys Phe Phe Gln Thr Phe Lys Pro Glu Val
 290 295 300 305
 Ala Lys Lys Phe Pro Asn Met Lys Ile Gln Ile His Val Ser Ala Ser
 310 315 320
 Thr Pro Pro His Leu Ser Val Gln Pro Thr Gln Leu Thr Phe Tyr Pro
 325 330 335

Ala Val Asp Val Gln Ala Phe Ala Val Leu Pro Asn Ser Ser Leu Ala
 340 345 350
 Ser Leu Phe Leu Ile Gln Met His Thr Thr Gln Ser Met Glu Val Ser
 355 360 365

Ala Gln Ser Asn Arg Leu Val Gln Gln Leu His Leu Asp Arg Leu Leu
 370 375 380 385
 Leu Gln Leu Lys His Ser Asn Ile Gln Pro Phe Pro Val Gln Leu Leu
 390 395 400
 Gln Asp Ile Met Asn Tyr Ile Val Pro Ile Leu Val Leu Pro Arg Val
 405 410 415
 Asn Gln Lys Leu Gln Lys Gln Phe Pro Leu Pro Tyr Pro Ala Arg Val
 420 425 430

Gln Leu Tyr Asp Val Val Leu Gln Pro His Gln Asn Phe Leu Leu Phe
 435 440 445
 Gln Ala Asp Val Val Tyr Lys
 450 455

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO: 3:

(1) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 25 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNC

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 3:

AAGCTTGTCTG ACCAGGCCTT GAGGT 25

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO: 4:

(1) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNC

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 4:

CTGGAGGCGG TGATGGTG 18

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO: 5:

(1) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 19 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 5
gggagagggg ggggggac 19

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO: 6

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CORDÃO: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 6:
gAACTTGgTT gTCAGTCG 18

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 13 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CORDÃO: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 7:
gggaggggca TGG 13

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 27 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CORDÃO: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 8:

ACTGTCCGACG CCACCATCGG CAGGGGC 27

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 27 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CORDÃO: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIÇÃO TUA SEQUÊNCIA: SEQ ID NG: 9:

CCGCGGCTCG AGGTATATTT TGGTCAS 27

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 16 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CORDÃO: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 10:

CTGTAGCTCG ACCCGC 16

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO: 11:

(1) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 17 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORÇÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 11:

GGCTCGAGCT ACAGAGT 17

(2) INFORMAÇÃO PARA 4 SEQUÊNCIA ID NO: 12:

(1) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(R) COMPRIMENTO: 25 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 12:

GTCTGACCATCGGAGAGAAACATGGC 15

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO: 13:

(1) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(11) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(x1) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 13:

GACGCCACCA TGGTC 15

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO: 14:

(1) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(11) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(x1) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 14:

GACCATGGTG GCGTC 15

Lisboa, 28 de Agosto de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína bactericida indutora da permeabilidade com a SEQ ID NO: 2, caracterizada pelo facto de o resíduo de aminoácido na posição 185 se seleccionar entre lisina ou ácido glutâmico ou um seu fragmento com actividade bactericida indutora da permeabilidade, em que um resíduo de cisteína na posição 132 está substituído por um aminoácido diferente.
2. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender os 193 resíduos aos aminoácidos iniciais com terminal amino da proteína bactericida indutora da permeabilidade.
3. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender os 199 resíduos dos aminoácidos iniciais com terminal amino da proteína bactericida indutora da permeabilidade.
4. Composição farmacêutica caracterizada pelo facto de compreender um polipéptido de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3 e um diluente, adjuvante ou veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.
5. Composição farmacêutica compreendendo uma proteína bactericida indutora da permeabilidade ou um seu fragmento com actividade bactericida indutora da permeabilidade, em que um resíduo de cisteína correspondendo à posição 132 da SEQ ID NO: 2 está substituído por um aminoácido diferente e um diluente, adjuvante ou veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, caracterizada pelo facto de se destinar a ser utilizada no tratamento de infeções bactericidas gram-negativas.

e as suas sequelas, incluindo choque relacionado com endotoxinas e uma ou mais afecções associadas a ela, incluindo coagulação intravascular disseminada, anemia, trombocitopénia, leucopénia, síndrome de distúrbio respiratório do adulto, insuficiência renal, hipotensão, febre e acidose metabólica.

6. Composição farmacêutica compreendendo uma proteína de fusão híbrida e um diluente, adjuvante ou veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico em que a proteína de fusão híbrida compreende, no seu terminal amino, uma proteína bactericida indutora da permeabilidade ou um seu fragmento com actividade bactericida indutora da permeabilidade, em que um resíduo de cisteína correspondendo à posição 132 da SEQ ID No: 2 está substituído por um aminoácido diferente e, no seu terminal carboxilo, pelo menos um domínio constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina ou uma sua variante alélica, caracterizada pelo facto de a composição farmacêutica se destinar a ser utilizada no tratamento de infecções bactericidas gram-negativas e as suas sequelas, incluindo choque relacionado com endotoxinas e uma ou mais afecções associadas a ela, incluindo coagulação intravascular disseminada, anemia, trombocitopénia, leucopénia, síndrome de distúrbio respiratório do adulto, insuficiência renal, hipotensão, febre e acidose metabólica.

7. Utilização da composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizada por se destinar à produção de um medicamento para o tratamento de infecções bactericidas gram-negativas e as suas sequelas, incluindo choque relacionado com endotoxinas e uma ou mais afecções associadas a ela, incluindo

coagulação intravascular disseminada, anemia, trombocitopenia, leucopenia, síndrome do distúrbio respiratório do adulto, insuficiência renal, hipotensão, febre e acidose metabólica.

8. ADN caracterizado pelo facto ao codificar um polipeptido de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 1.
9. ADN que codifica para uma proteína bactericida indutora da permeabilidade da SEQ ID No: 2, caracterizado pelo facto de um resíduo de aminoácido, na posição 185, ser seleccionado entre uma lisina ou um ácido glutâmico ou um seu fragmento que tenha actividade bactericida indutora da permeabilidade, em que um resíduo de cisteína correspondendo à posição 132 está substituído por um aminoácido diferente.
10. ADN que codifica uma proteína bactericida indutora da permeabilidade da SEQ ID No: 2 ou um seu fragmento com actividade bactericida indutora da permeabilidade, caracterizado pelo facto de um resíduo de cisteína correspondendo a posição 132 estar substituído por um aminoácido diferente e em que o codão para o resíduo de valina na posição 151 se selecciona entre STC ou GTG.
11. ADN que codifica para a sequência líder de 11 aminoácidos e para os primeiros 193 resíduos de terminal N de uma proteína bactericida indutora da permeabilidade, em que um resíduo de cisteína correspondendo à posição 132 da SEQ ID No: 2 está substituído por um aminoácido diferente, caracterizado pelo facto de o ADN ter um codão de paragem que se segue imediatamente ao codão para o resíduo de leucina que corresponde à posição 193 da SEQ ID No: 2 e em que

a sequência que codifica para os primeiros quatro aminoácidos da sequência líder de 31 aminoácidos foi eliminada.

ADN que codifica para a sequência líder de 31 aminoácidos e os primeiros 199 resíduos de terminal N de uma proteína bactericida indutora da permeabilidade, em que um resíduo de cisteína correspondendo à posição 132 da SEQ ID No: 2 está substituído por um aminoácido diferente, caracterizado pelo facto de o ADN ter um codão de paragem que se segue imediatamente ao codão para o resíduo de isoleucina que corresponde a posição 199 da SEQ ID No: 2 e em que a sequência que codifica para os primeiros quatro aminoácidos da sequência líder de 31 aminoácidos [?] foi eliminada.

Vector de ADN de replicação autónoma caracterizado pelo facto de compreender um ADN que codifica para uma proteína bactericida indutora da permeabilidade ou um seu fragmento com actividade bactericida indutora da permeabilidade, em que um resíduo de cisteína correspondendo a posição 132 da SEQ ID No: 2 está substituído por um aminoácido diferente em que o vector compreende ainda um gene marcador selectivo.

14. Célula hospedeira de OHC transformada ou transfectada de forma estável com um ADN que codifica uma proteína bactericida indutora da permeabilidade ou um seu fragmento com actividade bactericida indutora da permeabilidade, caracterizada pelo facto de um resíduo de cisteína correspondendo à posição 132 da SEQ ID No: 2 estar substituído por um aminoácido diferente, de uma forma que permita a expressão do referido polipéptido na referida célula hospedeira.

15. Célula hospedeira da OHC, de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo facto de se seleccionar entre as células OHC-K1 (ATCC CCL-61), OHC-DS44 ou OHC-DX5-11.
16. Célula de insecto transformada ou transfectada de forma estável com um ADN que codifica uma proteína bactericida indutora da permeabilidade ou um seu fragmento com actividade bactericida indutora da permeabilidade, caracterizada pelo facto de um resíduo de cisteína correspondendo à posição 132 da SEQ ID No: 2 estar substituído por um aminoácido diferente, de uma forma que permita a expressão do referido polipéptido na referida célula hospedeira.

Lisboa, 28 de Agosto de 2007

FIGURA 1

Gel para EGPA-DSS com BIP_{r23} contrastado com o corante azul de Coomassie lote BH210001

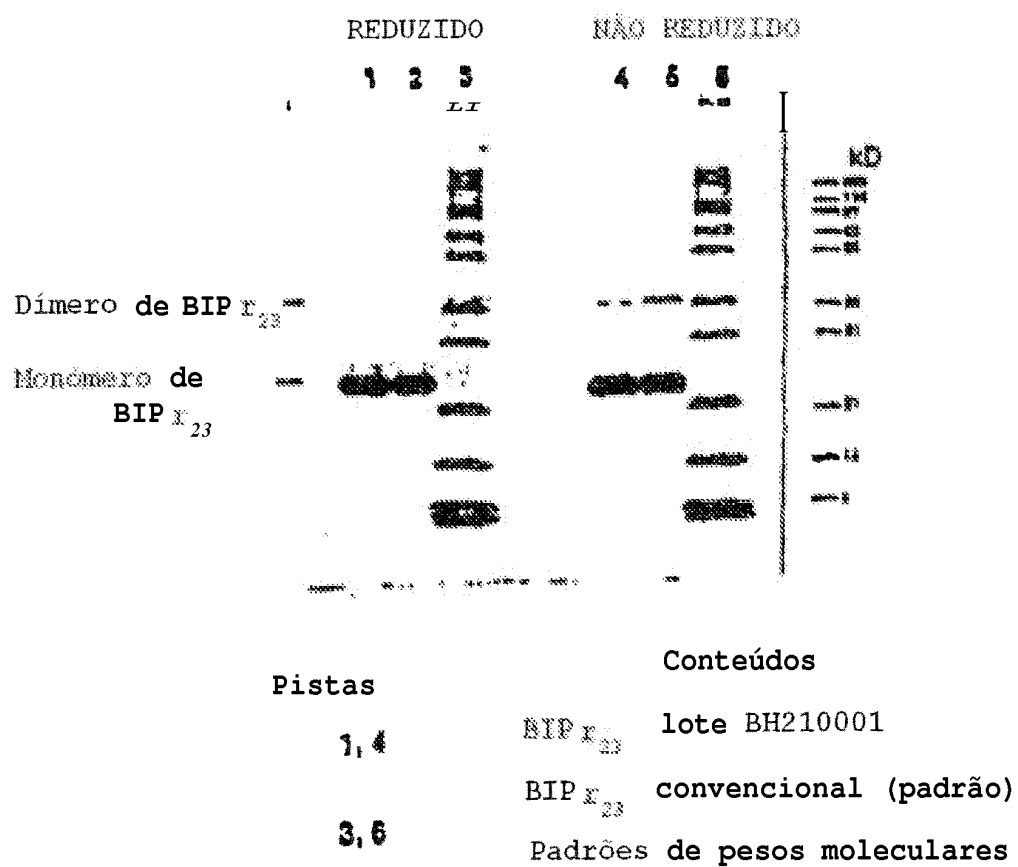
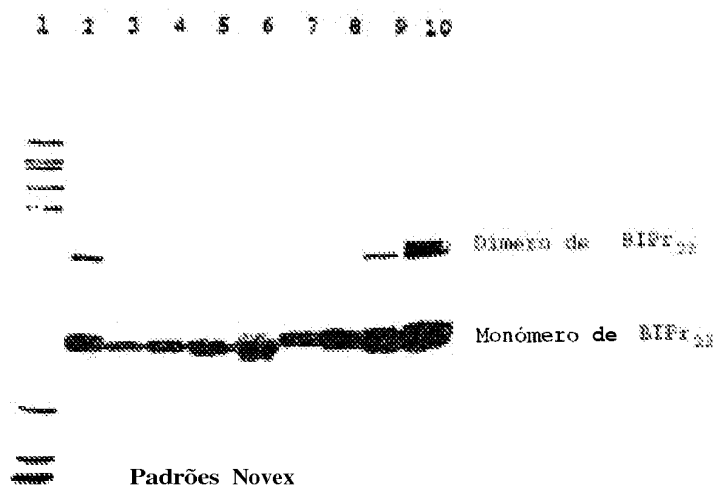


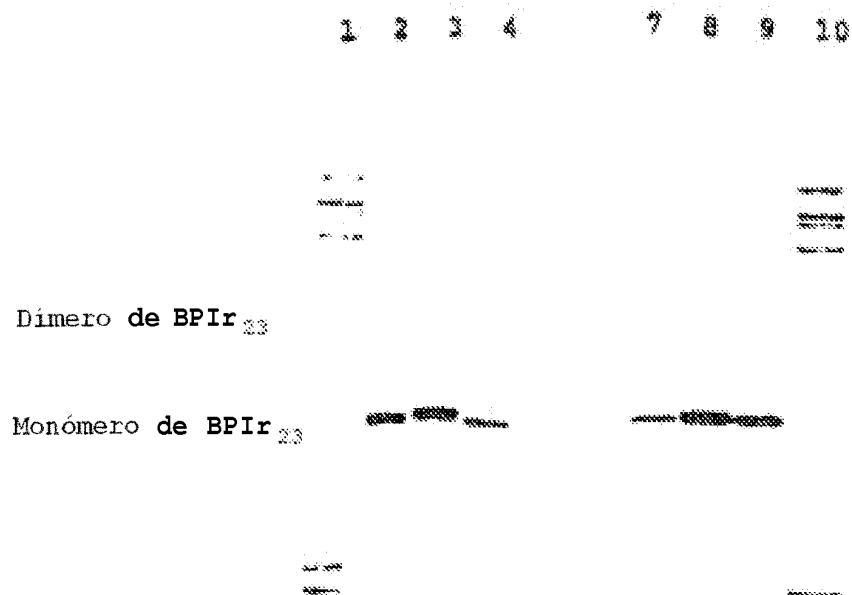
FIGURA 2



Legenda:

- 1 *
- 2 = BIPr₂₃ lote 853-873/882255 2.6 ug.
- 3 = C132A, 1 ug
- 4 = C132A, 2 ug
- 5 = C132A, 4 ug
- 6 = C132A, 6 ug
- 7 = BIPr₂₃ amostra BR-1, 1.8 ug
- 8 = BIPr₂₃ amostra BR-1, 3.7 ug
- 9 = BIPr₂₃ amostra BR-1, 6.4 ug
- 10 = BIPr₂₃ amostra BR-1, 9.2 ug

FIGURA 2 (continuação)



Legenda:

- 1 * Padrões Novex
- 2 * BPIr₂₃ lote R53-R73/NS2255
- 3 ■ BPIr₂₃ lote BR-1
- 4 * C132A, lote 8166
- 1-4 Não reduzido
- 7 * C132A lote 8166
- 5 * BPIr₂₃ lote BR-1
- 9 ■ BPIr₂₃ lote R53-R73/NS2255
- 10 r Padrões Novex
- 7-9 Reduzido

FIGURA 3

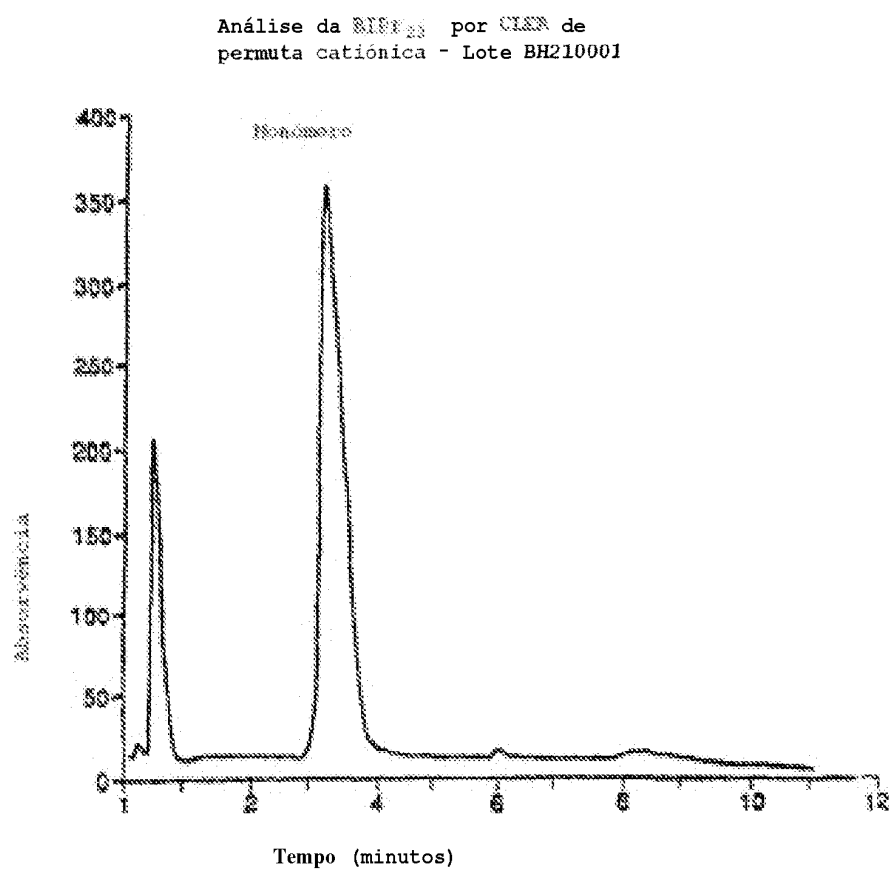


FIGURA 4

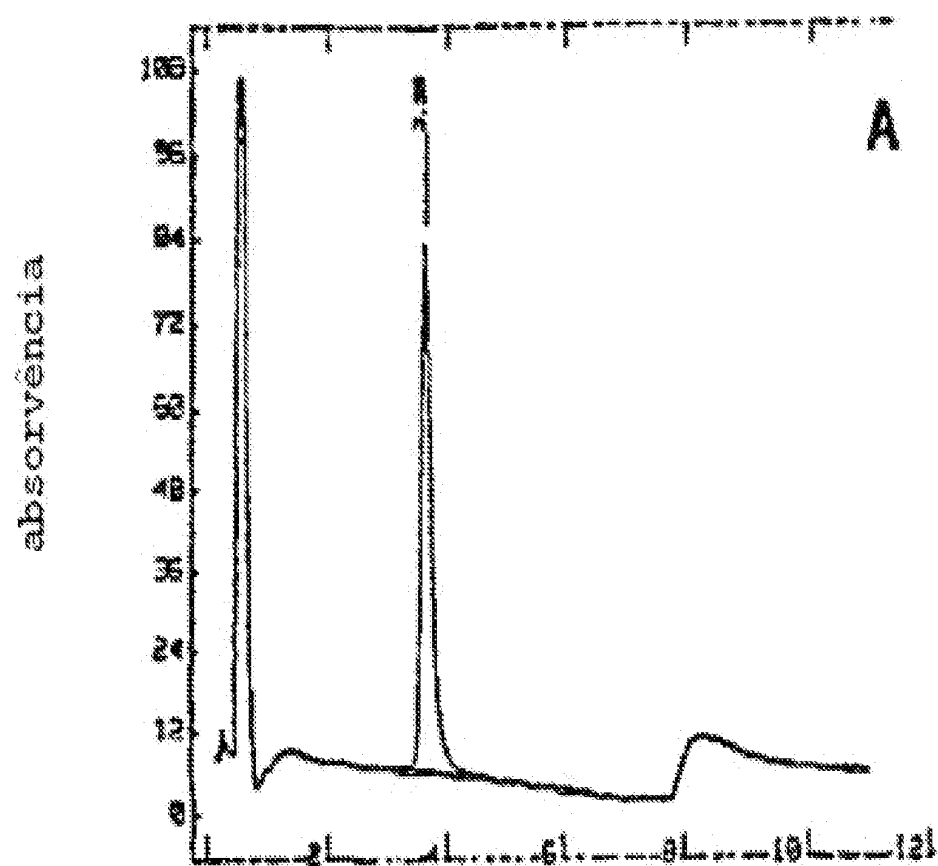


FIGURA 5

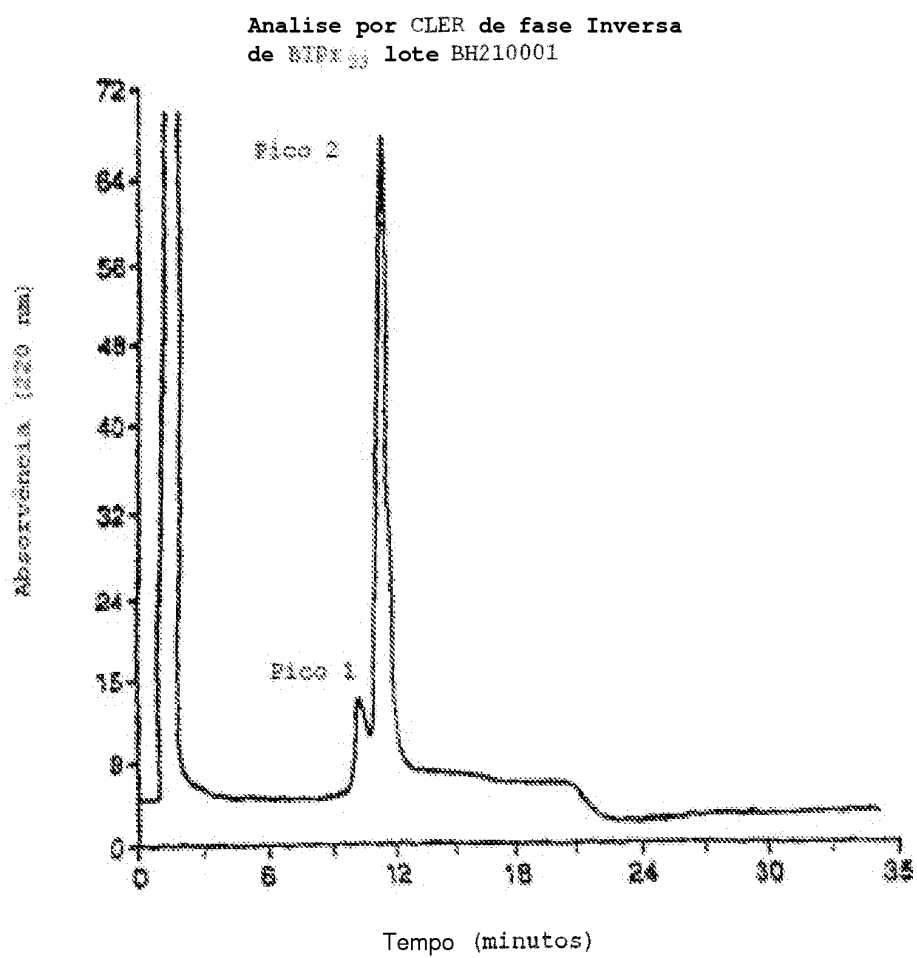


FIGURA 6

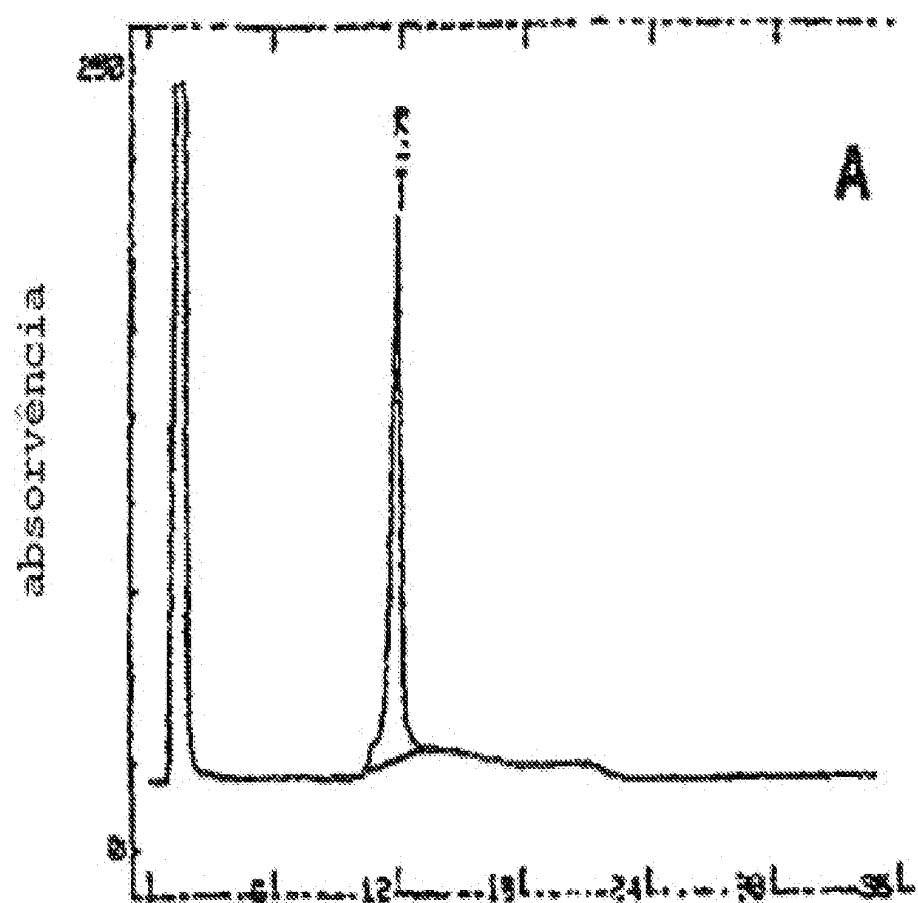


FIGURA 7

