

80758



MEMÓRIA DESCRIPTIVA

Resumo

São proporcionados métodos para a purificação de uma proteína identificada como factor de necrose tumoral a partir de fontes não recombinantes e recombinantes e para a preparação de ácido nucleico codificador deste factor de necrose tumoral e sua expressão em hospedeiros recombinantes. Este factor de necrose tumoral é usado no tratamento terapêutico de tumores malignos, sózinho ou em combinação sinergística com um interferão. É também referido o processo para a preparação de composições contendo o referido factor de necrose tumoral. O método para a preparação do factor de necrose tumoral consiste essencialmente em se partir de uma mistura com outras proteínas, se

=====

GENENTECH , INC .

"MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE FACTOR DE NECROSE TUMORAL"



fazer a adsorção do factor de necrose tumoral de tal mistura sobre uma substância hidrofóbica seguido de eluição do factor de necrose tumoral dessa substância.

Este pedido de patente relaciona-se com linfocinas . Em particular , está relacionado com factores citotóxicos secretados pelas células linfáticas e métodos para produzir os mesmos em células recombinantes.

Sabe-se que as células do sistema imune , como sejam as células B , células T , células assassinas naturais ("natural Killer cells") e macrófagos , elaboram substâncias que exercem actividade citotóxica contra células tumorais mas que são inócuas para as células normais . Estas substâncias têm sido designadas de modo variado , por exemplo , linfotoxina , factor de necrose tumoral , factor citotóxico de células NK , factor de necrose hemorrágica , citotoxino de macrófagos ou factor citotóxico de macrófagos . Neste momento não são claras as identidades das proteínas associadas a estes nomes . As principais dificuldades têm residido nos ensaios biológicos empregues para detectar as proteínas que não discriminam umas das outras , as proteínas parecem encontrar-se na natureza como agregados ou produtos hidrolíticos e as quantidades até aqui obtidas têm sido muito pequenas de tal modo que o grau de purificação necessário à caracterização completa das proteínas não foi atingido.



Tipicamente tais substâncias cito-tóxicas encontram-se no soro de animais ou em sobrenadantes de culturas de células ou linhas celulares linfáticas após os animais ou células terem sido tratados com uma substância que se sabe estimular a proliferação de células imunes (um "inclutor"). Depois disto o soro ou sobrenadante é recuperado e testado relativamente à actividade citotóxico contra uma linha de células tumorais alvo. Um alvo normalizado é L-929, uma linha celular tumoral murina. Esta linha celular e outras usadas em biotestes deste tipo não são específicas na sua resposta lítica porque uma variedade de produtos de células linfáticas aparentemente discretos são capazes de efectuar a lise. Respostas semelhantes não específicas são observadas em ensaios de necrose tumoral in vitro. Assim, os ensaios citoléticos que permitem observar a lise de linhas celulares in vitro ou necrose tumoral in vivo são inadequados para distinguir os vários produtos linfáticos citotóxicos.

Tem-se feito tentativas para classificar os factores citotóxicos com base nas células linfáticas em que são induzidos. Por exemplo linfotoxina é um nome vulgarmente aplicado ao produto de secreção citotóxicos dos linfócitos B ou T, ou linhas celulares deles derivadas, enquanto que o factor de necrose tumoral é muitas vezes usado para descrever produtos citotóxicos de macrófagos ou linhas celulares deles derivados. Este sistema de classificação, no entanto, não foi desenvolvido até ao ponto em que há segurança de que apenas uma única proteína está a ser referida ou que as proteínas referidas por nomes diferentes sejam de facto diferentes.

Têm sido feitas tentativas para purificar e caracterizar os factores citotóxicos secretados por cada tipo de células. Se atendermos ao grau de variação das comunicações quanto a uma propriedade de um factor citotóxico ou à completa inconsistência para uma dada



4.

propriedade , pode-se concluir ou que a caracterização estava errada ou que uma pluralidade de factores citotóxicos discretos são secretados por cada tipo celular . Por exemplo , os produtos citotóxicos derivados de macrófagos , monócitos ou linhas celulares monocíticas , se bem que algumas vezes referidos de um modo geral com factor de necrose tumoral , tem-se divulgado terem propriedades que parecem inconsistentes com uma teoria de um único produto citotóxico . Ver por exemplo a seguinte literatura : R. Mac. Farlan et al. , 1980, "AJEBAK" 58 (pts) : 489 - 500 ; D. Mannel et al. , 1980 , "Infection and Immunology" 30 (2) : 523 - 530; H. Ohnishi et al. , pedido de patente U. K. 2 106 117 A ; e J. Hammesstrom , 1982 , "Scandy . Immunol." 15 : 311 - 318.

Por outro lado , C. Zacharchuk et al. , 1983 , "Proc. Nat. Acad. Sci. USA" , 80 6341-6345 sugeriram que a linfoxina de porquinho da Índia é um factor citotóxico de macrófagos de porquinho da Índia são imunoquimicamente semelhantes , se não mesmo idênticos . Conclusões semelhantes são adiantadas em Ruff et al. , 1981 , Lymphokines Vol. 2 pp 235 - 272 em pp 241 - 242.

As tentativas de caracterização de factores citotóxicos imunes também foram feitas usando como material de partida o soro ou fluidos peritoneais de animais que tinham sido expostos a抗igénios imunogénicos . Estas fontes continha toda a cornucópia do sistema imune sob tensão em contraste com o produto ou produtos de um tipo ou linha celular único . Deve-se consultar o que se segue como exemplos de publicações deste tipo : S. Green et al. , 1982 , "J. Nat. Cancer Inst. " 68 (6) : 997 - 1003 ("factor inductor de necrose tumoral") ; M. Ruff et al. , 1980 , "J. Immunology" 125 (4) : 1671 - 1677 ("factor de necrose tumoral") : H. Enomoto et al. , Pedido de Patente Europeia 86475 ("substância antitumoral ") ; H. Oettgen et al. , 1980 , "Recent Results Cancer Res. " 75 : 207 - 212 ("factor de



5.

necrose tumoral") ; F. Kull et al., 1981 , "J. Immunol." 126(4) : 1279 - 1283 ("Citotoxina de Células Tumorais") ; D. Mannel et al., 1980 , "Infection and Immunity" 28(1) : 204 - 211 ("factor citotóxico") : N. Matthews et al., 1980 , "Br. J. Cancer" 42 : 416 - 422 ("factor de necrose tumoral") ; S. Green et al., 1976 , "Proc. Nat. Acad. Sci. USA" , 73(2) : 381 - 385 ("factor serológico") ; N. Samoti et al., 1981 , "Jpn J. Exp. Med." 51(6) : 317-322; N. Matthews , 1979 , "Br. J. Cancer" 40 : 534 - 539 ("factor de necrose tumoral") ; K. Haranaka et al., 1981, "Jpn J. Exp. Med." 51(3) : 191 - 194 ("factor de necrose tumoral") ; e L. Old et al., Pedido de Patente Europeia 90892 ; T. Umeda et al., 1983 , "Celular and Molecular Biobgy" 29(5) : 349 - 392 : e H. Enomoto et al., 1983 , Pedido de Patente Europeia 86475.

Ainda outra literatura que deverá ser consultada é J. Nissen - Mayer et al., 1982 , "Infection and Immunity" 38 (1) : 67 : 73 ; J. Klostergaard et al., 1981 , "Mol. Immunol." 18 (12) : 1049 - 1054 ; N. Sloane , patente U.S. 4 359415 : e H. Hayashi et al., patente U.S. 4 447 355 ; R. Kanamaka et al., 1983 , Pedido de Patente Europeia 90 892 ; e G. Granger et al., 1978 , "Cellular Immunology" 38 : 388 - 402 .

O Pedido de Patente Europeia Publ. Nº. 100 641 descreve um polipeptideo citotóxico que foi substancialmente purificado , sem impurezas , a partir de uma cultura de células linfoblastoides humanas . Este polipeptideo foi designado por linfotoxina se bem que a sua relação com outros polipeptideos citotóxicos divulgados com o nome de linfotoxina seja conjectural . Não se soube se este era o único polipeptideo elaborado pelas células imunes , como sugerido por Zacharchuk et al.,(Id) , ou se era um de uma potencial família de factores citotóxicos.

O polipeptido do Pedido de Patente



6.

100 641 tem duas terminações amínicas , uma variante maior terminando com Leu Prol Gli Val Glilen Tre Pro Ser Ala Ala Glu Tre Ala Arg Gln His Pro Lis Met His Leu Ala His Ser Tre ... e uma variante mais pequena com a terminação amínica truncada His Ser Tre Leu Sis Pro Ala Ala ...

Segundo a literatura existente os interferões , os quais apresentam alguma actividade inibidora de tumores e uma proteína mal caracterizada tendo uma terminação amínica Ala Ala (pedido de Patente U . K . Publ. Nº 2 117 385 A) , foram candidatos a factores citotóxicos não-linfotoxina . Como se verá , o factor de necrose tumoral deste invento não é um interferão , não é linfotoxina e não tem uma terminação amínica Ala Ala .

Constitui um objectivo do presente invento (a) determinar conclusivamente se existe ou não um outro factor de necrose tumoral que não seja linfotoxina e, se for caso , identificá-lo de modo a poder ser distinguido claramente desses outros factores , (b) produzir tal factor por outros métodos que não o de cultura celulares-induzidas, que é caro e dá produtos contaminados com o agente indutor , ou por indução de linfócitos do sangue periférico , o que é economicamente impraticável , pouco reproduzível e produz produto contaminado com proteínas hólogas celulares e do plasma ; (c) obter DNA codificador de tal factor de necrose tumoral e expressar o DNA em cultura recombinante ; (d) sintetizar tal factor na forma madura em cultura recombinante ; (e) modificar a sequência codificadora ou estrutura de tal factor ; (f) formular esse factor em formas de dosagem terapêuticas e administrar o mesmo a animais para tratamento de tumores ; (g) produzir reagentes de diagnóstico relacionados com o mesmo factor.

S U M Á R I O



Um factor citotóxico foi purificado até à homogeneidade , caracterizado e expresso em cultura recombinante . Este factor é designado por factor de necrose tumoral (TNF) por conveniência e é definido abaixo . É obtido numa forma substancialmente homogénea a partir de culturas celulares com uma actividade específica superior a cerca de 10 milhões de unidades /mg de proteína e normalmente com cerca de 100 milhões de unidades / mg .

O factor de necrose tumoral humano sintetizado em cultura recombinante é caracterizado pela presença de componentes celulares não humanos , incluindo proteínas , em quantidade e com características fisiológicamente aceitáveis para administração a pacientes necessitados do factor de necrose tumoral . Estes componentes são normalmente originários de leveduras , procariotas ou eucariotas superiores não humanos e presentes em quantidades contaminantes inócuas , na ordem de menos de cerca de 1 por cento por peso . Ainda , a cultura de células recombinantes permite a produção de factor de necrose tumoral absolutamente livre de proteínas homólogas . Proteínas homólogas são aquelas que estão normalmente associadas ao factor de necrose tumoral tal como se encontra na natureza , e.g. em células , exudados celulares ou fluidos corporais . Por exemplo , uma proteína homóloga para o factor de necrose tumoral é a albumina do soro humano . Proteínas heterólogas são o contrário , i.e. não estão naturalmente associadas ou encontradas em combinação com o factor de necrose tumular em questão.

É obtido DNA que codifica factor de necrose tumoral e que , quando expresso em cultura recombinante ou transformada , origina grandes quantidades de factor de necrose tumoral . Este DNA é novo porque o cDNA obtido por transcrição respeita do mRNA da linha celular monocítica induzida não possui intrões e está livre de quaisquer regiões ladeantes codificadoras de outras proteínas do organismo de onde deriva o mRNA.



Obtem-se DNA cromossómico codificador de TNF por sondagem genómica de bibliotecas de DNA, com cDNA. O DNA cromossómico não possui regiões ladeantes codificadoras de outras proteínas mas pode conter intrões

O DNA isolado do factor de necrose tumoral é facilmente modificado por substituição, eliminação ou inserção de nucleotideos, resaltando assim em novas sequências de DNA codificadoras do factor de necrose tumoral ou seus derivados. Estas sequências modificadas são usadas para produzir factor de necrose tumoral mutante e para expressar directamente factor de necrose tumoral maduro. As sequências modificadas são também úteis no aumento da eficiência de expressão de factor de necrose tumoral em sistemas hospedeiro-vector escolhidos, e.g., por modificação de acordo com a preferência de codões de célula hospedeira.

Estas novas sequências de DNA ou seus fragmentos são marcados e usados nos ensaios de hibridação para material genético codificador de factor de necrose tumoral.

Nos processos para a síntese de factor de necrose tumoral, DNA que codifique factor de necrose tumoral é ligado a um vector replicável (reproduzível), o vector usado para transformar células hospedeiras, as células hospedeiras cultivadas e o factor de necrose tumoral recuperado a partir da cultura. Este processo geral é usado para construir factor de necrose tumoral tendo as características de factor de necrose tumoral de monócitos ou para construir novos derivados do factor de necrose tumoral, dependendo da construção de vector e da células hospedeiras escolhidas para transformação.

As espécies de factor de necrose tumoral que neste caso se consegue sintetizar incluem factor de necrose tumoral maduro (terminação amínica valilo), factor



de necrose pré tumoral ("preTNF" , aqui definido) e derivados de TNF incluindo (a) proteínas de fusão em que TNF ou qualquer fragmento seu (incluindo factor de necrose tumoral maduro) são ligados a outras proteínas ou polipeptídeos por uma ligação peptídica nos aminoácidos da terminação amínica e/ou carboxílica do TNF ou seus fragmentos , (b) fragmentos de TNF , incluindo factor de necrose tumoral maduro ou fragmentos de pre TNF em que qualquer aminoácido da pre proteína e o aminoácido da terminação amínica do fragmento , (c) mutantes de TNF ou seus fragmentos (incluindo factor de necrose tumoral maduro) em que um ou mais resíduos de aminoácidos são substituídos , inseridos ou eliminados , e/ou (d) derivados por adição na terminação amínica de metionilo modificado das referidas proteínas , fragmentos ou mutantes.

Regra geral , se uma célula de mamífero é transformada com (a) um vector contendo todo o gene estrutural do factor de necrose tumoral (incluindo um cordão de iniciação 5') , ou (b) o gene do factor de necrose tumoral maduro ou de um derivado do factor de necrose tumoral operacionalmente ligado a um condutor ("leader") de secreção eucariótico (que pode também incluir a pré-sequência do condutor de secreção do factor de necrose tumoral) , e a célula cultivada , em seguida o factor de necrose tumoral maduro é recuperado da cultura.

De modo idêntico , se o DNA que codifica TNF estiver operacionalmente ligado num vector a um condutor de secreção que é processado correctamente pela célula hospedeira a ser transformada (normalmente o organismo de onde se extraiu a sequência condutora) , o hospedeiro transformado com o vector e cultivado , então o factor de necrose tumoral é sintetizado sem metionilo ou metionilo bloqueado na terminação amínica . Em particular , E. coli transformada com vectores em que o DNA codificador de factor de necrose tumoral maduro está ligado em 5' ao DNA



10.

codificador do polipeptído sinal da enterotoxina ST II processará correctamente uma percentagem elevada da pré-proteína híbrida para dar factor de necrose tumoral maduro. Os condutores de secreção e células hospedeiras podem ser seleccionados de modo a resultar também no transporte adequado da proteína madura para o periplasma celular.

Também estão dentro do âmbito deste invento outros derivados do factor de necrose tumoral que não as variações na sequência de aminoácidos ou glicosilação. Tais derivados são caracterizados por associação covalente ou agregativa a partes químicas. Os derivados caem normalmente em três tipos de classes: sais, modificações covalentes de resíduos terminais e de cadeias laterais e complexos de adsorção.

Se o DNA codificador do factor de necrose tumoral estiver operacionalmente ligado a um vector, o vector usado para transformar uma célula hospedeira e a célula cultivada, o factor de necrose tumoral é encontrado no citoplasma celular. Assim, não é necessário ideализar sistemas de secreção para se obter factor de necrose tumoral maduro. Isto foi surpreendente porque, normalmente, a expressão directa dá proteína metionilada. Além de que a proteína é estável e solúvel na cultura de células recombinantes, i.e., não é nem cortada proteoliticamente por proteases intracelulares nem depositada como corpos refractáveis. Assim, são conseguidas novas fermentações caracterizadas por células eucarióticas inferiores ou procarióticas terem factor de necrose tumoral maduro não metionilado situado no citoplasma de tais células.

Se bem que o factor de necrose tumoral possa ser preparado por cultura de linhas celulares animais, e.g. uma linha celular monocítica induzida por crescimento na presença de 4-beta-forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) ou linhas celulares imortalizadas como sejam os



11.

hibridomas ou células transformadas pelo EBV (Patente U.S. 4 464 465) , é preferível sintetizar o factor de necrose tumoral em cultura de células recombinantes como descrito abaixo.

Uma vez que o factor de necrose tumoral é preparado por fermentação ele é normalmente purificado por recuperação do sobrenadante da cultura ou cultura de células lisadas , remoção de detritos sólidos , adsorção do factor de necrose tumoral da mistura de sobrenadante (contendo factor de necrose tumoral e outras proteínas) a uma substância hidrofóbica , eluição do factor de necrose tumoral a partir dessa substância , adsorção do factor de necrose tumoral a uma resina de permuta aniónica com grupos amino terciário , eluição do factor de necrose tumoral dessa resina , adsorção do factor de necrose tumoral a uma resina de permuta aniónica (de preferência substituída com grupo amino quaternário) , tendo um tamanho de partículas substancialmente uniforme , e eluição do factor de necrose tumoral da resina. Facultativamente , as composições do factor de necrose tumoral são concentradas e purificadas por cromatofragem em qualquer ponto do processo de purificação , por exemplo por focagem isoelectrónica ou passagem por um gel filtrante como seja Sephadex G-25 .

O factor de necrose tumoral purificado a partir de culturas celulares induzidas ou recombinantes é combinado , para fins terapêuticos , com estabilizadores e excipientes fisiológicamente inócuos e preparado na forma de dosagem por liofilização em ampolas ou armazenamento em preparações aquosas estabilizadas . Como alternativa o factor de necrose tumoral é incorporado numa matriz polimérica para implantação em tumores ou locais cirúrgicos de onde foram removidos os tumores , efectuando-se assim uma libertação prolongada do factor de necrose tumoral numa concentração localizada de gradiente elevado.



As composições aqui tratadas são obtidas sem factores citotóxicos contaminantes tais como linfotoxina, interferões ou outras proteínas citotóxicas referidas na literatura. No entanto, nas aplicações terapêuticas o factor de necrose tumoral é vantajosamente combinado com quantidades predeterminadas de linfotocina e/ou interferão. As composições contendo factor de necrose tumoral e um interferão, como seja o interferão gama, são particularmente úteis uma vez que se verifica exercerem uma actividade citotóxica sinergística.

As composições do factor de necrose tumoral são administradas a animais, particularmente pacientes com tumores malignos, em doses terapêuticamente eficazes. As dosagens adequadas serão aparentes para o especialista no contexto terapêutico, como é posteriormente descrito infra.

Breve Descrição dos Desenhos

Fig. 1, mostra o perfil de eluição do factor de necrose tumoral a partir de vidro de poro controlado.

Fig. 2, mostra o perfil de eluição do factor de necrose tumoral a partir de dictilaminocitilcelulose.

Fig. 3, mostra o perfil de eluição do factor de necrose tumoral da cromatografia líquida de alta velocidade de proteínas.

Fig. 4, mostra o perfil de eluição do factor de necrose tumoral quando da cromatofocagem.

Fig. 5, mostra o peso molecular do factor de necrose tumoral por electroforese em gel de SDS-PAGE.

Fig. 6, mostra o peso molecular do factor de necrose tumoral quando da eluição de HPLC.



13.

Fig. 7 , mostra o perfil de eluição do factor de necrose tumoral a partir de uma coluna de HPLC C4.

Fig. 8 , ilustra a separação em HPLC dos fragmentos do factor de necrose tumoral obtidos por digestão com tripsina .

Fig. 9 , ilustra o efeito citotóxico de misturas do interferão gama e do factor de necrose tumoral .

Fig. 10, descreve a sequência de aminoácidos e de nucleotídeos do factor de necrose pretumoral humano , incluindo a totalidade do condutor de secreção do factor de necrose tumoral .

Fig. 11, mostra a construção de um vector para expressão do factor de necrose tumoral .

Descrição Detalhada

O factor de necrose tumoral é definido para os presentes fins como um polipeptídeo que não seja linfotoxina , capaz de actividade citotóxica preferencial e tendo uma região com homologia funcional de aminoácidos com a sequência de aminoácidos do factor de necrose tumoral maduro estabelecida na Fig-10 , um seu fragmento , ou um derivado deste polipeptídeo ou fragmento .

Actividade citotóxica preferencial é definida como a destruição ou inibição de crescimento preferenciais de células tumorais quando comparado com células normais nas mesmas condições . A actividade citotóxica preferencial é detectada pelo efeito de polipeptídeo em células tumorais in vivo ou in vitro quando comparado com células ou tecidos normais .

A lise celular é normalmente o



diagnóstico indicativo in vitro , enquanto que a necrose tumoral é determinada nas experiências in vivo . No entanto , a actividade citotóxica pode-se manifestar como citostase ou actividade antiproliferativa . São bem conhecidos os sintomas de ensaio adequados . Por exemplo , o ensaio de lise celular usado para determinar a actividade específica do factor de necrose tumoral descrito abaixo é aceitável , tal como é o ensaio descrito em B. Aggarwal et al. , em "Thymic Hormones and Lymphokines" , 1983 , ed. A. Goldstein , Spring Symposium ou Health Sciences, George Washington University Medical Center (a linha celular A 549 referida nesta literatura pode ser adquirida na ATCC como CCL 185).

A actividade específica do TNF é calculada em termos da lise de células alvo em vez de citostase . Uma unidade do factor de necrose tumoral é definida como a quantidade necessária para haver 50 por cento de lise das células alvo semeadas em cada poço de acordo com o Exemplo 1 . No entanto isto não pretende excluir outros ensaios para medição da actividade específica , e.g. métodos baseados em taxa de crescimento de células alvo.

PreTNF é uma espécie de factor de necrose tumoral incluída na definição dada atrás de factor de necrose tumoral . É caracterizado pela presença na molécula de um polipeptídeo sinal (ou condutor) que serve para depois da tradução dirigir a proteína para um local dentro ou fora da célula . Geralmente , o polipeptídeo sinal (que não terá actividade necrótica por si só) é separado proteolíticamente de uma proteína com actividade de factor de necrose tumoral como parte do processo secretor em que a proteína é transportada para o espaço periplasmico ou meio de cultura da célula hospedeira . O peptídeo sinal pode ser microbiano ou de mamífero (incluindo a présequência nativa de 76 resíduos) , mas de preferência é um sinal homólogo para a célula hospedeira.



15.

O factor de necrose tumoral nativo das fontes biológicas normais tem um peso molecular estimado em cerca de 17 000 por electroforese em gel de poliacrilamida e dodecilsulfato de sódio (SDS--PAGE) como descrito infra , um ponto isoeléctrico de cerca de 5,3 e susceptível de hidrólise pela tripsina em múltiplos locais . O factor de necrose tumoral nativo que foi purificado por HPLC de fase reversa é hidrolizado pela tripsina em pelo menos nove fragmentos nas condições descritas infra . O número preciso de fragmentos em que o factor de necrose tumoral é hidrolizado pela tripsina dependerá de factores tais como actividade da tripsina , concentração do factor de necrose tumoral e parâmetros de incubação , incluindo força iónica , pH , temperatura e tempo de incubação .

O factor de necrose tumoral não parece ser uma glicoproteína uma vez que não é retido em colunas de afinidade com lectinas e a análise da sequência de aminoácidos deduzida não parece indicar possíveis locais de glicosilação . Também , o material produzido em culturas de E. coli recombinantes (que não possuem a capacidade de glicosilar) comigra com o TNF natural em SDS-PAGE.

O grau de homologia da sequência de aminoácidos que permite considerar um polipeptideo dentro do âmbito de definição de factor de necrose tumoral aqui dada , variará dependendo da homologia entre a proteína candidata e o factor de necrose tumoral cair ou não dentro das regiões do factor de necrose tumoral responsáveis pela actividade citotóxica ; as zonas que são críticas para a actividade citotóxica deverão apresentar um grau de homologia elevado de modo a estarem dentro da definição , enquanto as sequências não envolvidas na manutenção da conformação do factor de necrose tumoral ou na efectuação da ligação do receptor podem apresentar comparativamente homologia baixa. Ainda , as zonas críticas podem apresentar actividade cito-lítica e permanecerem homólogas como aqui definido , se



os resíduos contendo cadeias laterais de aminoácidos funcionalmente semelhantes foram substituídos uns pelos outros. Funcionalmente semelhante refere-se a características dominantes das cadeias laterais tais como carácter básico, neutro ou ácido, ou a presença ou ausência de um certo volume espacial. No entanto, o factor de necrose tumoral como aqui definido exclui especificamente linfotoxina.

Geralmente um polipeptideo definido como factor de necrose tumoral possuirá regiões substancialmente homólogas da proteína da Fig - 10 ou seus fragmentos ao longo de um bloco contínuo de entre 20 e 100 resíduos de aminoácidos, em particular os blocos formados pelos resíduos 35 - 66 e 110 - 133.

Um dos factores mais significantes no estabelecimento da identidade de um polipeptideo como factor de necrose tumoral é a capacidade do anti-soro, que é capaz da neutralização substancial da actividade citolítica do factor de necrose tumoral maduro como estabelecido na Fig - 10, de também neutralizar substancialmente a actividade citolítica do polipeptideo em questão. No entanto, como se observará a identidade imunológica e a identidade citotóxica não são necessariamente coextensivas. Um anticorpo neutralizante para o factor de necrose tumoral da Fig - 10 pode não se ligar a uma proteína candidata por acontecer que o anticorpo neutralizante não seja dirigido para ligação específica a um local no factor de necrose tumoral que seja crítico para a sua actividade citotóxina. Por outro lado, o anticorpo pode ligar-se a uma região inócuia e exercer o seu efeito neutralizante por impedimento espacial. Assim uma proteína candidata alterada na sua região inócuia pode não se ligar mais a um anticorpo neutralizante mas continuar a ser factor de necrose tumoral em termos de homólogia substancial e actividade biológica.

É importante observar que características tais como peso molecular, ponto isoelectrónico e



similares para o factor de necrose tumoral humano nativo ou tipo selvagem da Fig - 10 obtido a partir de linfócitos periféricos ou culturas de linhas celulares estabelecidas são descritivas apenas para as espécies nativas do factor de necrose tumoral . O factor de necrose tumoral tal como contemplado pela definição atrás dada incluirá outras espécies que não apresentem todas as características do factor de necrose tumoral nativo . Se bem que o factor de necrose tumoral como aqui definido inclua factor de necrose tumoral nativo , outros polipeptideos citotóxicos relacionados cairão dentro da definição.

Por exemplo , os derivados de TNF como sejam os mutantes de inserção , mutantes de eliminação ou proteínas de fusão descritas acima darão ao factor de necrose tumoral um peso molecular diferente do estabelecido para o factor de necrose tumoral humano nativo (as proteínas de fusão com factor de necrose tumoral maduro ou o próprio preTNF assim como os mutantes de inserção terão um peso molecular superior ao do factor de necrose tumoral maduro e nativo , enquanto que os mutantes de eliminação do factor de necrose tumoral maduro nativo terão um peso molecular inferior).

De modo idêntico , o factor de necrose tumoral pode ser projectado para se reduzir ou eliminar a susceptibilidade à hidrólise pela tripsina ou outras proteases . Finalmente o processamento pós-tradução de preTNF humano em linhas celulares derivadas de mamíferos não primatas poderá produzir micro-heterogeneidade na região terminal amínica de tal modo que a valina deixará de ser o aminoácido da terminação amínica.

Na fig - 10 está descrita a sequência de aminoácidos do factor de necrose tumoral humano deduzida do seu cDNA . O factor de necrose tumoral maduro ou nativo é representado pelos resíduos de aminoácidos 1 a



157 . Note-se que esta sequência inclui uma sequência sinal de 76 resíduos que se crê ser removida durante o processamento normal do produto de transcrição traduzido para produzir a proteína madura . Os locais de hidrólise pela tripsina estão assinalados por setas.

Note-se que a expressão "capaz" de actividade citotóxica ou necrose tumoral in vivo significa que o termo factor de necrose tumoral inclui polipeptideos que possam passar por exemplo por hidrólise enzimática , de um análogo no estado inactivo para um zimogénio e deste para um fragmento polipeptídico que apresente a actividade biológica pretendida . Típicamente , os precursores inactivos serão proteínas de fusão em que o factor de necrose tumoral maduro está ligado por uma ligação peptídica na sua terminação carboxílica a uma proteína humana ou um seu fragmento . A sequência nesta ligação peptídica ou perto dela é selecionada de modo a ser susceptível à hidrólise proteolítica para originar factor de necrose tumoral , quer in vivo , quer como parte de um protocolo de produção , in vitro . O factor de necrose assim gerado apresentará então a actividade citotóxica necessária por definição.

Se bem que factor de necrose tumoral normalmente seja subentendido como factor de necrose tumoral humano , factor de necrose tumoral de outras fontes tais como murino , porcino , equino ou bovino , está incluído na definição de factor de necrose tumoral desde que preencha os requisitos descritos acima para as regiões homólogas e actividade citotóxico . TNF não é específico de uma espécie , e.g. , TNF humano é activo em tumores de ratinhos . Assim , TNF de uma espécie pode ser usado na terapia de outra.

O factor de necrose tumoral também inclui formas poliméricas . O factor de necrose tumoral agrega-se espontâneamente em polímeros, normalmente dímeros ou polímeros superiores.



19.

Os polímeros são citotóxicos e portanto adequados à utilização em terapia in vivo. Se bem que seja desejável expressar e recuperar o factor de necrose tumoral como um polímero ou monómero substancialmente homogéneo, o factor de necrose tumoral pode ser usado terapêuticamente como uma mistura de diferentes polímeros.

Derivados do factor de necrose tumoral estão incluídos no âmbito do termo factor de necrose tumoral. Os derivados incluem mutantes da sequência de aminoácidos, variantes de glicosilação e conjugados covalentes ou agregativos com outros componentes químicos. Os derivados covalentes são preparados por ligação de junções a grupos que se encontram nas cadeias laterais dos aminoácidos de TNF ou nas terminações N ou C, por métodos conhecidos na especialidade.

Estes derivados podem, por exemplo, incluir: ésteres ou amidas alifáticas da terminação carbocílica ou resíduos possuindo cadeias laterais carboxílicas, e.g., asp10; derivados O-acilados de resíduos contendo grupo hidroxilo tais como ser 52, ser 3, ser 4 ou ser 5; derivados N-acilados do aminoácido da terminação amínica ou de resíduos possuindo grupos amínicos, e.g. lisina ou arginina; e derivados de cis 101 e cis 69.

O grupo acilo é seleccionado do grupo de componentes alquilicos (incluindo alquilos normais C_3 a C_{10}), formando assim espécies alcanoilo e compostos carbocíclicos ou heterocíclicos, formando portanto espécies aroilo. Os grupos reactivos são de preferência compostos bifuncionais conhecidos per se para usar na ligação cruzada de proteínas para dar matrizes insolúveis através dos grupos laterais reactivos. Os locais de derivação preferidos são nos resíduos de cisteína e histidina.

Os derivados covalentes ou agregati-



20.

vos são úteis como reagentes em testes imunológicos ou para processos de purificação por afinidade. Por exemplo, o factor de necrose tumoral é insobabilizado por ligação covalente a Sepharose activada com brometo de cianogenio por métodos conhecidos per se ou adsorvidos a superfícies de polialquenos (com ou sem ligação cruzada com glutaraldeído) para usar no ensaio ou purificação dos anticorpos anti-TNF ou receptores da superfície celular.

O factor de necrose tumoral também é marcado com um grupo detectável, e.g., radiodinado pelo processo da clorammina T, ligado covalentemente a quelatos terrosos raros ou conjugado com um outro componente fluorescente para usar em ensaios de diagnóstico, especialmente para diagnóstico dos níveis de TNF em amostras biológicas por imunoensaios do tipo competitivo. Tais derivados podem cair fora da definição de TNF acima dada porque não é necessário que apresentem actividade citotóxica, mas sim apenas reactividade cruzada com anti-TNF.

Derivados mutantes do factor de necrose tumoral incluem as mutações dirigidas, i. e., específicas de local, do TNF ou dos seus fragmentos. O objectivo da mutagénese é construir DNA que codifique factor de necrose tumoral como definido acima, i. e., factor de necrose tumoral que apresente actividade citotóxica contra células tumorais in vitro ou provoque necrose tumoral in vivo, e que retenha homologia residual com a sequência da fig - 10, mas que também apresente características e actividade melhoradas. O factor de necrose tumoral mutante é definido como um polipeptideo que esteja dentro da definição de homologia para factor de necrose tumoral aqui estabelecida mas que possua uma sequência de aminoácidos diferente da do factor de necrose tumoral, quer por meio de eliminação quer por substituição ou inserção.

Por exemplo, os resíduos de



arginina ou lisina do factor de necrose tumoral (arginina 2 , 6 , 82 , 44 e 131 e lisina 98 , 90 e 65) podem ser alterados para histidina ou outro resíduo de aminoácido que não torne a proteína sensível à proteólise . De modo idêntico , a cisteína 101 pode ser substituída por outros resíduos e interligada quimicamente para conferir estabilidade oxidativa . Não necessário que os mutantes preenchem os requesitos de actividade para o factor de necrose tumoral, pois mesmo os mutantes biológicamente inactivos serão úteis quando da marcação ou imobilização como reagentes em imuno-ensaios . No entanto , neste caso os mutantes reterão pelo menos um local epitópico que reage com o anticorpo contra factor de necrose tumoral .

As regiões da molécula de necrose tumoral abrangidas pelos resíduos 35 a 66 e 110 a 133 inclusive apresentam substancial homologia (50 por cento) com linfotoxina . As terminações carboxílicas hidrofóbicas (resíduos 150 a 157 de factor de necrose tumoral) das duas moléculas também estão significativamente conservadas . Uma vez que ambas as proteínas apresentam actividade citotóxica ou necrose tumoral in vivo , pensa-se que estas regiões sejam importantes na actividade compartilhada pela linfotoxina e factor de necrose tumoral .

Como tal , os resíduos nestas regiões são os preferidos para mutagénese com o objectivo de afectar directamente a actividade do factor de necrose tumoral de uma dada célula . A região relativamente pouco conservada dos resíduos 67 - 109 do factor de necrose tumoral pode funcionar de modo a posicionar correctamente as duas regiões circundantes relativamente homólogas numa conformação essencial à actividade citotóxica . Tal posicionamento que poderá ser conseguido por uma ligação dissulfureto Cis 69 - Cis 101 no factor de necrose tumoral , deverá ser conseguida idênticamente pela região correspondente da linfotoxina e poderá justificar as diferenças de especificidade e actividade entre as duas moléculas .



De acordo com isto uma vez postulado que estes resíduos representam o núcleo activo do factor de necrose tumoral eles podem ser sintetizados químicamente ou por mutagénese de eliminação como polipeptídeos truncados de pequeno comprimento tendo actividade de factor de necrose tumoral .

Apesar do local de mutação ser predeterminado , não é necessário que a mutação per se seja predeterminada . Por exemplo para optimizar a obtenção de mutantes na posição 131 , pode-se efectuar mutagénese ao acaso no codão para a arginina 131 e os mutantes do factor de necrose tumoral expressos , testados quanto à combinação óptima de actividade citotóxica e resistência a proteases . São bem conhecidas as técnicas para fazer mutações por substituição em locais predeterminados no DNA tendo uma sequência conhecida , por exemplo mutagénese com iniciador M 13 .

A mutagénese do factor de necrose tumoral é efectuada fazendo inserções de aminoácidos , normalmente na ordem de 1910 resíduos de aminoácidos , ou eliminações de 1 a 30 resíduos . Substituições , eliminações , inserção ou quaisquer subcombinações podem ser usadas para chegar a uma construção final . As inserções incluem fusões na terminação amínica ou carboxílica , e.g., uma extensão hidrofólica adicionada à terminação carboxílica . De preferência, no entanto , apenas é feita mutagénese por substituição . Óbviamente as mutações no DNA codificador não devem alterar a fase de leitura da sequência e de preferência não criar regiões complementares que produzam estruturas secundárias no mRNA .

Nem todas as mutações no DNA que codifica o factor de necrose tumoral são expressas no produto final secretado . Por exemplo , uma classe principal de mutações por substituição no DNA são aquelas em que um sinal ou condutor de secreção diferente substitui o condutor



de secreção nativo humano , quer por eliminações na sequência condutora quer por substituições , em que a maior parte ou todo o condutor nativo é trocado por um condutor com maior probabilidade de ser reconhecido pelo hospedeiro pretendido . Por exemplo , na construção de um vector de expressão pro-cariótico o condutor de secreção humano é sujeito a eliminações em favor dos condutores da fosfatase alcalina bacteriana ou da enterotoxina II estável ao calor , e para levedura o condutor é substituído em favor dos condutores da invertase de levedura , factor alfa ou fosfatase ácida . No entanto o condutor de secreção humano pode ser reconhecido por outros hospedeiros sem serem linhas celulares humanas , mais provavelmente por culturas celulares de células de eucariotas superiores .

Quando o condutor de secreção é "reconhecido" pelo hospedeiro , a proteína de fusão consistindo no factor de necrose tumoral e condutor normalmente é cortada na ligação peptídica entre o condutor e o factor de necrose tumoral durante uma série de acontecimentos que levam à secreção do factor de necrose tumoral . Deste modo, ainda que um DNA mutante preTNF seja usado para transformar o hospedeiro e preTNF mutante seja sintetizado como intermediário , o factor de necrose tumoral resultante é normalmente factor de necrose tumoral nativo .

Uma outra classe importante de mutantes de DNA que não são expressos como derivados do factor de necrose tumoral são as substituições de nucleotídeos feitas para aumentar a expressão , em principalmente primeiro lugar para evitar ansas terminais amínicas , no mRNA transcrito (ver pedido da patente copendente dos E.U.A , Nº. de série 303 687 , aqui incluída como referência) ou para proporcionar codões que sejam mais facilmente transcritos pelo hospedeiro seleccionado , e.g. , os bem conhecidos codões preferenciais de E. coli para expressão em E. coli .



Factor de necrose tumoral substancialmente homogéneo significa factor de necrose tumoral substancialmente livre de outras proteínas activas para a fonte a partir da qual foi isolado o factor de necrose tumoral. Isto significa que o factor de necrose tumoral homogéneo está substancialmente livre de proteínas do plasma sanguíneo tais como albumina, fibrinogénio, serina, proteases, α -globulinas, polipeptideos citotóxicos de factores de necrose não tumoral tais como linfotoxina ou interferões, ou outras proteínas da célula ou organismo que serve como origem de síntese do factor de necrose tumoral, incluindo células totais e detritos celulares.

No entanto, o factor de necrose tumoral homogéneo pode incluir outras substâncias tais como os estabilizantes e excipientes descritos abaixo, quantidades predeterminadas de proteínas da célula ou organismo que serve como origem de síntese, proteínas de outras células ou organismos que não os da fonte de factor de necrose tumoral e polipeptídeos sintéticos tais como poli-L-lisina. O factor de necrose tumoral recombinante que seja expresso numa célula hospedeira alogeneíca, e.g. bacteriana, será certamente expresso sem proteínas da fonte do gene.

O factor de necrose tumoral é de preferência sintetizado em culturas de organismos recombinantes. Não se pretende nem linfócitos do sangue periférico (PBLs) nem linhas celulares. É difícil na prática obter PBLs de uma classe sem contaminação com células de outras classes, e.g. para obter macrófagos em células B ou T.

Tal contaminação tornará mais difícil o processo de separação aplicado aos produtos de tais células devido a outros potenciais factores citotóxicos e proteínas libertados pelas células contaminantes. Ainda, o factor de necrose tumoral obtido a partir de culturas não



recombinantes é caro e consistirá apenas em factor de necrose tumoral nativo , tais culturas não possuem pois a flexibilidade da cultura recombinante para melhorar as características do factor de necrose tumoral .

O DNA que codifica factor de necrose tumoral é obtido por síntese química , por rastreio de produtos de transcrição reversa de mRNA de PBL ou culturas de linhas celulares ou por rastreio de bibliotecas genómicas de qualquer célula . Linhas celulares adequadas incluem linhas de células monocíticas tais como linhas de células promielocíticas designadas normalmente por "HL - 60" (uma das quais pode ser adquirida à ATCC como CCL 240) ou a linha celular de linfoma histiocítico U 937 (ATCC CRL 1593) .

Estas e outras linhas celulares são induzidas para expressarem e secretarem factor de necrose tumoral por exposição das células a agentes químicos ou físicos conhecidos na especialidade , normalmente agentes tumorigénicos ou nitogénicos . O factor de necrose tumoral pode ser induzido eficazmente em certas linhas celulares monocíticas apenas com PMA ; outros agentes convencionais tais como lipopolissacarídeo , enterotoxina B de estafilococcus ou timosina α -1 não são tão eficazes como o PMA na indução do factor de necrose tumoral nestas linhas celulares .

Uma vez que é necessário uma quantidade variável de rastreio para localizar uma linha celular que expressa factor de necrose tumoral (e portanto possuidora do mRNA pretendido) poderá ser mais eficiente sintetizar simplesmente o gene . A síntese é vantajosa porque poderão ser introduzidos locais de restrição únicos (facilitando assim a utilização do gene em vectores contendo outros locais de restrição além dos presentes na sequência nativa) e efectuarem-se outros passos que conduzem ao aumento da



eficiência de tradução , como discutido abaixo.

Este DNA é marcado covalentemente com uma substância detectável como seja um grupo fluorescente , um átomo radioactivo ou um grupo quimoluminescência por métodos conhecidos per se . Ele é em seguida usado em ensaios de hibridação convencionais . Tais ensaios são empregues na identificação de vectores com TNF e transformantes como descrito nos Exemplos infra ou para diagnóstico in vitro como seja a detecção de mRNA de TNF nas células do sangue .

Surpreendentemente , o mRNA para TNF é relativamente raro , mesmo em células HL - 60 , talvez devido à instabilidade do mensageiro devida a causas desconhecidas . É ainda importante a cinética de aparecimento do mRNA de TNF após indução celular . O mRNA de TNF aparece nas células apenas durante um breve período de cerca de 4 horas pós-indução . Neste aspecto este aparecimento é distinto do da linfoxina , a qual aparece cerca de 12 horas pós-indução .

Isto torna difícil detectar o cDNA quando não se está informado do que se há-de procurar. No entanto , uma vez verificada a sua presença e obtido o DNA completamente complementar , como se consegue pelo que aqui se divulga , é rotina fazer o rastreio de bibliotecas de cDNA de HL - 60 ou PBLs induzidos em relação ao cDNA do factor de necrose tumoral usando sondas tendo sequências desse DNA . As duas bibliotecas de HL - 60 em fogo testadas nos Exemplos . Contêm um número relativamente consistente de placas positivas , de modo que é claro que os ensaios de hibridação de rotina identificarão fagos contendo o cDNA desejado .

Células sentetizadoras de factor de necrose tumoral de uma linha celular de HL - 60 são



cultivadas inicialmente de modo convencional até atingirem uma densidade de cerca de $8 - 12 \times 10^6$ células/ml. As células são removidas do meio de cultura, lavadas, transferidas para meio sem soro e crescidas em meio contendo PMA. Continua-se então a cultura até se ter acumulado no meio de cultura a concentração pretendida do factor de necrose tumoral, normalmente 400 unidades de factor de necrose tumoral / ml.

Em seguida o sobrenadante da cultura é de preferência clarificado por centrifugação ou outros meios de separação de detritos celulares dos componentes solúveis. A centrifugação deverá ser feita a baixa velocidade de modo a sedimentar apenas as partículas em suspensão. O sobrenadante é então purificado como descrito infra.

Como alternativa, e de preferência o factor de necrose tumoral é sintetizado em células hospedeiras transformadas com vectores possuindo DNA codificador do factor de necrose tumoral. Um vector é uma construção de DNA replicável. Os vectores são aqui usados para amplificar o DNA codificador do factor de necrose tumoral e/ou expressar DNA que codifique o factor de necrose tumoral.

Um vector de expressão é uma construção de DNA replicável em que a sequência de DNA codificadora do factor de necrose tumoral está ligada operacionalmente a sequências de regulação adequadas capazes de efectuar a expressão do factor de necrose tumoral num hospedeiro adequado. Tais sequências de regulação incluem um promotor de transcrição, uma sequência de operador facultativa para regular a transcrição, uma sequência codificadora de locais adequados de ligação do mRNA ao ribossoma e sequências que controlem a terminação da transcrição e tradução.

Os vectores incluem plasmídeos,



28.

vírus (incluindo fagos) e fragmentos de DNA integráveis (i. e., integráveis no genoma hospedeiro por recombinação) . Uma vez que tenha transformado um hospedeiro adequado , o vector replica-se e funciona independentemente do genoma hospedeiro , ou pode , nalguns casos , integrar-se no próprio genoma . Na presente especificação , "vector" é genérico para "plasmídeo" , pois os plasmídeos são a forma de vector mais vulgarmente usada . No entanto , todas as outras formas de vectores que sirvam uma função equivalente e que são , ou tornar-se-ão , conhecidos na especialidade são adequados à utilização neste caso .

Os vectores adequados possuirão sequências de replicação e de regulação derivadas de espécies compatíveis com o hospedeiro pretendido para a expressão . Células hospedeiras transformadas são células que foram transformadas ou transfectadas com vectores tendo factor de necrose tumoral construídos usando técnicas de DNA recombinante. As células hospedeiras transformadas expressam normalmente o factor de necrose tumoral . O factor de necrose tumoral expresso será depositado no espaço intracelular ou secretado para o espaço periplasmico ou sobrenadante da cultura , dependendo da célula hospedeira seleccionada .

As regiões de DNA estão operacionalmente , ligadas quando estão funcionalmente relacionadas umas com as outras . Por exemplo , o DNA de uma pré-sequência ou conductor de secreção está operacionalmente ligado ao DNA de um polipeptídeo se for expresso como uma pre-proteína que participa na secreção de polipeptídeo ; um promotor está operacionalmente ligado a uma sequência codificadora se controlar a transcrição da sequência ; ou um local de ligação ao ribossoma está opcionalmente ou operacionalmente ligado a uma sequência codificadora se estiver colocado de modo a permitir a tradução . De um modo geral , operacionalmente ligado significa contíguo e , no caso dos condutores de secreção , contíguo e na mesma fase de leitura.



São células hospedeiras adequadas procariotas, leveduras ou células de eucariotas superiores. Os procariotas incluem organismos gram negativos ou gram positivos, por exemplo E. coli ou bacilos células do eucariotas superiores incluem linhas celulares estabelecidas originares de mamíferos como descrito abaixo. Uma célula hospedeira preferida é a estirpe de E. coli W3110 (ATCC 27 325) resistente aos fagos e descrita nos Exemplos, se bem que também sejam adequados outros procariotas tais como E. coli B, E. coli X1776 (ATCC 31 537), E. coli 294 (ATCC 31 446), espécies pseudomonas, ou Serratia marcesans.

São preferidos os sistemas hospedeiro procariota-vector para a expressão do factor de necrose tumoral. Enquanto que a molécula do factor de necrose tumoral possui dois resíduos de cisteína, implicando assim uma necessidade potencial pequena de processamento pós-tradução para formar uma potencial ligação dissulfureto, E. coli por exemplo expressa factor de necrose tumoral biologicamente activo. Existem à disposição toda uma gama de vectores microbianos. Geralmente em vector microbiano conterá uma origem de replicação reconhecida pelo hospedeiro pretendido, um promotor que funcionará no hospedeiro e um gene de seleção fenotípica, por exemplo um gene codificador de proteínas que confirmam resistência a antibióticos ou que forneça uma necessidade auxotrófica.

Construções semelhantes serão produzidas para outros hospedeiros. E. coli é tipicamente transformado usando pBR322, um plasmídeo derivado de uma espécie de E. coli (Bolivar, et al., 1977, "Gene" 2 : 95), pBR322 possui genes de resistência à ampicilina e tetraciclina proporcionando assim um meio fácil de identificação das células transformadas.

Os vectores devem possuir um promotor que seja reconhecido pelo organismo hospedeiro.



30.

Este é normalmente um promotor homólogo para o hospedeiro pretendido. Os promotores mais vulgarmente usados na construção de DNA recombinante incluem os sistemas promotores da B-lactamase (penicilinase) e lactose (Chang *et al.*, 1978, "Nature", 275 : 615; e Goeddel *et al.*, 1979, "Nature" 281 : 544), uma mistura promotor do triptofano (Goeddel *et al.*, 1980, "Nucleic Acids Res." 8 : 4057 e Publicação do pedido de patente Europeia Nº. 36776) e o promotor tac [*H. De Boer et al.*, "Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A." 80 : 21 - 25 (1983)].

Se bem que estes sejam os promotores microbianos mais usados, outros existem também adequados. Os detalhes relativos às suas sequências de nucleotídeos foram publicados permitindo a um técnico especializado ligá-los operacionalmente ao DNA codificador do factor de necrose tumoral em vectores do tipo plasmídeo (Siebenlist *et al.*, 1980, "Cell" 20 : 269) e o DNA codificador do factor de necrose tumoral.

Presentemente o vector preferido do pBR322 contendo o promotor da fosfatase alcalina do *E.coli* com a sequência de Shine - Dalgarno do trp. O promotor e a sequência de Shine - Dalgarno são operacionalmente ligados ao DNA codificador do TNF, i. e., eles ficam colocados de modo a promover a transcrição do mRNA do TNF a partir do DNA.

Além dos procariotas, microorganismos eucariotas tais como culturas de levedura podem ser transformadas com vectores codificadores do factor de necrose tumoral. *Saccharomyces cerevisiae*, ou a vulgar levedura de padeiro é dos microorganismos hospedeiros eucarióticos inferiores o mais usado, apesar de uma série de outras estirpes poderem normalmente ser usadas. Os vectores para levedura possuirão geralmente uma origem de replicação do plasmídeo de levedura de 2 micron ou uma sequência de replicação



do plasmídeo de levedura de 2 micron ou uma sequência de replicação autónoma (ARS) , um promotor , TNF , sequências de poliademilação e de terminação da transcrição e um gene de relacção .

Um plasmídeo adequado à expressão do factor de necrose tumoral em levedura é o YRp7 , (Stinchcomb et al. 1979 , "Nature" , 282 : 39 ; Kingsmam et al., 1979 , "Gene" , 7 : 141 ; Tchemper et al., 1980 ; "Gene" , 10 : 157) . Este plasmídeo já contém o gene trp1 que oferece uma marca de selecção para uma estirpe mutante sem a capacidade de crescer em triptofano , por exemplo ATCC Nº 44076 ou PEP 4 - 1 (Jones , 1977 , "Genetics" , 85:12) . A presença da lesão trp 1 no genoma da célula hospedeira de levedura constitui um ambiente eficiente para a detecção da transformação através do crescimento na ausência do triptofano .

Sequências promotoras adequadas em vectores de levedura incluem os promotores da metalotioneina , cinase do 3-fosfoglicerato (Hitzeman et al. , 1980 , "J. Biol Chem." , 255 . 2073) ou outras enzimas glicolíticas (Hess et al. , 1968 , "J. Adv. Enzyme Reg." , 7 : 149 ; e Holand et al. , 1978 , " Biochemistry " , 17 : 4900) , tais como enolase , desidrogenase do gliceraldeido-3-fosfato hexocinase , descarboxilase do piruvato , fosfofructocinase , isomerase da glucose-6-fosfato , mutase do 3-fosfoglicerato , cinase do piruvato , isomerase de triosefosfato , isomerase de fosfoglucose e glucocinase . Vectores e promotores adequados à utilização na expressão em leveduras estão ainda descritos em R. Hitzeman et al. , EPO Publn . Nº. 73,657 .

Outros promotores , que têm a vantagem adicional da transcrição ser controlada pelas condições de crescimento , são as regiões promotoras da desidrogenase 2 de álcool , isocitocrómio C , fosfatase ácida ,



enzimas de degradação associadas ao metabolismo do azoto e a metalotioneína e desidrogenasse do gliceraldeído-3-fosfato acima referidas , assim como enzimas responsáveis pela utilização da maltose e galactose . Ao construirem-se plasmídeos de expressão adequados , as sequências de terminação associadas a estes genes também são ligados ao vector de expressão na extremidade 3' das sequências codificadoras do factor de necrose tumoral para proporcionar poliadenilação do mRNA e terminação .

Além de microorganismos , também podem ser usadas como hospedeiros culturais de células derivadas de organismos multicelulares . Estes, porém , não são preferidos devido aos excelentes resultados obtidos com microorganismos expressando TNF . Em princípio , qualquer cultura de células de eucariotas superiores pode ser usada. quer seja uma cultura de vertebrado ou de invertebrado . No entanto , o interesse tem sido maior no que respeita a células de vertebrados e a propagação de células de vertebrados em cultura (cultura de tecidos) tornou-se um processo de rotina nos últimos anos [Tissue Culture , Academic Press Kruse , e Patterson , editores (1973)] .

São exemplos de linhas celulares hospedeiras úteis as células VERO e He La , Linhas celulares de ovário de "hamster" Chines (CHO) e as linhas celulares WI 38 , BHK , COS - 7 e MDC K . Vectores para expressão em tais células incluem normalmente (se necessário) uma origem de replicação , um promotor situado a montante de gene a ser expresso , juntamente com um local de ligação ao ribossoma , local de "splicing" do RNA (se se usar DNA genómico contendo intrões) , um local de poliadenilação a uma sequência de terminação da transcrição .

As sequências de regulação da transcrição e tradução nos vectores de expressão a serem



usados na transformação de células de vertebrados são muitas vezes proporcionados por fontes virais. Por exemplo, normalmente usam-se promotores derivados de poliona, Adenovírus 2 e de preferência Vírus Símio 40 (SV40). Os promotores precoce e tardio são particularmente úteis porque ambos são facilmente obtidos a partir do vírus como um fragmento que também inclui a origem de replicação viral do SV40 (Fiers *et al.*, 1978, "Nature", 273 : 113).

Também podem ser usados fragmentos de SV40 menores ou maiores, desde que a sequência de cerca de 250 pb que se estende do local Hind III até ao bloco Bgl I situado na origem de replicação viral, seja incluída. Ainda, é também possível, e muitas vezes desejável, utilizar sequências promotoras, de regulação e/ou sinal genómicas humanas normalmente associadas ao factor de necrose tumoral, desde que tais sequências de regulação sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras.

Uma origem de replicação pode ser proporcionada através da construção de vector de modo a incluir uma origem exógena, tal como a derivada do SV40 ou outra fonte viral (e. g. Polioma, Adenovírus, VSV ou BPV) ou pode ser dada pelo mecanismo de replicação cromosómico da célula hospedeira. Se o vector for integrado no cromossoma da célula hospedeira esta última é muitas vezes suficiente.

Ao seleccionar-se uma célula hospedeira de mamífero preferida para transfecção com vectores que incluem sequências de DNA codificadoras do factor de necrose tumoral e da redutase do di-hidrofolato (DHFR), é adequado seleccionar-se o hospedeiro de acordo com o tipo de proteína DHFR empregue. Se se usar a proteína DHFR tipo selvagem, é preferível seleccionar uma célula hospedeira que seja deficiente em DHFR permitindo assim a utilização



da sequência codificadora de DHFR como marca para transfeção bem sucedida em meio selectivo que não possui hipoxantina, glicina e timídina. Uma célula hospedeira apropriada neste caso é a linha celular de ovário de "hamster" Chinês (CHO) deficiente no que respeita à actividade de DHFR, preparada e cultivada como descrito por Urlaub e Chasin, 1980, "Proc. Natl. Acad. Sci." (USA) 77 : 4216.

Por outro lado, se se usar DNA codificador de proteína DHFR com baixa afinidade de ligação ao metotrexato (MTX) como sequência reguladora, não é necessário usar células resistentes DHFR. Devido ao mutante DHFR ser resistente ao MTX, o meio contendo MTX pode ser usado como meio de selecção desde que as células hospedeiras sejam elas próprias sensíveis ao MTX. A maior parte das células eucarióticas que são capazes de absorver MTX parecem ser sensíveis ao metotrexato. Uma dessas linhas celulares úteis é uma linha CHO, CHO - K1 (ATCC Nº CCL 61).

O factor de necrose tumoral inicialmente é recuperado das culturas. As células não secretoras transformadas são lisadas por sonicação ou outro método aceitável e os detritos separados por centrifugação, enquanto que os sobrenadantes de células secretoras (como sejam as linhas celulares induzidas) são simplesmente separados das células por centrifugação. Em seguida podem ser usados um ou mais dos passos que se seguem ou serem totalmente substituídos por outros métodos. O método que se segue foi usado para purificar factor de necrose tumoral num grau suficiente para sequenciação. Isto não é necessariamente coextensivo com a purificação necessária para um produto terapêutico.

Num passo de purificação inicial, o factor de necrose tumoral é adsorvido a uma substância hidrofóbica a partir da cultura lisada ou do meio sobrenadante da cultura. A substância hidrofóbica é de preferência uma



superfície hidrofóbica não gelatinosa como seja um silicato , ou polialquenos , apesar da Sepharose alquilada ser igualmente adequada . O sistema preferido é vidro de peso contro lado . Vidro de poro controlado e sobrenadante de cultura são misturados numa proporção de 1 volume do primeiro para 50 volumes do segundo e a adsorção deixada a decorrer a 4°C sem agitação durante um período de cerca de 30 minutos a 2 horas , de preferência cerca de 1 hora , em condições ligeiramente alcalinas . O adsorvente geralmente deve ser depois lavado com um tampão adequado para remover proteínas contaminantes retidas .

O factor de necrose tumoral absorvido é eluído da substância hidrofóbica por alteração das propriedades de solvatação do meio envolvente. A eluição pode ser conseguida fazendo passar uma solução tamponada a aproximadamente pH 7 a 8,5, de preferência à volta de 8, contendo sal 1 M e uma quantidade eficaz de uma solução aquosa de um poliol orgânico miscível em água, tal como, por exemplo, etil enoglicol ou glicerina, vulgarmente etilenoglicol na gama de 10-30 por cento v/v, de preferência à volta de 20 por cento v/v. As fracções de eluição contendo o factor de necrose tumoral são detectadas por ensaio in vitro como descrito abaixo ou por outro ensaio adequado. A purificação e rendimento deste passo a partir de cultura de células monocíticas, assim como os passos subsequentes, estão apresentados abaixo na Tabela I .

Purificação ulterior é conseguida por adsorção do factor de necrose tumoral a uma resina de permuta amiônica com grupos amino terciário ou quaternário. As resinas preferidas para este fim são resinas de matriz hidrofóbica tais como polistireno inter-ligado, dextrano ou celulose substituída com grupos amínicos terciários ou quaternários. Produtos comerciais deste tipo podem ser adquiridos como DEAE celulose, QAE Sephadex ou sob a marca registada Móno Q (nos casos em que etilo é o substituinte alquilo em todos estes produtos) .



36.

Os melhores resultados são conseguidos com o sistema rápido de cromatografia líquida de proteínas descrito por J. Richey, Outubro 1982 , "American Laboratory" usando as partículas macroporosas substancialmente uniformes de Ugelstad et al., 1983 , "Nature" 303 : 95 - 96 . Este sistema permitiu a purificação do factor de necrose tumoral num nível elevado.

Purificação até homogeneidade substancial é conseguida apenas com posterior separação por electroforese SDS - PAGE ou cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em fase reversa C4 . Este produto , substancial quando da exposição ao SDS ou ao solvente orgânico da HPLC . A concentração proteína foi determinada pelo método de M. Bradford , 1976 , "Anal. Biochem." 72 : : 248 - 254 . Durante as fases finais da purificação , a concentração proteína foi calculada pela composição em aminoácidos e também pela sequência de aminoácidos.

O factor de necrose tumoral é preparado para administração através da mistura de factor de necrose tumoral tendo o grau de pureza pretendido com veículos fisiologicamente aceitáveis , i. e., veículos que não são tóxicos nas dosagens e concentrações empregues.

Normalmente isto inclui combinação do factor de necrose tumoral com tampões , antioxidantes tais como ácido ascórbico , polipeptídeos , de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos) , proteínas , aminoácidos , açúcares incluindo glucose ou dextrinas , agentes de quelação tais como EDTA e outros estabilizantes e excipientes .

Tabela I

Purificação de factor necrose tumoral a partir do meio de cultura de célula HL-60

Passo da purificação	Volumes finais (ml)	Proteína total (mg)	Actividade citolítica (unidades)	Actividade específica relativa (unidades/mg)	Purificação (Percentagem)	Recuperação
Material de partida	58,000	1,964	$14,2 \times 10^6$	$0,007 \times 10^6$	—	—
Cromatografia em vidro de poro controlado	1,080	88,9	$11,1 \times 10^6$	$0,12 \times 10^6$	17	78,5
Cromatografia em DEAE celulose	285	9,05	$8,9 \times 10^6$	$0,98 \times 10^6$	140	62,7
Cromatografia líquida de alta velocidade para proteínas em Mono Q	75	0,44	$6,9 \times 10^6$	$15,68 \times 10^6$	2,240	48,6
Electroforese preparativa SDS - PAG ou reversa em C4	6	0,028	$2,71 \times 10^6$ *	$96,79 \times 10^6$	13,387 *	19,1*

* Corrigido para destruição parcial da actividade ou factor de necrose tumoral causada por SDS ou por TFA e propanol.



38.

O véiculo deve ser formulado para estabilizar o factor de necrose tumoral como um dímero e/ou , de preferência , um trímero . Isto é conseguido evitando sais de detergentes em concentrações que dissociem o factor de necrose tumoral em monómeros . Como alternativa devem ser evitadas as condições que agregam o factor de necrose tumoral em polímeros superiores . Geralmente um tensiactivo não iónico como seja o Tween 20 é empregue para evitar agregação excessiva durante a purificação assim como quando da liofilização ou armazenamento em solução aquosa . O factor de necrose tumoral a ser usado na administração terapeutica deverá estar estéril. Isto é facilmente conseguido através da filtração estéril por membranas . O factor de necrose tumoral é normalmente guardado na forma liofilizada .

O factor de necrose tumoral é facultativamente combinado com outros agentes antineoplásicos tais como antibióticos quimioterapêuticos (actinomicina D, adriamicina e aclacinomicina A) ou com agentes para aumentar ou estimular a resposta imune , por exemplo imunoglobulinas tais como gama globulina , incluindo imunoglobulinas tendo afinidade para os antigenos de superfície de neoplasmas .

Em adição , uma vez que os interferões actuam sinergisticamente com o factor de necrose tumoral nos ensaios de lise celular , é desejável a combinação dos interferões alfa , beta ou gama com composições do factor de necrose tumoral ou composições contendo factor de necrose tumoral e linfotoxina . Uma formulação típica compreende factor de necrose tumoral e interferão gama numa proporção de unidades de actividade de cerca de 0,1 : 1 a 200 : 1, geralmente 10 para 1 e pode conter linfotoxina em vez de uma parte do factor de necrose tumoral . Estas proporções, concerteza , estão sujeitas a modificações conforme indicado pela experiência terapêutica .

As composições do factor de necrose



tumoral são administradas a animais com tumores. A via de administração é de acordo com métodos conhecidos, e. g., infusão ou injecção intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional de soluções estéreis do factor de necrose tumoral, ou por sistemas de libertação controlada como descrito abaixo. O factor de necrose tumoral é administrado intralesionalmente i. e., por injecção directa em tumores sólidos. No caso de tumores disseminados tais como leucemia, a administração é de preferência intravenosa ou no sistema linfático. Tumores dos órgãos abdominais, tais como cancro do ovário, são vantajosamente tratados por infusão intraperitoneal usando um sistema de diálise peritoneal e soluções peritoneais compatíveis. Geralmente, no entanto, o factor de necrose tumoral é administrado continuamente por infusão se bem que a injecção de bolus seja aceitável.

O factor de necrose tumoral é de preferência administrado a partir de um sistema de libertação regulada implantado. Exemplos de sistema adequado a proteínas tendo o peso molecular dos dímeros ou trímeros do factor de necrose tumoral, incluem copolímeros de ácido L-glutâmico e gama etil-L-glutamato (U. Sidman et al., 1983, "biopolymers" 22 (1) : 547 - 556), poli (2-hidroxietil-metacrilato) (R. Langer et al., 1981, "J. Biomed. Mater. Res. 15 : 167 - 277 e R. Langer, 1982, "Chem. Tech." 12 : 98 - 105) ou acetato vinílico de etileno (R. Langer et al., Id). Este artigo é implantado em locais cirúrgicos de onde foram removidos tumores. Como alternativa, o factor de necrose tumoral é encapsulado em micrócapsulas semi-permeáveis ou lipossomas para injecção no tumor. Este modo de administração é particularmente útil em tumores não removidos por cirurgia, e. g., tumores do cérebro.

A quantidade de factor de necrose tumoral que é administrado dependerá, por exemplo, da via de administração, do tumor em questão e do estado do paciente: Injecções intralesionais necessitarão de menos factor de



necrose tumoral numa base de peso do corpo do que a infusão intravenosa , enquanto que alguns tipos de tumores , e. g. tumores sólidos parecem ser mais resistentes ao ponto de necrose tumoral do que outros , e.g. leucénico .

Assim será necessário ao terapeuta titular a dosagem e modificar a via de administração conforme necessário para obter uma actividade citotóxica óptima contra o tumor alvo , como pode ser determinado por exemplo por biópsia do tumor ou ensaios de diagnóstico para marcas putativas de cancro tais como antígeno carcinoembriónico , tendo em vista qualquer toxicidade recombinante encontrada em dosagem elevada . Geralmente as dosagens do factor de necrose tumoral em ratinho até cerca de 120 microgramas/kg de peso de corpo 1 dia por administração intravenosa verificou-se serem substancialmente não tóxicas e eficazes in vivo .

Não pensa que o factor de necrose tumoral seja específico de espécie na sua actividade citotóxica , de modo que outros factores de necrose tumoral além do humano , e.g. de fontes bovina ou porcina , devem ser empregues na terapia de tumores humanos . No entanto , é desejável a utilização do factor de necrose tumoral da espécie a ser tratada para evitar a formação potencial de auto-anticorpos .

Para simplificar os Exemplos certos métodos mais frequentes serão referenciados por frases abreviadas .

Os plasmídeos são designados por um p minúsculo precedido e/ou seguido de letras maiúsculas e/ou números . Os plasmídeos de partida aqui usados podem ser obtidos comercialmente , estão disponíveis ao público sem restrições , ou podem ser construídos a partir desses plasmídeos disponíveis segundo processos publicados .



Além de que outros plasmídeos equivalentes são conhecidos na especialidade e serão aparentes para o técnico especializado .

"Digestão" do DNA refere-se ao corte catalítico do DNA com uma enzima que actua apenas em certos locais do DNA . Tais enzimas são denominadas enzimas de restrição e os locais para os quais cada uma é específica são designadas por locais de restrição . A digestão "parcial" refere-se à digestão incompleta com uma enzima de restrição , i. e., escolhem-se condições que resultem no corte de alguns mas não de todos os locais para uma dada endonuclease de restrição num DNA substrato . As várias enzimas de restrição usadas neste caso são obtidas por via comercial e as suas condições de reacção , cofactores e outros requesitos são usados de acordo com as instruções do fornecedor .

As enzimas de restrição são normalmente designadas por abreviaturas compostas por uma letra maiúscula seguida de outras letras e depois , geralmente um número representando o microorganismo de onde foi originalmente obtida a enzima de restrição . Em geral usa-se cerca de 1 ug de plasmídeo ou fragmento de DNA com cerca de 1 unidade de enzima em cerca de 20 μ l de solução tampão. Os tampões e quantidades de substrato adequados às enzimas de restrição particulares são especificados pelo fabricante.

São normalmente usados tempos da incubação de cerca de 1 hora a 37°C , mas pode-se variar de acordo com as instruções do fornecedor . Após incubação o proteína é removida por extracção com fenol e clorofórmio , e o ácido nucleico digerido é recuperado da fracção aquosa por precipitação com etanol . A digestão com uma enzima de restrição raramente é seguida de hidrólise , com fosfatase alcalina bacteriana , dos fosfatos terminais S' para evitar que duas extremidades de um fragmento de DNA cortados por



restrição "circularizem" ou formem uma ansa fechada que vá impedir a inserção de um outro fragmento de DNA no local de restrição. A menos que de outro modo estabelecido, a digestão dos plasmídeos não é seguida de desfosforilação terminal 5'. Os processos e reagentes para a desfosforilação são os convencionais (T. Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning pp. 133 - 134).

A "recuperação" ou "isolamento" de um dado fragmento de DNA a partir dos produtos de digestão significa separação dos produtos de digestão por electroforese num gel de poliacrilamida, identificação do fragmento com interesse por comparação da sua mobilidade com a de fragmentos de DNA marcadores de peso molecular conhecido, remoção da secção do gel contendo o fragmento pretendido e separação do gel e DNA. Este processo é conhecido de um modo geral. Por exemplo, ver R. Lawn et al., 1981, "Nucleic Acids Res." 9 : 6103 - 6114, e D. Goeddel et al., 1980, "Nucleic Acids Res." 8 : 4057.

"Análise Southern" é um método pelo qual a presença de sequências de DNA numa digestão ou composição contendo DNA é conformada por hibridação com um oligonucleotídeo ou fragmento de DNA conhecido e marcado. Para os presentes fins, a menos que de outro modo seja determinado, análise Southern significa separação de produtos de digestão em 1 por cento de agarose, desnaturação e transferência para nitrocelulose pelo método de E. Southern, 1975, "J. Mol. Biol." 98 : 503 - 517 e hibridação como descrito por T. Mamiatis et al., 1978, "Cell" 15 : 687 - 701.

"Transformação" significa introdução de um DNA num organismo de modo a que o DNA se replique, quer como elemento extracromossómico quer como parte integrante do cromossoma. A menos que de outro modo referido, o método usado aqui para transformação de E. coli é o método



do CACl_2 de Mandel et al., 1970 , "J. Mol. Biol." 53 : 154 .

"Ligaçāo" refere-se ao processo de ligações fosfodiéster entre dois fragmentos de ácido nucleico de cadeia dupla (T. Mamiatis et al., Id., p. 146). A menos que de outro modo seja referido , a ligação pode ser conseguida usando tampões e condições conhecidas com 10 unidades de ligase do DNA de T4 ("ligase") por 0,5 ug de quantidades aproximadamente equimolares dos fragmentos de DNA a serem ligados .

"Preparação" de DNA dos transformantes significa isolamento do DNA do plasmídeo a partir da cultura microbiana . A menos que de outro modo estabelecido , o método alcalino / SDS de Mamiatis et al., Id . p . 90 , pode ser usado .

"Oligonucleotídeos" são pequenos polideoxinucleotídeos de cadeia simples ou dupla que são obtidos por síntese química por métodos conhecidos e depois purificados em géis de poliacrilamida .

Todas as citações de literatura são incluídas expressamente por referência .

EXEMPLO 1

Ensaios

A actividade específica do factor de necrose tumoral foi determinada por um ensaio de lise celular anteriormente descrito e modificado (B. Spofford , 1974 , "J. Immun." 112 : 2111) . Células fibroblásticas de ratinho L - 929 (ATCC CCL - 929) foram crescidas em placas de 96 poços de fundo plano (3040 : Falcon Plastics,



44.

Oxnard, CA) com 30 000 células (vol 0,1 ml) por poço na presença de 1 μ g / ml de actinomicina D e uma amostra a testar diluída seriadamente (0,125 ml). As células foram incubadas em atmosfera húmida a 37°C com 5 por cento de CO₂.

A amostra a testar foi removida após 18 h, as placas foram lavadas e a lise celular detectada por coloração das placas com uma solução de 0,5 por cento de violeta de cristal em metanol : água (1 : 4) (v/v). A diluição limite nas placas de microtitulação foi determinada por um auto-leitor de Microclisa (Dynatech) regulado para adsorção a 450 nm e transmissão a 570 nm. As células expostas apenas ao meio de cultura foram consideradas como o por cento de lise e as expostas a uma solução 3M de hidrocloreto de guanidina deu uma diluição limite para 100 por cento de lise. Uma unidade de factor de necrose tumoral é definida como a quantidade de factor de necrose tumoral (quando testada num volume de 0,125 ml) necessária a 50 por cento de lise celular.

O factor de necrose tumoral também foi testado num ensaio de necrose tumoral in vivo. Rapidamente, este ensaio foi feito fazendo crescer células de Sarcoma Meth A (5×10^5 células) em ratinhos fêmea CB6F1 (BALB/c x C57BL/6)F₁ durante 7 - 10 dias e depois injeção intratumoral com uma amostra do factor de necrose tumoral. Após 24 Hrs os ratinhos foram mortos por deslocamento cervical, os tumores foram removidos e a necrose foi avaliada histológicamente como já descrito em E. Carswell et al., 1975, "Proc. Nat. Acad. Sci." 72 : 3666 - 3670.



EXEMPLO 2

Utilização do PBLs ou de uma linha celular
monocítica para síntese do factor
de necrose tumoral

Uma linha celular promiclocítica humana HL - 60 em cultura tendo uma densidade de 1×10^5 células / ml foi cultivada em frascos "roller" de 2 litros (890 cm^2) usando 500 ml de meio RPMI1640 (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) contendo HEPES 10mM, B-mercaptopetanol 0,05mM, 100 unidades / ml de penicilina, 100 μg / ml de estreptomicina e 10 por cento de soro fetal de vitela. Após três dias a 37°C quanto a cultura atingiu uma densidade celular de $8 - 12 \times 10^5$ células / ml, as células foram colhidas por centrifugação a 1000 g durante 10 minutos, lavadas duas vezes com meio RPMI1640 sem soro e transferidas para o mesmo meio como descrito acima sem soro numa densidade celular de $15 - 20 \times 10^5$ células / ml.

As células foram crescidas em frascos "roller" de 2 litros na presença de 10 μg / ml de PMA. Após 16 - 24 horas, as células foram removidas por filtração através de um filtro Sealkleen de 3 μm (Pall Trinity Micro Corp. Cortland, NY). O filtrado limpido foi testado quanto à actividade de factor de necrose tumoral e usado para subsequente purificação e caracterização. Este processo produziu cerca de 400 unidades de factor de necrose tumoral / ml, meio de cultura sobrenadante.

Também se usou monócitos de sangue periférico humano para a produção do factor de necrose tumoral. Resíduos de plaquetoferese foram obtidos da American Red Cross, Boston, MA, e usados dentro de 24 horas



46.

após colheita . A separação inicial de monócitos e eritrócitos foi conseguida por centrifugação em gradientes de Fuoll - Hypaque a 1000 g durante 30 minutos .

As células colhidas na interface foram lavadas três vezes com salino tamponado com fosfato .

Monócitos derivados de dadores diferentes foram cultivados separadamente em frascos "roller" de 2 litros em meio RPMI 1640 sem soro a uma densidade celular de $2,5 \times 10^6$ células/ml .

Enterotóxina B de Estafilococcus (SEB) e timosina - 1 recombinante , 1 ug / ml de cada , foram adicionadas à cultura e as células incubadas em atmosfera húmida a 37°C com 10 por cento de CO₂ .

Após 24 - 72 h , dependendo do dador , os sobrenadantes das células foram colhidas e processados de modo idêntico aos derivados da linha celular HL - 60 .

Os rendimentos de factor de necrose tumoral de culturas PBL variam muito , dependendo dos agentes indutores empregues .

A adição de PMA ao sistema de indução descrito acima aumentou a actividade citolítica dos sobrenadantes celulares .

No entanto , os sobrenadantes celulares continham tanto factor de necrose tumoral como linfotóxina (a determinação da linfotóxina ou factor de necrose tumoral em misturas de factor de necrose tumoral e linfotóxina foi feita efectuando o ensaio de lise celular com amostras a testar pré - incubadas com anticorpo



47.

neutralizante de coelho contra factor de necrose tumoral ou linfotóxina e determinação da actividade residual no ensaio de lise celular em L - 929) .

EXEMPLO 3

Cromatografia em pérolas de vidro de poro controlado

A actividade de factor de necrose tumoral da cultura de células foi absorvida a pérolas de vidro de poro controlado (Nº de catálogo 00350 , Electro-Nucleonics , Fairfiel , NJ) equilibrado com tampão fosfato de sódio pH 8,0 por mistura e agitação constante a 4°C .

Usou-se 100 ml de pérolas de vidro por 5 litros de meio .

Após agitação durante uma hora , deixou-se sedimentar as pérolas e o sobrenadante foi removido por decantação .

As pérolas foram colocadas numa coluna 5 x 50 cm à temperatura ambiente e lavadas com tampão de sódio 100mM , pH 8,0 , contendo NaCl 1M .

A actividade de factor de necrose tumoral foi eluída das pérolas de vidro com 20 por cento de polietilenoglicol em tampão fosfato de sódio , 10mM , pH 8,0 , contendo NaCl 1M . 0 perfil



de eluição do sobrenadante de HL - 60 da coluna está apresentado na Fig. 1.

EXEMPLO 4

Cromatografia em DEAE Celulose

O eluato do Exemplo 3 foi aplicado directamente a uma coluna (2,5 x 20 cm) com DEAE celulose 53 (Whatman) equilibrada com tampão fosfato de sódio 10mM a pH 8,0 e 0,01 por cento de Tween 20 , a uma velocidade de fluxo de aproximadamente 500 ml / h . Após ter sido ajustado o fluxo da coluna para 100 ml / h , aplicou-se $4,2 \times 10^6$ unidades do factor de necrose tumoral em 1,080 ml de amostra , a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio e eluída com gradientes crescentes de cloreto de sódio 75mM , 150mM e 500mM em tampão fosfato (pH 8,0) . O eluato foi controlado por absorbância a 280nm e a actividade de factor de necrose tumoral como uma função das fracções de eluição . Os resultados estão apresentados na Fig. 2 .

EXEMPLO 5

Cromatografia Líquida de Alta Velocidade de Proteínas

A fracção activa do factor de necrose tumoral do Exemplo 4 foi concentrada e dializada contra Tris HCL 20mM , ph 8,0 , contendo 0,01 por cento de Tween 20 e azida de sódio 1mM (Tampão A) numa célula de agitação Amicon usando uma membrana YH - 10 ou outra



49.

membrana de diálise com uma exclusão de peso molecular inferior ao do TNF. A membrana foi lavada duas vezes com tampão A.

Uma coluna de grânulos Sepharose substituída com grupos amino quaternário (grânulos de 9,8 μ M numa coluna de 5 x 0,5 cm ; vendida como resina Mono Q , Pharmacia) numa unidade (Pharmacia) de cromatografia líquida de alta velocidade de proteína (FPLC) equipada com um programador de gradientes (GP - 250) e duas bombas (P - 500) foi pré - equilibrada com tampões de diálise aplicados com um fluxo de 1 ml / min como descrito mais detalhadamente em J. Richey , "American Laboratory" , Outubro 1982 , página 1 .

As lavagens reunidas e concentrado da diálise foram aplicados na coluna , a coluna foi lavada com tampão A e depois eluída com um gradiente linear de cloreto de sódio 40 - 75 mM em tampão A . Os gradientes lineares foram programados como se segue : 0 - 5 min tampão de equilíbrio ; 5,1 - 15 min , NaCl 25mM ; 15,1 - 25 min , NaCl 40mM ; 25 - 60 min , gradiente linear de NaCl 40 - 75 mM ; 60 - 65 min NaCl 75 mM ; 65,1 - 70 min NaCl 100mM ; 70 - 80 min , gradiente linear de NaCl 100 - 1000mM ; 80 - 90 min , NaCl 100mM ; 90,1 - 110 min , tampão de equilíbrio . O efluente foi colhido em fracções de 2 ml e controlado por absorbância a 280 nm , conductividade e actividade de factor de necrose tumoral .

Os resultados estão apresentados na Fig. 3 .

EXEMPLO 6

Cromatofocagem



A cromatofocagem foi efectuada usando uma coluna Pharmacia Mono P (20 x 0,5 cm) num sistema FPLC como no Exemplo 5. A fracção biológicamente activa (factor de necrose tumoral) elui nas fracções números 37 a 45 do Exemplo 5, foi concentrada e dializada numa célula de agitação, Amicon com uma membrana YM - 10 contra o tampão de equilíbrio da coluna, i. e., bis-TrisHCl 0,025 M, pH 6,7. A amostra foi aplicada à coluna Mono P à temperatura ambiente a um fluxo de 1 ml / min.

A coluna foi lavada com tampão de equilíbrio até a absorbância a 280 nm retomar a linha de base e depois eluída com um gradiente linear de pH estabelecido por lavagem de coluna com 7,5 por cento de poli tampão 74 a pH 4,7 (Pharmacia) Colheram-se fracções de 1 ml e registada a absorbância a 280 nm e pH do efluente. Os resultados estão apresentados na Fig. 4. Como se pode ver pela Fig. 4, o ponto isoeléctrico do factor de necrose tumoral era de cerca de 5,3.

EXEMPLO 7

Electroforese preparativa em gel de SDS - poliacrilamida.

Prepararam-se géis de quinze por cento de poliacrilamida (11 x 16 cm) com uma espessura de 1,5 - 3,0 mm segundo uma modificação do processo de Laemmli, 1970, "Nature" 227 : 680 - 685. Tanto o gel de separação como o de concentração tinham 0,1 por cento de SDS e 0,05 por cento de Tween 20. Os outros tampões e concentração do reagente de ligação cruzada foram os mesmos dos géis de SDS - PAGE analíticos.



As fracções activas de factor de necrose tumoral dos Exemplos 5 ou 6 foram reunidas, concentradas e dializadas contra Tris-HCl 6,25 mM, pH 7,0, contendo 0,005 por cento de SDS numa célula de agitação Amicon usando membrana YM - 10. Após remoção do concentrado dializado, a membrana foi lavada três vezes com um pequeno volume de tampão de amostra (0,2 por cento de SDS, 0,02 por cento de Tween 20, 30 por cento de glicerol, Tris HCl 0,03M, pH 6,8, 0,005 por cento de corante). O concentrado e lavagens dializados foram reunidos (volume total de 1 - 4 ml), mercaptoetanol adicionado facultativamente para estabelecer as condições de redução do SDS - PAGE e a amostra aplicada num poço largo do gel de concentração.

Pequenos poços adjacentes ao poço de amostra foram usados para os marcadores de peso molecular pré - corados fosforilase a (94 K) albumina de soro bovino (67 K), ovalbumina (43 K), anidrase carbónica (30 K), inibidor da tripsina de soja (20 k) e lisozima (14,4 k). Os géis correram num sistema de electroforese vertical Biorad arrefecido para 12°C, a uma corrente constante de 20mA por mm de espessura do gel até o corante atingir o fundo do gel.

Após electroforese uma das placas de vidro foi retirada do gel e anotadas as posições dos marcadores de pesos moleculares. A faixa contendo a amostra aplicada de factor de necrose tumoral foi então cortada em secções de 0,25 cm de acordo com os pesos moleculares das proteínas marcadoras. Estas fatias do gel foram então colocadas em tubos de polipropileno contendo 1 - 2 ml de bicarbonato de amónio 10mM e 0,01 por cento de Tween 20, pH 8 e deixadas eluir durante 16 h a 24°C. Os eluatos foram então testados quanto à actividade de factor de necrose tumoral e os resultados apresentados na Fig. 5.



52.

O peso molecular do factor de necrose tumoral em gel de SDS era de cerca de 17 000 em condições redutoras e não redutoras indicando assim uma molécula de cadeia única .

A proteína foi recuperada a partir do eluato das fatias de gel sem sais e sem substâncias de baixo peso molecular através do seguinte tratamento : Preparam-se pequenas colunas contendo 0,2 ml de resina Sep - pak C 18 , que tinha sido pré - lavada com acetoni trilo , 1-propanol , 1 por cento de ácido trifluoracético (TFA) e água destilada e depois equilibradas com bicarbonato de amónio 10mM contendo 0,01 por cento de Tween 20 , pH 8,0 . O eluato do gel foi aplicado à coluna e o efluente colhido .

A resina foi então lavada com água destilada e 0,1 por cento de TFA , 0,5 ml de cada , para remover os aminoácidos livres e os sais dos tampões . O factor de necrose tumoral foi eluido da resina com 1ml de 1-propanol a 50 por cento em 0,1 por cento de TFA . Foram também efectuadas outras eluições com 50 por cento de 1-propanol em 1 por cento de TFA e 99 por cento de 1-propanol em 1 por cento de TFA , 1 ml de cada , mas a proteína foi geralmente eluída com o primeiro tampão . Aproximadamente 80 por cento da bioactividade do factor de necrose tumoral foi inactivada neste passo . Se bem que o factor de necrose tumoral assim obtido possa ser empregue para análise de sequências é preferível usar para análise de sequências é preferível usar para este fim o efluente de HPLC descrito abaixo no Exemplo 8 .

EXEMPLO 8

Cromatografia líquida de alta pressão



O peso molecular do factor de necrose tumoral intacto nativo foi determinado por cromatografia de permeação em gel de alta pressão. Esta última foi efectuada à temperatura ambiente usando uma coluna de HPLC com gel TSK G-2 000 SW (Alltech Associates, Deerfield, IL) (7,5 x 60 mm).

Uma amostra de um ml de factor de necrose tumoral do Exemplo 5 contendo aproximadamente 1 ug de proteína e 15 600 unidades de actividade foi eluída isocráticamente da coluna de gel a um fluxo de 0,5 ml / min, com tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,0. A coluna foi calibrada com albumina do soro bovino (PM 66 000), ovalbumina (PM 45 000), anidrase carbónica bovina B (PM 29 000) e lisozina (PM 14300). Obtiveram-se fracções de um ml que foram testados quanto à actividade de factor de necrose tumoral. As fracções com actividade de factor de necrose tumoral eluiram de acordo com um peso molecular de $45\ 000 \pm 6\ 000$ (Fig. 6.)

EXEMPLO 9

HPLC de fase reversa

O factor de necrose tumoral também foi purificado por HPLC de fase reversa usando colunas Synchropak C4 no sistema de cromatografia da Water's Associates, Inc. como já descrito (W. Kohr *et al.*, 1982, Anal. Biochem., 122 : 348 - 359). Os picos de proteína foram detectados a 210 nm e a 280 nm após eluição com um gradiente linear de 1 a 23 por cento v/v de 1-propanol em 0,1 por cento de TFA aquoso nos primeiros 15 minutos e 23 - 30 por cento v/v de 1-propanol em 0,1 por cento de TFA durante 15 minutos seguintes num



fluxo de 1 ml por minuto .

Os picos foram testados quanto à actividade citolítica . Os solventes orgânicos empregues na eluição do factor de necrose tumoral da coluna C4 reduziram a actividade de factor de necrose tumoral em cerca de 80 por cento . O factor de necrose tumoral purificado por este método foi seco sob vácuo e depois processado para a análise de aminoácidos e sequenciação . Os resultados estão registados nas Fig. 7 . A fig. 7. mostra que o factor de necrose tumoral obtido no efluente do Exemplo 5 continha contaminantes proteicos biológicamente inactivos eluindo a cerca de 16 e 19 minutos de tempo de retenção . O efluente bioactivo da HPLC - C4 - RP era substancialmente homogéneo , pelo critério da sequência da terminação amínica .

EXEMPLO 10

Determinação da sequência de aminoácidos parcial do factor de necrose tumoral

O factor de necrose tumoral foi digerido com tripsina como se segue : Factor de necrose tumoral homogéneo do Exemplo 9 foi dissolvido , seco e dissolvido de novo em tampão bicarbonato de amónio 100 mM pH 8,0 contendo 5 por cento p/p de tripsina TPCK (Worthington Biochemicals) , CaCl_2 1 mM e 0,01 por cento de Tween-20 numa proporção de enzima para substrato de 1 : 20 , incubado durante 6 horas a 37°C , adicionou-se mais tripsina a 5 por cento p/p e a mistura de hidrólise foi ainda incubada durante 12 horas a 37°C . A mistura de reacção foi aplicada a HPLC C4 como descrito acima para separar os fragmentos peptídeos . Os resultados estão apresentados na Fig. 8 .



Um total de 9 fragmentos foram observados (fragmentos 2 e 2' eluiram juntos no pico designado por T2 na Fig. 8). Um décimo fragmento adicional crê-se não ser retido pela coluna. As sequências de aminoácidos para o factor de necrose tumoral intacto dos Exemplos 8 e 9 e dos fragmentos de hidrólise com tripsina obtidos neste Exemplo foram determinadas por degradação sequenciada automática de Edman usando um sequenciador Beckman modificado modelo 890 B equipado com Cold traps.

Usou-se como veículo no copo polibreno (1,25 mg). Com base na composição em aminoácidos da molécula intacta, o peso molecular do factor de necrose tumoral intacto é de 17 000. Este número está de acordo com os resultados de SDS - PAGE e constitui a confirmação da ausência de glicosilação.

EXEMPLO 11

Acção sinergística do factor de necrose tumoral e interferão gama

Células de membrana murino B 16 (Mason Research, Worcester, MA) uma linha celular de origem C57BL/6, foram semeados numa placa de microtitulação a 5 000 células / poço e incubadas durante 4 horas a 37°C numa câmara humidificada com 5 por cento de CO₂ antes da adição das linfocinas. O factor de necrose tumoral obtido no Exemplo 1 foi purificado até homogeneidade substancial por HPLC e quantificado através da sua actividade no bioteste acima descrito relativamente à citólise de células L929. De modo idêntico, o interferão gama murino recombinante purificado (P. Gray *et al.*, 1983,



"Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A." 80 : 5842 - 5846) foi testado pela sua actividade antiviral contra células L infectadas com EMC (D. Goeddel et al., 1980, "Nature" (London) 287 : 411 - 416) . O interferão gama murino e o factor de necrose tumoral humano foram diluídos separadamente para as diluições apresentadas na fig. 10 . Adicionou-se primeiro aos referidos poços o interferão gama e imediatamente a seguir adicionou-se o factor de necrose tumoral , para um volume final de 0,2 ml/poço. Ao fim de 72 horas de incubação, as células foram coradas com 0,5 por cento de violeta de cristal em 20 por cento de metanol .

Os resultados estão apresentados na Fig. 10 . B 16 é relativamente resistente tanto ao factor de necrose tumoral como ao IFN - 8 sózinhos ; a 1 000 unidades / ml do factor de necrose tumoral não é observada citólise detectável . No entanto a adição de quantidades muito pequenas de interferão gama (quantidades tão pequenas como seja 5 unidades / ml) resultou em citólise .

EXEMPLO 12

Isolamento de RNA mensageiro

RNA total de culturas de células HL - 60 (4 horas após indução com PMA) ou de monocitos do sangue periférico cultivadas como descrito no Exemplo 2 foi extraído essencialmente como divulgado por Ward et al., 1972 , "J. Virol." 9 : 61 . As células foram sedimentadas por centrifugação e depois ressuspensas em NaCl 10 mM , Tris - HCL 10 mM , pH 7,5 , MgCl₂ 1,5 mM . As células foram lisadas pela adição de NP40 (1 por cento final) e os núcleos foram sedimentados por centrifugação .



57.

O sobrenadante continha o RNA total que foi posteriormente purificado por múltiplas extrações com fenol e clorofórmio. A fase aquosa foi tornada 0,2 M em relação a NaCl e depois o RNA total foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol.

Um rendimento típico a partir de 1 grama de células em cultura foi de cerca de 6 miligramas do RNA total. O mRNA poliadenilado (cerca de 100 µg) foi obtido com oligo (dT) celulose pelo método de H. Aviv *et al.*, 1972, "Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A." 69 : 1408 - 1412.

EXEMPLO 13

Biblioteca de cDNA

7,5 µg de mRNA poli(A)⁺ do Exemplo 12 foram convertidos em cDNA de cadeia dupla pela actuação sucessiva de transcriptase reserva, fragmento klenow da polimerase do DNA e nuclease S1 (P. Gray *et al.*, 1982, "Nature" 295 : 2483 - 2495). A partir de um gel de poliacrilamida isolou-se cerca de 80 ng de cDNA tendo um comprimento superior a 600 pb.

A sequência adaptadora de DNA sintético 5'AATTCATGGCGTTCTTACAG 3'

3'GTACGCAAGAATGTC 5'

foi ligada ao cDNA para criar extremidades coesivas Eco RI. Como habitualmente, o adaptador foi sintetizado quimicamente como duas cadeias separadas, a extremidade 5' de uma das cadeias foi fosforilada com cinase de polinucleotídeos e as duas cadeias emparelhadas.



58.

O cDNA (20 ng) foi então isolado de novo a partir de um gel de poliacrilamida, inserido por ligação a λ - 10 digerido com EcoRI, encapsulado em partículas fágicas e propagado em E. coli estirpe C 600 hfl (Huynh et al., 1984, Practical Approaches in Biochemistry, IRL Press Ltd., Oxford England) ou outra estirpe conhecida adequada à propagação de fago lambda. Obteve-se uma biblioteca de cDNA de cerca de 200 000 clones independentes.

EXEMPLO 14

Preparação de uma sonda de deoxi oligonucleotídeo para o cDNA do factor de necrose tumoral

Uma sonda para hibridação de DNA com 42 nucleotídeos, com base na sequência de aminoácidos preliminar do peptídeo triptico TD - 6 (E-T-P-E-G-A-E-A-K-P-W-Y-E-K-) do factor de necrose tumoral foi projectado com base nas frequências de utilização de codões publicadas (R. Grantham et al., 1981, "Nucleic Acids Res. " 9 : 43 - 74), e a tendência ("bias") de codões do TFN-Y humano (P. Gray et al., 1982, "Nature" 295 : 503 - 508) e da linfotoxina humana.

A sequência preliminar estava errada (o K final deveria ser P). Apesar disto esta sequência permitiu obter uma sonda satisfatória. A sonda sintética tinha a sequência

5' dGAAACCCCTGAAGGGCTGAAGCCAAGCCCTGGTATGAAAAG 3'
e foi sintetizada pelo método de R. Crea et al., 1980, "Nucleic Acids Res." 8 : 2331 - 2348. A sonda foi fosforilada com (γ - 32 P) ATP e cinase de polinucleotídeos de T4 como anteriormente descrito (Goeddel et al., 1979, "Nature" 281 : 544).



EXEMPLO 15

Identificação de um clone de cDNA contendo sequências codificadoras do factor de necrose tumoral

Cerca de 200 000 fagos recombinantes de biblioteca de cDNA λ gt - 10 foram testadas por hibridação de DNA usando 42 - mero do Exemplo 14 marcado com ^{32}P nas condições de baixa rígidez (Stringevey) segundo A. Ulbrich et al., 1984, "EMBOJ." 3 : 361 - 364 (ou como alternativa P. Gray et al., 1983, "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A." 80 : 5842 - 5846, S. Anderson et al., 1983, "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A." 80 : 6836 - 6842 e M. Jaye et al., 1983, "Nucleic. Acids. Res." 11 : 2325 - 2335) . Nove clones distintos hibridaram com a sonda e foram purificados por placa . Em seguida preparou - se cDNA marcado com ^{32}P usando mRNA de células HL - 60 não induzidas .

DNA de sete destes nove clones de fago não hibridaram com esta sonda "não induzida" e foram portanto , considerados candidatos a sequências de cDNA do factor de necrose tumoral . O clone de cDNA contendo a inserção maior foi designado por λ 42 - 4 . Esta inserção foi sequenciada pelo método de terminação de cadeias dideoxi (A. Smith , 1980 , "Methods in Enzymology" 65 : 560 - 580 e F. Sanger et al., 1977 , "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A." 74 : 5463 - 5467) após subclonagem no vector M13np8 (J. Messing et al., 1981 , "Nucleic Acids Res." 9 : 309 - 321) .

A sequência de cDNA obtida a partir de λ 42 - 4 continha toda a região codificadora do factor de necrose tumoral maduro mais uma parte do seu peptídeo sinal .



60.

A orientação e fase de leitura correctas do DNA foram deduzidas por comparação com a sequência de aminoácidos do peptídeo tríptico T4 do factor de necrose tumoral. O resíduo valina da terminação amínica do factor de necrose tumoral determinado por sequenciação da proteína está indicado como aminoácido 1 e é seguido de mais 156 aminoácidos antes de se encontrar um codão de paragem na mesma fase de leitura. O peso molecular calculado é de 17 356 daltons.

EXEMPLO 16

Identificação de um clone de cDNA contendo sequências codificadoras completas do Pre TNF

O clone de cDNA λ 42 - 4 contém toda a razão codificadora do TNF maduro mas não possui uma sequência completa codificadora do peptídeo sinal como é evidenciado pela ausência de um codão de iniciação. Para se obter a informação da sequência que falta, o iniciador de hexadecanucleotídeo

dTGGATGTTCGTCCTCC (complementer dos nucleotideos 855 a 870, Fig. 10) foi obtido por síntese química. Este iniciador foi emparelhado com o mRNA do Exemplo 12 e seguidamente o cDNA foi sintetizado usando o método do Exemplo 13. Preparou-se uma nova biblioteca de cerca de 200 000 clones de cDNA em λ gt - 10 seguindo o método descrito no Exemplo 13.

Esta biblioteca foi testada por análise de hibridação usando como sonda a inserção de cDNA do λ 42 - 4 que foi marcada com ^{32}P . Obtiveram-se dezasseis clones positivos, o maior deles (λ 16 - 4)



61.

possuia uma inserção de cDNA abrangendo mais 337 pb na direcção 5' que a inserção de λ 16 - 4 . A sequência composta das inserções de cDNA de TNF do λ 16 - 4 (nucleotídeos 1 - 870) e do λ 42 - 4 (nucleotídeos 337 - 1643) está apresentada na Fig. 10 .

EXEMPLO 17

Construção de um vector de expressão para expressão directa do factor de necrose tumoral

O processo usado para expressar a sequência de cDNA do factor de necrose tumoral obtido no Exemplo 15 está descrito na Fig. 11 . o fago λ 42 - 4 do Exemplo 15 , contendo a totalidade da sequência codificadora do factor de necrose tumoral maduro e uma parte do condutor de secreção putativo do factor de necrose tumoral, foi digerido com EcoRI e recuperado um fragmento com aproximadamente 800 pb contendo a região codificadora do factor de necrose tumoral . Este fragmento foi digerido com Ava I e Hind III e recuperado um fragmento de 578 pb (designado "C" na Fig. 11) . Este fragmento codifica os aminoácidos 8 - 157 do factor de necrose tumoral .

Prepararam-se dois deoxi oligonucleotídeos sintéticos (designados fragmento "B" na Fig. 11) (ver a construção da sequência adaptadora no Exemplo 13) que incorporarem uma terminação coesiva Xba I no extremo 5" , uma terminação coesiva Ava I no extremo 3' , um codão de iniciação met e codões para os sete primeiros aminoácidos da terminação amílica do factor de necrose tumoral .

Os codões para estes aminoácidos



foram escolhidos com base na preferência de E.coli . A sequência AATT a montante do codão de iniciação foi seleccionada para separar adequadamente o codão de iniciação da sequência de ligação ao ribossoma do Trp e em combinação com os codões de aminoácidos , para eliminar uma potencial ansa no RNA mensageiro .

Os segmentos B e C são então ligados numa mistura de ligação de três elementos com um derivado do pBR 322 contendo a sequência promotora do trp com a sequência Shine - Dalgarno do peptídeo condutor do trp Publicado no Pedido de Patente Europeia Nº. 36776) . O derivado é obtido ou projectado de modo a possuir locais únicos Xba I e Hind III entre o promotor do trp e o gene Tet^R .

Tanto pLT trp 1 (Gray et al. , 1984 , "Nature" 312 : 721 - 724) como ptrpETA (Gray et al. , 1984 , "Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A." 81 : 2645-2649) são adequados como vectores de partida deste tipo , se bem que outros possam ser construídos a partir do pBR 322 , o promotor do trp e quaisquer adaptadores sintéticos necessários . Tanto o pBR 322 como plasmídeos possuindo o promotor Trp estão disponíveis ao público .

A porção de pBR 322 do vector escolhido poderá ter eliminado o segmento Ava I - Fvu II entre os pares de bases 1424 e 2065 (designado "XAP" no nome do plasmídeo) . Qualquer um dos plasmídeos precedentes são degeridos simultâneamente com Xba I e Hind III e recuperado o fragmento maior vector . Este fragmento e os fragmentos B e C são ligados com ligase de DNA de T4 e a mistura de ligação usada para transformar E. coli 294 (ATCC 31446) . Foram seleccionadas as colónias resistentes à ampicilina , o DNA de plasmídeo recuperado e caracterizado fazendo o mapa de restrição e sequenciação do DNA



Obteve-se pTrpXAPTNF que possuia as inserções B e C.

EXEMPLO 18

Expressão do factor de necrose tumoral em *E. coli*

E. coli ATCC 31 446 transformada com pTNFtrp foi crescida em meio M9 contendo 20 μ g / ml de ampicilina e a cultura crescida até $A_{550} = 0,3$. Adicionou-se ácido indoloacético para uma concentração final de 20 μ g / ml e a cultura crescida até $A_{550} = 1$. 10 ml de células foram concentrados e ressuspensos em tampão fosfato salino. As células foram sonicadas e diluídas para determinação do factor de necrose tumoral pelo ensaio do Exemplo 1.

Obtiveram-se cerca de 10^5 unidades de actividade por ml de cultura. Esta actividade foi neutralizada por pré-incubação com anti-soro de coelho imunizados contra factor de necrose tumoral humano.

EXEMPLO 19

Expressão do factor de necrose tumoral em *E. coli*

Este método é preferido relativamente ao do Exemplo 18.

De preferência, o hospedeiro a usar com os vectores atrás referidos é uma estirpe de *E. coli* ton A não revertível. Tais estirpes são resistentes aos bacteriófagos e portanto de longe mais adequadas à cultura



em larga escala do que as estirpes selvagens. Segue-se uma descrição de um método adequado à obtenção de uma dessas estirpes. E. coli W3110 é traduzida com : Tn 10, um bacteriófago lambda contendo o transposão Tn 10, para originar um "hop pool" de Tn 10 de E. coli W31110. (N. Klecker et al., 1977, "J. Mol. Biol." 116 : 125).

O "hop pool" de E. coli W3110 : Tn 10 é cultivado em caldo L a 37°C até uma densidade celular de 1×10^9 / ml. 0,5 ml da cultura é centrifugado e o sedimento ressuspenso em 0,2 ml de um lisado de phi80 (ou T1) contendo $7,0 \times 10^9$ pfu. o fago é deixado adsorver durante 30 minutos a 37°C. A suspensão é então espalhada em placas EMB suplementado com tetraciclina (15 ug / ml).

Após uma incubação durante a noite a 37°C, as colónias rosa claro foram reunidas em 3 ml de caldo L, crescidas durante a noite a 37°C, lavadas duas vezes e ressuspensas em caldo L. Esta cultura é infectada com bacteriófago P1 Kc e o lisado de fagos recuperado (J. Miller, 1972, Experiments in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, p 304).

E. coli AT982 (nº 4546, E. coli Genetic Stock Center, New Haven, Conn.) é transduzida para resistência à tetraciclina por este lisado de P1 Kc. As bactérias transduzidas são seleccionadas em placas de meio L suplementado com tetraciclina (15 μ g / ml) e (40 μ g / ml) dap (ácido diaminopimélico). As bactérias transduzidas resultantes são testadas relativamente à resistência à tetraciclina e regeneração do gene dap (dap⁺, Tet^R). As bactérias transduzidas dap⁺, tet^R são então testadas quanto à resistência ao phi 80 (ou T1).

Fazem-se então lisados de P1 Kc em várias estirpes resistentes a phi 80 (ou T1) dap⁺, tet^R.



65.

Os lisados são usados para fazer transdução de E. coli W3110 para resistência à tetraciclina. As bactérias transduzidas são testadas e seleccionadas quanto à resistência a λ phi 80 (T1).

Os isolados sensíveis à tetraciclina são seleccionados a partir de bactérias transduzidas W3110 fhu A : Tn 10 - λ phi 80R (S. Naloy et al., 1981, "J. Bact," 145 : 1110). Estes isolados são testados quanto à resistência ao fago λ phi:80 e sensibilidade à tetraciclina após purificação de colónias isoladas.

Isolou-se DNA de vários mutantes resistentes ao fago λ phi80 e sensíveis à tetraciclina e digeriu-se com Set II. O DNA digerido com Set II já caracterizado pelo processo de transferência de Southern usando como sonda DNA de λ : Tn 10 digerido com Sst II e marcado radioactivamente, para determinar se Tn 10 foi excisado (R. Davis et al., 1980, Advanced Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory).

Um dos isolados sensíveis à tetraciclina verificou-se ter perdido duas das bandas de hibridização com Tn 10 quando comparado com a hibridação entre DNA de λ : Tn 10 e W3110 fhuA:: Tn 10 λ phi 80R parental. Uma terceira banda de hibridação tem a mobilidade alterada indicando que se deu uma eliminação causada por excisão imprecisa de Tn 10.

Electroforese em gel - SDS de preparação de membrana externa da estirpe com excisão de Tn 10 revelou que a banda que se assumiu ser a proteína fhu A tem uma mobilidade electroforética alterada quando comparada com a proteína fhu A tipo selvagem. A proteína resultante não é funcional como proteína receptora do fago λ phi 80.



66.

uma segunda estirpe independente que também sofreu excisão imprecisa de Tn 10 não apresenta proteína fhu A no gel com SDS .

Nenhuma destas estirpes demonstrou reversão da resistência à tetraciclina ou susceptibilidade a λ phi:80 indicando que existe uma excisão imprecisa de todo ou parte do transposão Tn 10 juntamente com uma eliminação parcial ou completa do gene fhu A .

De preferência uma dessas estirpes W3110 (N L 106) é usada como o hospedeiro para veículos codificadores de TNF descritos aqui algures .

N L 106 foi transformada com pptrpXAPTNF e inoculada em 10 litros de um meio com pH 7,4 tendo a seguinte fórmula :



67.

Componente	gms / L
------------	---------

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0
------------------------------	-----

K_2HPO_4	6,0
--------------------------	-----

Na_2HPO_4	3,0
---------------------------	-----

Na Citrato	1,0
------------	-----

L-triptofano	0,2
--------------	-----

NZ Amina AS	4,0
-------------	-----

Extracto de levedura	4,0
----------------------	-----

NgSO_4	1,2
-----------------	-----

glucose	25,0
---------	------

Solução de micronutrientes

(iões Fe, Zn, Co, Mo,

Cu, B e Mn) 0,5 ml

Tetraciclina 1,0 mg



Adicionou-se glucose à cultura a uma velocidade de 1 g / minuto quando a A_{550} da cultura atingiu cerca de 20 .

A fermentação foi conduzida a 37°C até um A_{550} de 136 ser atingido (cerca de 20 horas).

A cultura é centrifugada para formar uma pasta celular e a pasta é seguidamente extraída durante 30 min ., a pH 8,0 e à temperatura ambiente com um tampão contendo Tris 50mM , EDTA 10mM , NaCl 100mM , ureia 200mM e 0,1 por cento de beta-mercaptoetanol .

O extracto foi diluído e testado como descrito no Exemplo 1 .

Neste ensaio 1×10^8 unidades de actividade de factor de necrose tumoral foi estabelecido como equivalente a 1 mg de factor de necrose tumoral .

Obteve-se até cerca de 2 gramas de factor de necrose tumoral por litro de cultura .

A sequenciação da terminação amínica demonstrou que cerca de 75 a 86 por cento por peso era factor de necrose tumoral (maduro) com valilo na terminação amínica , o restante era



met - TNF . Ainda , além dos níveis elevados de expressão a proteína não estava presente em corpos refractáveis , nem pareceu ser tóxica para as células como evidenciado pelas densidades celulares extremamente altas que se obtiveram .

EXEMPLO 20

Construção e expressão de um gene mutante do factor de necrose tumoral

Neste exemplo foram repetidos os Exemplos 17 - 18 exceptuando o fragmento oligonucleotídeo B ter sido sintetizado com um codão histidina CAT em vez do codão de arginina 6 CGT . O mutante de necrose tumoral foi expresso .

EXEMPLO 21

Construção e expressão de um outro gene mutante do factor de necrose tumoral

Neste exemplo , o processo dos Exemplos 17 - 18 foi repetido com um fragmento oligonucleotídeo B codificador de leucina (CTT) em vez do codão do resíduo 2 arginina . Obteve-se cerca de 1200 mg de actividade de TNF maduro por litro de cultura nos ensaios iniciais . Não se detectou na cultura TNF não processado .



70.

EXEMPLO 22

Construção de um vector codificador de um produto de fusão do factor de necrose tumoral com uma sequência sinal de secreção

A sequência do gene da enterotoxina ST II estável ao calor de E. coli está descrita em Picken et al., 1983, "Infection and Immunity." 42(1) : 269 - 275. Neste Exemplo um fragmento contendo a sequência sinal de secreção e a sequência de Shine - Dalgarno de ST II foi ligado a jusante do promotor da fosfatase alcalina de E. coli.

O sinal de ST II é seguido na direcção 3' de um oligonucleotídeo sintético que fornece codões para os sete aminoácidos iniciais da terminação amínica do factor de necrose tumoral e o resto da sequência codificador do factor de necrose tumoral. Todas as sequências precedentes foram montadas num vector pBR322.

pWM501 (Picken et al., 1983, "Infection and Immunity" 42(1) : 269 - 275) possui o gene ST II. pWM501 foi digerido com Xba I e Nsi I e isolou-se o fragmento com cerca de 90 pb. Este fragmento também podia ser obtido por síntese orgânica segundo métodos conhecidos per se (fragmento A).

Um plasmídeo pBR322 - Trp como descrito no Exemplo 17 (p20KLT) foi digerido com Xba I e Hind III e o fragmento vector maior recuperado (fragmento B). Este fragmento possui uma origem de replicação de E. coli e um gene que confere o fenótipo de resistência à ampicilina.



Sintetizou-se um oligonucleotídeo sintético como duas cadeias que se emparelharam para dar a estrutura que se segue (as extremidades coesivas de enzimas de restrição e os aminoácidos codificados pelo oligonucleotídeo estão também indicados) .

	VAL	ARG	SER	SER	SER	ARG	TRE	
5'	GTA	CGT	TCT	TCT	TCT	CGT	ACT	3'
	<u>ACGT</u>	CAT	ACG	AGA	<u>AGH</u>	AGA	GCA	TGA
	Nsi I							Ava I

Isto é designado por fragmento C. pTNF trp do Exemplo 18 foi digerido com Ava I e Hind III. O fragmento Ava I - Hind III de 578 pb (fragmento D) foi recuperado. Ele possui toda a sequência codificadora do TNF exceptuando os sete primeiros aminoácidos.

Uma sequência de DNA compreendendo um promotor da fosfatase alcalina (AP) de E. coli ligado a uma sequência de Shine - Dalgarmo (SD) heteróloga (trp) e tendo extremidades Eco RI e Xba I foi construída como se segue . Um fragmento de DNA contendo uma parte do promotor AP foi isolado a partir do plasmídeo pHI - 1 (H. Inouye et al., 1981 , "J. Bacteriol." 146 : 668 - 675) , podendo , porém , ser usada qualquer outra fonte adequada contendo DNA promotor AP. pHI - 1 foi digerido com Hpa I para abrir o plasmídeo , um adaptador sintético Eco RI GAATCGAATC

CTTAGCTTAG Ligado ao plasmídeo e o plasmídeo com adaptadores digerido com um excesso de Eco RI para cortar todos os locais Eco RI e com uma actividade Rsa I deficiente para cortar apenas parcialmente os locais Rsa I (os passos com Eco RI e Rsa I também podem ser feitos sequencialmente em vez de simultaneamente) . Um fragmento de 420 pb contendo o promotor AP foi recuperado a partir da digestão Eco RI-



-Rsa I parcial .

Uma sequência S.D. trp foi obtida como se segue . Um plasmídeo ou organismo possuindo o promotor trp (pIFN - beta 2 , D . Leung et al., 1984 , "Biotechnology" 2 : 458 - 464) foi digerido com Xba I e Rsa I e o fragmento de 30 pb recuperado o qual contém a sequência S.D. trp . Este fragmento foi ligado ao fragmento com o promotor AP de 420 pb para dar um fragmento E Eco RI - Xba I de 450 pb . O fragmento E tem a sequência do nucleotídeos

EcoRI

GAATTCAACTTCTCCATACTTTGGATAAGGAAATACAGACATGAAAATCTCATTGCTGAGTTGTTATT
AAGCTTGCCCCAAAAGAAGAAGAGTCGAAAGAACTGTGTGCGCAGGTAGAAGCTTGGAGATTATCGTCA
CTGCAATGCTTCGCAATATGGCGAAAATGACCAACAGCGGTTGATTGATCAGGTAGAGGGGGCGCTGTA
CGAGGTAAAGCCCGATGCCAGCATTCTGACGACGATACTGGAGCTGCTGCGCATTACGTAAGAAGTTA
TTGAAGCATCCTCGTCAGTAAAAGTTAATCTTTAACAGCTGTCAAAAGTTGTACGGCCGAGACTT
trpS.D. XbaI
ATAGTCGCTTGTTTTATTTTTAATGTATTTGTACGCAAGTTCACGTAAGGTTATCTAGA

Os fragmentos A , B , C e D foram ligados numa ligação de quatro partes e a mistura de ligação usada para transformar E. coli 294 . Os transformantes foram identificados por crescimento em placas LB contendo ampicilina . O plasmídeo trp STIITNF foi isolado a partir de uma colónia transformante . Este plasmídeo foi digerido com Xba I e Eco RI para remover o promotor trp, depois ligado ao fragmento E Eco RI - Xba I de 450 pb contendo o promotor da fosfatase alcalina de E. coli .



O plasmídeo resultante é designado pAPSTII TNF .

EXEMPLO 23

Expressão e processamento de um produto de fusão do
factor de necrose tumoral com uma sequência
sinal de secreção

E. coli NL106 foi transfectada com pAPSTII TNF é inoculada em 10 litros de meio a pH 7,0 tendo a seguinte fórmula :

Componente	gms / L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0
K_2HPO_4	2,6
NaH_2PO_4	1,3
Na Citrato	1,0
KCl	1,5
NZ Amina AS	5,0
Extracto de Levedura	2,0
MgSO_4	1,2
Glucose	25,0
Solução de Micronutrientes (iões Fe, Zn, Co, Mo, Cu B e Mn)	0,5 ml
Ampicilina	20,0 mg



74.

A cultura foi feita como descrito acima no Exemplo 19, exceptuando ter-se atingido um valor de A_{550} de 140. Neste ponto a cultura continha cerca de 400 mg de factor de necrose tumoral / litro, cerca de 70 - 80 por cento por peso da qual foi correctamente processado em proteína madura conforme estimado por electroforese em gel.

Aproximadamente a mesma actividade de factor de necrose tumoral foi recuperada quando da extração de células totais pelo método usado no Exemplo 19 como foi recuperada por choque osmótico das células.

EXEMPLO 24

Construção e expressão de mais derivados do factor de necrose tumoral

Os derivados mutantes da sequência de aminoácidos de TNF da Fig. 10. são preparados para satisfazer um ou mais dos seguintes objectivos: Aumentar a semi-vida in vivo, aumentar a actividade citolítica, aumentar a actividade citolítica diferencial em células tumorais versus células normais, preparar imunogénios de TNF para fazer anticorpos anti-TNF para fins de diagnóstico, projectar locais únicos para modificação covalente (por exemplo onde as marcações com enzimas são feitas covalentemente na preparação do reagentes de diagnóstico para EMIT ou ELISA) e alterar as propriedades físicas do TNF, e.g., a sua solubilidade, pI e similares. A determinação da actividade pretendida em derivados é determinada por testes de rotina adequados conhecidos per se.

De preferência TNF e os seus derivados não incluem TNF tendo uma sequência correspon-



75.

dente à de não primatas , também de preferência não terá terminações amínicas que não sejam de primatas , e.g., a terminação amínica des Val Arg característica do que foi referido como factor de necrose tumoral de coelho nem a terminação amínica do gene de TNF identificado como tendo a sequência Val - Arg - Ser - Arg - Tre - Pro - Ser - Asp - Lis - Pro - Val - Ala - Val - Ser - Val - Ala - Asn - Pro - Aln - Ala - Glu - Gli - (Wang et al., "Science" 228 : 149 - 154 , 1985) .

O método que se segue , baseado em J. Adelman et al. , "DNA" 2 (3) : 183 - 193 , é geralmente aplicado à construção e expressão de quaisquer sequências mutantes de DNA de TNF contendo mutações silenciosas ou codificadoras de TNF mutante .

Para evitar redundância , são ilustrados derivados representativos em que Arg 32 é convertida em histídilo (uma substituição) , His 73 é eliminada (uma mutação por eliminação) e leucilo é ligado a Leu 157 (uma inserção) . Como se sabe todas as outras espécies mutantes podem igualmente ser produzidas do mesmo modo .

São conhecidas na especialidade outros métodos adequados à criação de mutações silenciosas ou expressas no DNA codificador do factor de necrose tumoral . Por exemplo , DNA mutante é construído simplesmente através da síntese química de toda a sequência ou pela síntese de apenas uma parte da sequência e ligação do fragmento ao restante DNA necessário .

A síntese química do DNA é vantajosa quando o técnico pretende preparar o mutante directamente sem primeiro obter DNA codificador do factor de necrose tumoral a partir de fontes naturais . Geralmente , no entanto , o DNA de partida codificará a sequência de



aminoácidos natural , incluindo os seus variantes alélicos e pretender-se-à preparar a partir certos derivados mutantes.

É desejável na preparação do DNA codificador de derivados mutantes de TNF que as alterações dos codões não sejam feitas de modo a criar a oportunidade de o mRNA transcrito formar fortes estruturas do tipo anse pedunculada . Quando se evita tais estruturas obtem-se melhores rendimentos . Em adição , os codões preferidos pelo hospedeiro transformado deverão ser usados pela mesma razão .

DNA de partida adequado é o fragmento Eco RI HindIII do ptrpXAPTNF (Exemplo 17) obtido por digestão sequenciada com Eco RI e Hind III . Este fragmento possui o promotor trp e o gene estrutural de factor de necrose tumoral metionilado . Para obter uma cópia de cadeia simples deste gene adequada para mutagénese , o fragmento Eco RI - Hind III é clonado no local de poliadaptador do DNA do fago M 13 mp8 RF (J. Messing et al., 1982 , "Gene" 19 : 269 - 276 ; "RF" significa forma replicativa do fago ; este fago pode ser obtido comercialmente .

Uma pequena quantidade da mistura de digestão com Eco RI - Hind III é adicionada à reacção de ligação contendo 10 ng de DNA de M13 mp8 RF que foi previamente digerido com Eco RI e Hind III . Após incubação à temperatura ambiente durante 2 hr , a mistura de ligação é usada para transformar E. coli JM 103 (uma estirpe que se pode obter comercialmente) ; também se pode usar JM101) .

As células transformadas são semeadas com agar superficial contendo X - GAL (dibromo-dicloro-indolil-galactosídeo) e IPTG (isopropiltiogalactosídeo) . As culturas bacterianas (1 ml) infectadas com fago retirado de placas incolores são usadas para isolar DNA de



M13 mp8 / TNF RF por um processo de mini - rastreio (Birnboim e Doly , 1980 , "Nuc. Acids Res" 7 : 1513 - 1523) . O fago recombinante resultante M13 mp8 / TNF transporta a cadeia codificadora do gene TNF .

Para a mutagénese dirigida , sintetizam-se oligodeoxirribonucleotídeos (mutagénese com oligómeros) com uma sequência complementar de segmentos de 15 bases de cada um dos lados do local de mutação como se mostra nos diagramas que se seguem , em que N indica bases complementares e M indica o ácido nucleico a ser inserido , eliminado ou substituído . As inserções ou eliminações são normalmente feitas em grupos de 3 para manter em fase do gene a jusante .

Para eliminação : DNA oligómero (N)₁₅ (N)₁₅
DNA Vector (N)₁₅ (M) (N)₁₅

Para substituições : DNA oligómero (N)₁₅ (M₁) (N)₁₅
DNA vector (N)₁₅ (M₂) (N)₁₅

Para inserções : DNA oligómero (N)₁₅ (M) (N)₁₅
DNA vector (N)₁₅ (N)₁₅

M₁ indica uma base ou um oligómero que não é complementar da base ou oligómero M₂ . Neste caso M₁ é a sequência mutante pretendida . Geralmente preparam-se também oligómeros que actuam de modo a fazer mais de um tipo de mutação de uma só vez .

O oligómero anticodão do mutante
Arg - his 32 é p CAG GAG GGC ATT GGC ATG GCG
GTT CAG CCA CTG - OH .

O oligómero anticodão da eliminação
His 73 é p GTG GGT GAG GAG CAC GGT GGA GGG



78.

GCA GCC - OH .

O oligómero anticodão da inserção
Leu 158 é p TGT TCG TCC TCA AAG CAG GGC
AAT GAT CCC - OH .

Estes iniciadores são sintetizados por métodos convencionais . Para usar no processo do mutagénese , 10 p moles dos oligómeros ou iniciador lac 5' - -GTTTCCCAGTCACGAC - 3' são fosforilados durante 30 min. a 37°C em 10 μ l de Tris - HCl 50mM (pH 7,5) , EDTA 0,1mM $MgCl_2$ 10mM , ditiotreitol 10mM , ATP 0,1mM , contendo 2U de cinase de polinucleotídeos de T4 .

Para usar como sondas (ver infra) , 2 pmoles dos oligonucleotídeos sintéticos são fosforilados como acima exceptuando a substituição de ATP 0,1mM por γ - ^{32}P ATP (Amersham) 1 μ M . As actividades específicas são normalmente superiores a 5×10^6 cpm / pmoles de cadeia oligonucleotídica .

A hibridação de cada oligómero e do iniciador lac do DNA de cadeia simples do fago M13 mp8 / TNF , seguido de prolongamento do iniciador , resulta na formação de DNAs com segmentos de cadeia dupla , uma cadeia das quais contém o DNA mutante .

Para a formação de heteroduplexes parciais , DNA de cadeia simples do M13 mp8 / TNF (300 mg) é aquecido até 80°C (2 min) , 50°C (5 min) e temperatura ambiente (5 min) em 20 μ l de Tris - HCl 10mM (pH 7,5) , EDTA 0,1mM , NaCl 50mM , contendo oligómero e iniciador fosforilados 1pmole de cada (adicionados como pequenas quantidades da reacção de fosforilação) .

O prolongamento do iniciador é



79.

começado pela adição de 30 μ l de Tris - HCl 50mM (pH 8,0) EDTA 0,1mM, $MgCl_2$ 12mM, ditiotreitol 10mM, ATP 0,7, mM, dATP 0,07mM, dGTP, dTTP e dCTP 0,2mM de cada, e contendo 2 U de polimerase I do DNA de E.coli, fragmento grande e 20 U de ligase do DNA de T4. Após 30 min., à temperatura ambiente, as misturas de reacção são incubadas durante 4 hr a 37°C seguido de incubação durante a noite a 4°C. Pequenas quantidades são extraídas com fenol e a DNA precipitado com etanol e dissolvido em 15 μ l de água. O DNA destas amostras é usado para transformar E.coli JM103.

O iniciador lac hibrida com o fago num local 5' relativamente ao oligómero. O prolongamento do iniciador estabiliza a estrutura heteroduplex. O oligómero e iniciador são fosforilados enzimáticamente para permitir que a ligase do DNA de T4 une as cadeias de DNA adjacentes.

O DNA heteroduplex da amostra C (10 μ l) extraído com fenol é adicionado a 10 μ l de Na-acetato 0,06M pH 4,5, NaCl 0,6M, $ZnCl_2$ 0,6M e contendo 200 U de nuclease S_1 . Após incubação a 37°C durante 5 min., adicionou-se tRNA de levedura (5 μ g) e os ácidos nucleicos são recuperados por extracção com fenol e precipitação com etanol.

Usando as mesmas condições de S_1 , 30 μ g de DNA de cadeia simples do M13 mp8 (cerca de 10 000 unidades formadoras de placas) deu menos de 100 placas num ensaio de transformação com o DNA, enquanto que a mesma quantidade de RF - DNA mantém mais de 80 por cento das suas propriedades transformantes. O DNA tratado com S_1 é usado para transformar E.coli JM103 e o fago resultante analisado por rastreio de placas in situ.



Placas de bactérias (15 cm de diâmetro) contendo várias centenas de placas de fago M13 recombinante são testadas pelo método de hibridação in situ de placas (Benton *et al.*, 1977, "Science" 196 : : 180 - 182) relativamente ao genótipo parental e mutante usando oligómeros adequados marcados em séries de filtros separadas (cerca de 10^6 cpm por filtro) .

A hibridação dá-se durante a noite a 50°C , 40 por cento de formamida , SSC 5X . Os filtros são lavados a 45°C , SSC 2X , 0,02 por cento de dodecilo-sulfato de sódio , secos ao ar e expostos a filme de raios X a -70°C usando um écran intensificador .

Será necessário variar a estrutura do processo de hibridação (por alteração da concentração de SSC de modo a evidenciar a hibridação do oligómero com a cadeia de DNA mutante (uma complementaridade perfeita) em oposição à hibridação do DNA de partida: cada mutante variará quanto à sua capacidade para hibridar dependendo da natureza e número de bases substituídas, eliminadas ou inseridas .

Por exemplo , a detecção de uma mutação numa única base necessitará de condições altamente estritas para descreminalizar entre DNA mutante e DNA parental não mutante , sempre que a mutação é mínima , e.g., eliminação de um codão ou substituição de 1 - 3 bases , a sonda de hibridação deverá ser menor que o oligómero mutante . Típicamente esta será uma sonda de cerca de 14 a 20 bases .

O problema do rastreio das eliminações mutantes é facilitado pela utilização de uma sonda constituída pela sequência com a eliminação para testar a perda da sequência . Se esta sonda não hibridar com DNA de uma placa seleccionada pode-se concluir que se deu a perda pretendida da sequência alvo .



81.

Uma placa que hibride com o oligômero marcado é removida e inoculada em E. coli JM103. Prepara-se DNA de cadeia simples (ss) a partir do sobrenadante e DNA de cadeia dupla (ds) a partir do sedimento de células.

O DNA ss é usado como molde na sequenciação com dideoxido clone usando o iniciador universal M13 ou um oligômero sintético complementar das sequências situadas 3' relativamente à região mutada do DNA do factor de necrose tumoral. A sequenciação com dideoxi confirma que a placa recuperada possui o DNA mutante. Tal fago é designado M13 mp8 / TNF mtnt.

M13 mp8 / TNF mtnt é digerido com Eco RI e Hind III e recuperado o fragmento codificador de TNF. pTrpXAPTNF é digerido com Eco RI e Hind III e recuperado o fragmento vector. O fragmento mutante é então ligado ao vector fragmento e a mistura de ligação usada para transformar E. coli W3110, NL106 ou 294 (ATCC 31 446).

O TNF mutante é recuperado pelo método dos Exemplos 18 ou 19. Informação adicional relacionada com mutagênese em M13 é dada no pedido de patente U. K. 2 130 219 A.

Os mutantes produzidos de acordo com este método são divididos em três classes: Substições, eliminações, e inserções e ainda subdivididos como apresentado na Tabela que se segue.

A menos que de outro modo seja dito os mutantes são do factor de necrose tumoral da Fig. - 10.



<u>Tipo de mutante</u>	<u>local de TNF</u>	<u>Modificação representativa no local indicado</u>
------------------------	---------------------	---

A. SUBSTITUIÇÕES

I. Modificações no grau ou natureza da carga

1.	arg 6	his
2.	lis 65	arg
3.	pro 20	arg
4.	asp 10	his
5.	glu 53	tre
6.	gln 47	asp
7.	asp 45	gln or asn
8.	asn 39	asp
9.	asn 34	gln
10.	leu 29	asp
11.	tir 115	ile
12.	glu 116	lis
13.	pro 117	tre
14.	glu 127	tir
15.	lis 128	his
16.	ala 134	tir
17.	glu 135	lis
18.	tir 141	pro
19.	asp 143	ser
20.	ala 145	tre
21.	glu 146	asn
22.	gln 149	lis



Tipo de mutante	local de TNF	Modificação representativa no local indicado
-----------------	--------------	--

23.	leu 120	lis
-----	---------	-----

II. Modificações no carácter

hidrofilico ou hidrofóbico

1.	leu 57	tir
2.	ser 52	leu
3.	val 41	tir
4.	gli 108	phe
5.	leu 120	tre
6.	ser 133	gli
7.	ala 134	tre
8.	gli 148	ser
9.	val 16	tre

III. Modificação especial

(alterações no volume de cadeia lateral)

1.	leu 63	fen
2.	Ser 52	tir
3.	ile 58	leu
4.	gli 40	ile



Tipo de mutante	local de TNF	Modificação representativa no local indicado
5.	val 13	fen
6.	leu 120	fen
7.	ile 146	gli
8.	asn 137	glu
9.	ile 154	fen
10.	ile 155	gli
11.	fen 144	ile

B. INSERÇÕES

1. após leu 157 gli-gli-COOH
2. entre Asp 10 e Lis 11 his
3. entre ile 58 e tir 59 leu
4. entre Ser 60 e gln 61 lis
5. entre arg 31 e arg 32 ala
6. entre gli 121 e gli 122 gli
7. antes val 1 polipiptídeo imunogénico
8. após leu 157 polipiptídeo imunogénico
9. entre gln 149 e val 150 gli gli



85.

<u>Tipo de mutante</u>	<u>local de TNF</u>	<u>Modificação representativa no local indicado</u>
------------------------	---------------------	---

10. entre ala-1 e val 1
de preTNF lis arg

C. ELIMINAÇÕES

1. Gln 149
2. lis 112
3. val 1 - arg 2
4. val 1 até pro 8
5. ala 22
6. arg 32
7. glu 53
8. ala 111 - lis 112
9. ala 123
10. ile 154
11. glu 127

D. COMBINAÇÕES

1. ile 58 leu
2. leu 57 fen
2. gln 149 delete
2. tir 151 fen



<u>Tipo de mutante</u>	<u>local de TNF</u>	<u>Modificação representativa no local indicado</u>
3.	lis 112 glu 115	delete lis
4.	val 1 ala 22 gli 24 ala 33	tre lis asn asp
5.	tir 115 glu 116	fen lis
6.	inserção gli entre gli 121 e gli 122 após leu 157 add gli gli-COOH	
7.	eliminação val 1 até gli 66 e substituição de NH ₂ Leu Ala Ile Ile Gli Fen Tir Val Gln Gli Ser Glu- Ala Fen Asp Leu Tir Asp Pro Arg Asn Ile Glu Ala- Ser Leu Arg Asp Gli Lis Leu Glu Gln Fen Val - Gli Gli Leu Tir Ile Pro Glu Tir Trp Pro Lis Ala- Glu Ala Gli Glu Pro Tre-	
8.	eliminar ala 111 ala 109 leu 120	gln his
9.	asn 19 asn 92 asn 137	gln gln gln



Deve-se salientar as mutações em que os locais de hidrólise pela tripsina em arg^2 , arg^6 (ver Exemplos 20 e 21) , $\text{arg} 32$ e $\text{arg} 131$ são eliminados ou modificados de modo a deixarem de ser susceptíveis à tripisina . Isto deverá aumentar a semi-vida do factor de necrose tumoral in vivo ao mesmo tempo que reduz a possibilidade de corte fermentativo .

Os locais $\text{arg} 2$ e $\text{arg} 6$ não são críticos pois a actividade biológica mantem-se mesmo depois das referidas regiões serem removidas . No entanto , o corte nos locais $\text{arg} 32$ e $\text{arg} 131$ leva à perda de actividade . Assim , $\text{arg} 32$ e/ou $\text{arg} 131$ são preferencialmente substituídos por histidinilo ou , não tão bom , glu .

Isto remove ou reduz a susceptibilidade do local à enzima mas retém a basicidade da cadeia lateral . Também $\text{arg} 31$ é substituído por histidinilo ou , menos preferido , glutamina pelas mesmas razões .

Também são inseridos locais de hidrólise enzimática entre polipeptídeos de fusão e sequências de TNF de modo a criar locais para produção predeterminada de TNF maduro ou mutante , ou locais deste tipo vão substituir resíduos da sequência condutora do preTNF .

É de esperar que a substituição por asn da asp 45 e expressão numa célula hospedeira (e. g., levedura ou célula de mamífero) , capaz de glicosilação , produza um factor de necrose tumoral glicosilado .



Expressão do factor de necrose tumoral em levedura
sob o controlo do promotor ADH

Constroi-se o plasmídeo TrpXAPTNF como descrito no Exemplo 17 exceptuando o factor de p20KLT ou ptrpETA (ou pBR322) serem cortados com Eco RI e Hind III em vez de Xba I e Hind III e o fragmento sintético B preparado com extremidades coesivas Eco RI em lugar de extremos coesivos Xba I .

A mistura de ligação é então usada para transformar E. coli ATCC 31 446 e um plasmídeo pTNF RI identificado por análise com enzimas de restrição o qual possui o DNA codificador do factor de necrose tumoral ligado por locais Eco RI . O plasmídeo pTNF RI é isolado , digerido com Eco RI e recuperado o fragmento T - 1 contendo o DNA do factor de necrose tumoral .

O plasmídeo pFRPn (EP 60 057 A) é derigido com Eco RI , tratado com fosfatase alcalina para evitar recircularização, ligado ao fragmento T - 1 do factor de necrose tumoral usando ligase do DNA de T - 4 e a mistura de ligação depois usada para transformar E.coli ATCC 31 446 .

As colónias resistentes à ampicilina deram duas séries de plasmídeos tendo a inserção T - 1 em orientações opostas conforme determinado por análise com enzimas de restrição e electroforese em géis de agarose .

Os plasmídeos são purificados a partir dos transformantes de E. coli e usados para transformar leveduras tendo a mutação trp 1 (por exemplo a estirpe de levedura RH218 , depósito ATCC Nº. 44 076 sem restrições) para dar o fenótipo trp⁺ .



89.

Verificou-se que os plasmídeos orientados de tal modo que o codão de iniciação do segmento T - 1 esteja adjacente , ao fragmento promotor da desidrogenase do alcool , transformam a levedura com expressão do factor de necrose tumoral .

O factor de necrose tumoral é recuperado a partir dos extractos de transformantes de levedura ,. A estabilidade do plasmídeo nas fermentações em larga escala é aumentada empregando um plasmídeo de expressão contendo a origem de replicação de 2 micron em vez da origem de replicação cromossómico do pFRPn (ars 1) é uma estirpe hospedeira compatível (J. Beggs , 1978 , "Nature" 275 : 104 - 109).

EXEMPLO 26

Expressão do factor de necrose tumoral em células de mamífero

O plasmídeo pEHER (EP 117 060 A) é digerido com Eco RI , tratado com fosfatase alcalina de intestino de vitela , ligado ao fragmento T - 1 do Exemplo 25 e a mistura de ligação usada para transformar E. coli ATCC 31 446 .

Isolaram-se dois plasmídeos (designados pEHERTNF I e pEHERTNF II) possuindo o DNA de TNF em orientações opostas conforme determinado por análise de restrição em géis de poliacrilamida . Estes plasmídeos são usados para transfectar e seleccionar células CHO DHER - DUX - B11 , CH01 e LtK⁻ .

As células em culturas de tecidos



90.

são transfectadas misturando 1 μ g de pEHERTNF1 ou pEHERTNF1I preparados acima juntamente com 10 μ g de DNA veículo de rato num volume de 250 μ l, CaCl₂ 0,25 M, seguido da adição gota a gota de 250 μ l de soro fisiológico tamporado com HEPES (NaCl 280mM, Na₂PO₄ 1,5mM, HEPES 50mM, pH 7,1).

Após 30 minutos à temperatura ambiente, a solução é adicionada às células em cultura de tecidos a crescer em placas de plástico para cultura de tecidos de 60mM. Usaram-se células CHO 1, CHO DHFR-DUX-B11, e células Ltk⁻. As placas contêm 3 ml de meio de cultura adequado à célula hospedeira.

Para as células CH01 e CHO DHFR-DUX-B11 o meio é meio Ham F - 12 (Gibco) suplementado com 10 por cento de soro de vitela, 100 μ g / ml de penicilina, 100 μ g / ml de estreptomicina e L-glutamina 2 μ M. Para a linha celular Ltk⁻, o meio é meio de Eagle modificação de Dulbecco (DMEM) suplementado como atrás.

Após 3 - 16 horas, o meio é removido e as células lavadas com 20 por cento de glicerol em tampão fosfato salino. Adicionou-se meio fresco a cada placa e as células não incubadas durante mais 2 dias.

A selecção das células hospedeiras transfectadas é feita por tripsinização das células após 2 dias de crescimento (a qual compreende tratamento das células com tripsina estéril 0,5 mg / ml contendo 0,2 mg / ml de EDTA) a adição de cerca de 3×10^5 células a placas de cultura de tecidos de 10 mm com meio selectivo.

Para as células dhfr⁻ o meio é uma formulação do meio (F - 12 GIBCO) sem glicina,



91.

hipoxantina e timidina (meio GHT⁻) . Para as células hospedeiras DHFR⁺ , adiciona-se metotrexato (100 - 1000 nM) ao meio normal de crescimento . As testemunhas são sujeitas ás condições de transfecção sem plasmídeo e com o plasmídeo pFD - 11 (EP 117 060 A) contendo DHFR normal .

As colónias originadas nas células que interiorizaram e expressam o plasmídeo DHFR tornam-se visíveis dentro de 1 - 2 semanas . Identificaram-se os transformantes que expressam factor de necrose tumoral .



92.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S .

1^a. - Método para a preparação de factor de necrose tumoral a partir de uma mistura com outras proteínas caracterizado por se fazer a adsorção do factor de necrose tumoral de tal mistura sobre uma substância hidrofóbica seguido de eluição do factor de necrose tumoral dessa substância.

2^a. - Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por a substância ter um silicato ou uma poliolefina.

3^a. - Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por a substância ser vidro de poro controlado.

4^a. - Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por a substância ser contas de poliestireno.

5^a. - Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por o factor de necrose tumoral ser eluído com etilenoglicol.

6^a. - Método para preparação do factor de necrose tumoral a partir de uma mistura com outras proteínas caracterizado por se fazer a adsorção do factor de necrose tumoral a partir de tal mistura sobre partículas de uma resina de permute aniónica tendo uma dimensão de partícula substancialmente uniforme seguido de eluição do factor



-93-

de necrose tumoral.

7^a. - Método de acordo com a reivindicação 6 caracterizado por a resina de permute aniônica ser poliestireno de ligação cruzada substituído por amino quaternário.

8^a. - Método de acordo com a reivindicação 1 ou 6 caracterizado por o factor de necrose tumoral ser substancialmente homogêneo.

9^a. - Método de acordo com a reivindicação 8 caracterizado por o factor de necrose tumoral ser o factor de necrose tumoral humano.

10^a. - Método de acordo com a reivindicação 9 caracterizado por o factor de necrose tumoral estar isento de contaminação com outras proteínas citotóxicas.

11^a. - Método de acordo com a reivindicação 10 caracterizado por o factor de necrose tumoral estar isento de contaminação com linfoxina.

12^a. - Método de acordo com a reivindicação 8 caracterizado por o factor de necrose tumoral ter uma actividade específica de factor de necrose tumoral superior a cerca de 10 milhões de unidades/mg de proteína.

13^a. - Método de acordo com a reivindicação 8 caracterizado por o factor de necrose tumoral se apresentar, misturado com um tampão, com anti-oxidante, com polipeptídeo de baixo peso molecular, com aminoácido, com açúcar ou com tensioactivo aniônico fisiologicamente aceitáveis, ou suas misturas.



-94-

14^a. - Método de acordo com a reivindicação 13 caracterizado por o factor de necrose tumoral ser liofilizado.

15^a. - Método para a preparação de uma composição caracterizado por se incluir na referida composição o factor de necrose tumoral e uma matriz a partir da qual o factor de necrose tumoral é capaz de se difundir.

16^a. - Método de acordo com a reivindicação 15 caracterizado por a matriz ser um polímero.

17^a. - Método de acordo com a reivindicação 15 caracterizado por o factor de necrose tumoral ser encapsulado.

18^a. - Método para a preparação de uma composição caracterizado por se incluir na referida composição um factor de necrose tumoral seleccionado do grupo constituído por factor de necrose pré-tumoral sem células de mamíferos, factor de necrose tumoral metionilado maduro, um derivado do factor de necrose tumoral, e factor de necrose tumoral bloquado em metionilo.

19^a. - Método caracterizado por compreender a preparação do DNA codificador do factor de necrose tumoral mutante da Fig. 10 em que um ou mais 3 residuos de aminoácidos foram substituidos, eliminados ou inseridos.



Fig. 10.

20^a. - Método de acordo com a reivindicação 19 caracterizado por a proteína da fig. 10 ser a proteína madura da fig. 10.



21^a. - Método de acordo com a reivindicação 19 caracterizado por a proteína madura ter sido sujeita a substituição, eliminação ou inserção num único resíduo de aminoácido.

22^a. - Método de acordo com a reivindicação 20 caracterizado por a proteína madura da fig. 10 ter sido sujeita a substituição, eliminação ou inserção num local situado dentro dos resíduos de aminoácidos 35 a 66, 110 a 133 ou 150 a 157 da proteína da fig. 10.

23^a. - Método de acordo com a reivindicação 20 caracterizado por a proteína madura da fig. 10 ter sido sujeita a substituição, eliminação ou inserção num local situado dentro dos resíduos de aminoácidos 67 a 109 da fig. 10.

24^a. - Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por a substituição ser uma substituição de um resíduo da protoína madura da fig. 10 por um resíduo das classes de aminoácidos neutros, ácidos ou básicos que não seja um membro da classe a que pertence o aminoácido substituído.

25^a. - Método de acordo com a reivindicação 19 caracterizado por a substituição ser tal que um resíduo tendo uma cadeia lateral ocupando um certo volume espacial substitui um resíduo não possuidor de tal tipo qde cadeia lateral.

26^a. - Método de acordo com a reivindicação 25 caracterizado por o resíduo não possuidor de uma cadeia lateral ocupando um certo volume espacial ser glicina ou serina.



27^a. - Método de acordo com a reivindicação 25 caracterizado por o resíduo possuidor de tal cadeia lateral ser fenilalanina ou triptofano.

28^a. - Método para a preparação do derivado do factor de necrose tumoral de acordo com a reivindicação 18 caracterizado por o factor de necrose tumoral estar insolabilizado ou marcado covalentemente com um grupo detetável.

29^a. - Método de acordo com a reivindicação 20 caracterizado por um resíduo de lisina ou de arginina da proteína madura da fig. 10 ser eliminado ou substituído por um resíduo de aminoácido outro que não de lisina e arginina.

30^a. - Método de acordo com a reivindicação 19 caracterizado por o factor de necrose tumoral ser citotóxico.

31^a. - Método para a preparação de uma composição caracterizado por se incluir na referida composição factor de necrose tumoral e pelo menos uma outra proteína homóloga desde que a quantidade dessa outra proteína homóloga seja predeterminada e a composição não possua outras proteínas homólogas em quantidades que não sejam predeterminadas.

32^a. - Método de acordo com a reivindicação 31 caracterizado por o factor de necrose tumoral estar absolutamente isento de contaminação com proteína homóloga.



33^a. - Método de acordo com a reivindicação 18, 19, 31 ou 32 caracterizado por o factor de necrose tumoral ser humano.

34^a. - Método de acordo com as reivindicações 31 ou 32 caracterizado por o factor de necrose tumoral ser um mutante citotóxico da proteína da fig. 10 madura.

35^a. - Método para a preparação de uma composição caracterizado por se incluir na referida composição factor de necrose tumoral de uma dada espécie e um componente de uma célula que não seja dessa espécie, componente esse que é fisiologicamente aceitável quando da administração a pacientes.

36^a. - Método de acordo com a reivindicação 35 caracterizado por o componente ser uma proteína procariótica.

37^a. - Método para a preparação de uma composição caracterizado por se incluir na referida composição uma célula contendo factor de necrose tumoral heterólogo.

38^a. - Método de acordo com a reivindicação 37 caracterizado por a célula ser um procariota ou eucariota inferior e o factor da necrose tumoral ser humano.



39^a. - Método de acordo com a reivindicação 38 caracterizado por o factor de necrose tumoral estar maduro.

40^a. - Método de acordo com a reivindicação 38 caracterizado por o factor de necrose tumoral ser um mutante.

41^a. - Método de acordo com a reivindicação 37 caracterizado por se incluir ainda na referida composição um meio nutritivo.

42^a. - Método de acordo com as reivindicações 19, 32 ou 35 caracterizado por se incluir ainda na referida composição uma quantidade predeterminada de um veiculo fisiologicamente aceitável seleccionado do grupo constituido por tampões, anti-oxidantes, agentes de quelação, polipeptideos de baixo peso molecular, proteinas, aminoácidos, açucares, tensioactivos aniónicos ou respectivas misturas.

43^a. - Método de acordo com as reivindicações 19, 32 ou 35 caracterizado por a referida composição ser liofilizada.

44^a. - Método para a preparação de DNA codificador do factor de necrose tumoral mutante da reivindicação 19, caracterizado por se proceder a síntese química, por rastreio de produtos de transcrição reversa ou de culturas de linha celular, ou por rastreio de bibliotecas genómicas a partir de qualquer célula.



-100-

45^a. - Método para a preparação de DNA codificador do factor de necrose tumoral, em que o referido DNA não possui intrões, caracterizado por se aplicar o método da reivindicação 44.

46^a. - Método para a preparação de DNA codificador de factor de necrose tumoral sem sequências ladeantes codificadoras de outras proteínas do organismo de onde deriva o DNA, caracterizado por se aplicar o método da reivindicação 44.

47^a. - Método para a preparação de DNA sintético codificador do factor de necrose tumoral, DNA esse que possui um nucleotideo substituído não encontrado na posição correspondente no DNA codificador do factor de necrose tumoral tal como é encontrado na natureza, caracterizado por se aplicar o método da reivindicação 44.

48^a. - Método para a preparação de DNA codificador de uma fusão do factor de necrose tumoral com um outro polipeptideo, caracterizado por se aplicar o método da reivindicação 44.

49^a. - Método para a preparação de DNA de acordo com a reivindicação 48 caracterizado por o outro polipeptideo ser bacteriano ou de eucariota inferior.

50^a. - Método para a preparação de DNA de acordo com a reivindicação 48 caracterizado por o outro polipeptideo ser um "condutor" de secreção heterólogo.

51^a. - Método para a preparação de DNA de acordo com a reivindicação 50 caracterizado por o condutor ser um condutor de E. coli.



-101-

52^a. - Método para a preparação de DNA de acordo com a reivindicação 51 caracterizado por o condutor ser o da enterotóxina STII de E.coli.

53^a. - Método para a preparação de DNA codificador do factor de necrose tumoral ligado a um vector replicável, caracterizado por se aplicar o método da reivindicação 44.

54^a. - Método para a preparação de DNA de acordo com as reivindicações 44, 45, 46, 47 ou 48 caracterizado por o DNA estar presente na vector replicável.

55^a. - Método para a preparação de DNA de acordo com a reivindicação 54 caracterizado por o vector ser um plasmídeo ou vírus.

56^a. - Método para a preparação de DNA codificador de factor de necrose tumoral, ou de um seu fragmento, o qual está covalentemente marcado com uma substância detectável, caracterizado por se aplicar o método de reivindicação 44.

57^a. - Método para a preparação de DNA de acordo com a reivindicação 56, caracterizado por a substância detectável ser um grupo fluorescente, um átomo radioativo ou um grupo quimioluminescente.

58^a. - Método de ensaio caracterizado por se fazer o contacto de DNA marcado da reivindicação 56 com um fragmento de DNA a ser testado nas condições necessárias à hibridação dos dois fragmentos e determinação do grau de hibridação.



59^a. - Célula caracterizada por ser transformada com o DNA da reivindicação 54.

60^a. - Método caracterizado por se fazer a cultura da célula da reivindicação 59, permitindo a acumulação do factor de necrose tumoral na cultura e recuperação do produto.

61^a. - Método caracterizado por se fazer a obtenção de DNA que codifique factor de necrose tumoral e tratamento do DNA para eliminar, substituir ou inserir um nucleotídeo predeterminado correspondente a um nucleotídeo presente na sequencia do DNA.

62^a. - Método de acordo com a reivindicação 61 caracterizado por o nucleotídeo ser seleccionado de modo a não alterar a sequência de aminoácidos codificada pelo DNA.

63^a. - Método de acordo com a reivindicação 61 caracterizado por o tratamento incluir a substituição de um fragmento do DNA por um oligodeoxirribonucleotídeo sintético.

64^a. - Método de acordo com a reivindicação 61 caracterizado por a substituição originar um codão tendo uma preferencia de célula hospedeira.

65^a. - Método para a preparação de uma composição caracterizado por se incluir na referida composição o factor de necrose tumoral e um interferão.

66^a. - Método de acordo com a reivindicação 65 caracterizado por a referida composição ser isenta de outros polipeptídeos citotóxicos.



-103-

67^a. - Método de acordo com a reivindicação 66 caracterizado por a referida composição ser isenta de células ou proteínas do plasma contaminantes.

68^a. - Método de acordo com a reivindicação 65 caracterizado por se incluir ainda, na referida composição, um tampão, um antioxidante, um polipeptídeo de baixo peso molecular, uma proteína, um aminoácido, um açucar ou um tensioactivo aniónico fisiológicamente aceitável ou suas misturas.

69^a. - Método de acordo com a reivindicação 65 caracterizado por a referida composição ser liofilizada.

70^a. - Método de acordo com a reivindicação 65, caracterizado por a referida composição ser humana.

71^a. - Método de acordo com a reivindicação 65, caracterizado por a referida composição ser isenta de linfotoxina contaminante.

72^a. - Método de acordo com a reivindicação 65 caracterizado por o interferão ser interferão gama.

73^a. - Método de acordo com a reivindicação 18 caracterizado por o factor de necrose tumoral ser outro que não o factor de necrose tumoral de coelho.

74^a. - Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por o factor de necrose tumoral mutante ser outro que não um factor de necrose do tumoral humano em que os resíduos da terminação amínica Vall -Arg2 são eliminados.

75^a. - Método de acordo com a reivindicação 19 caracterizado por o resíduo Arg 32 ser eliminado.

76^a. - Método de acordo com a reivindicação 19 caracterizado por o resíduo Arg 32 ser substituído por histidilo.

Lisboa, 3 de Julho de 1985



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



folha 1
(11 FOLHAS)

Fig.1.

PERFIL DE ELUIÇÃO - VIDRO DE PORO CONTROLADO

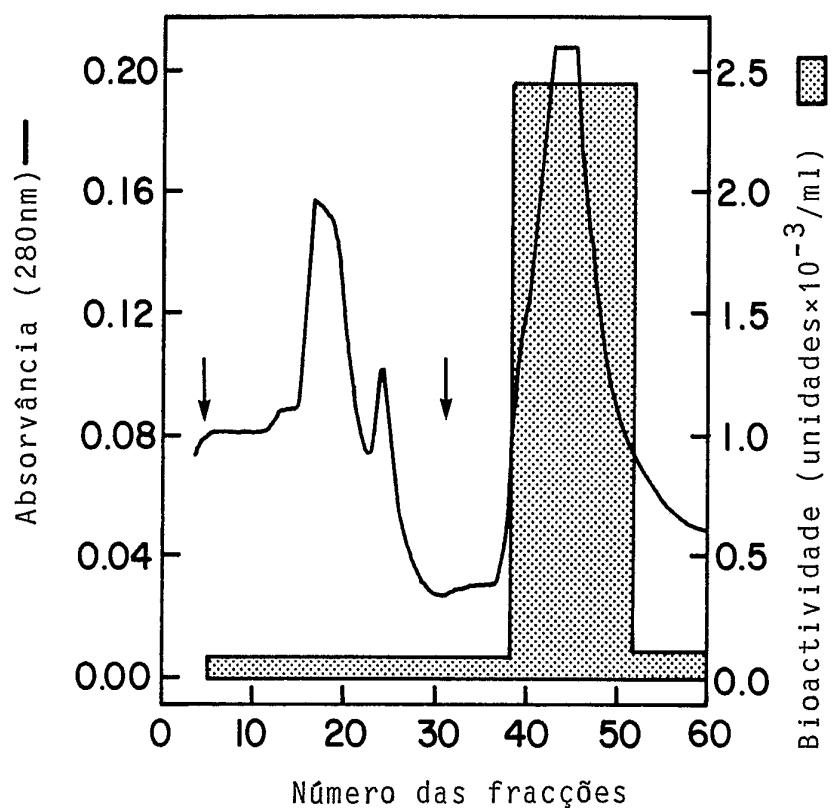




Fig. 2.

PERFIL DE ELUIÇÃO - DEAE

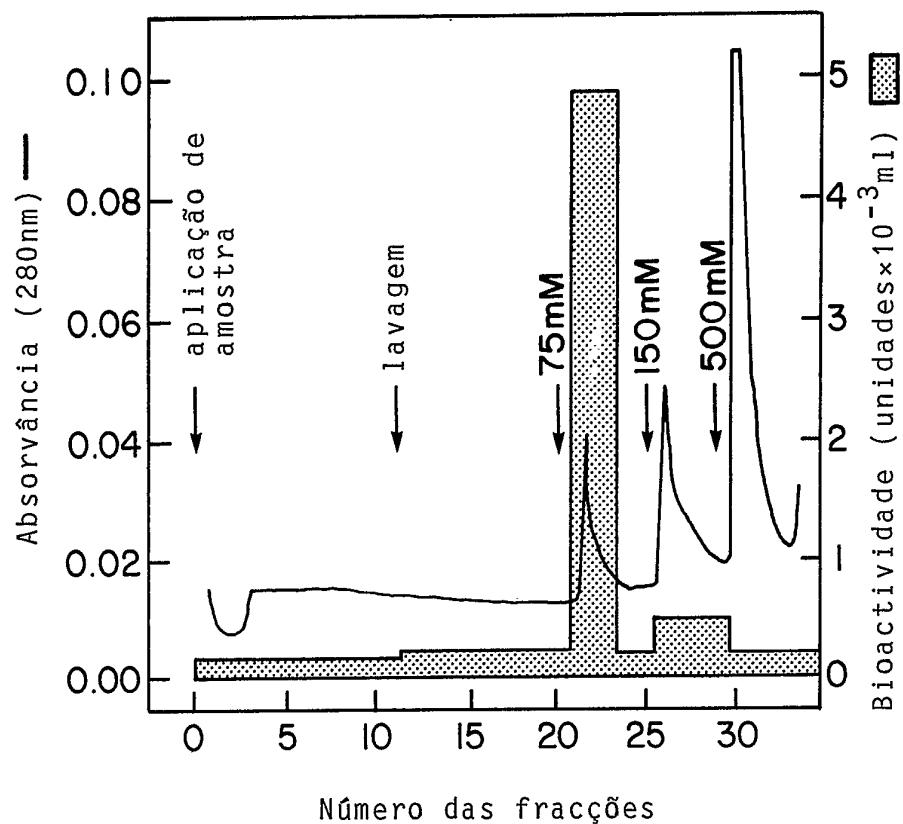
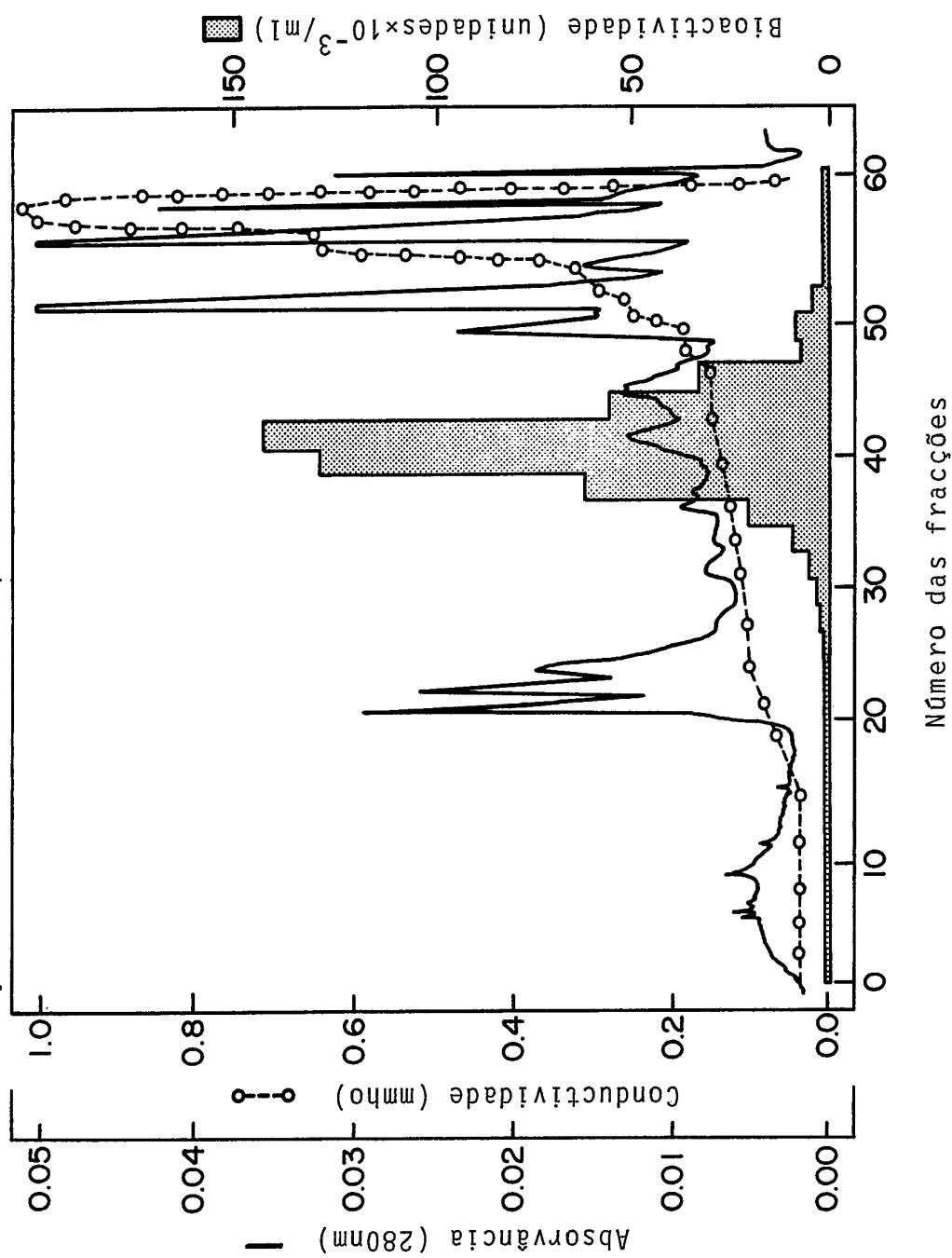


Fig. 3.

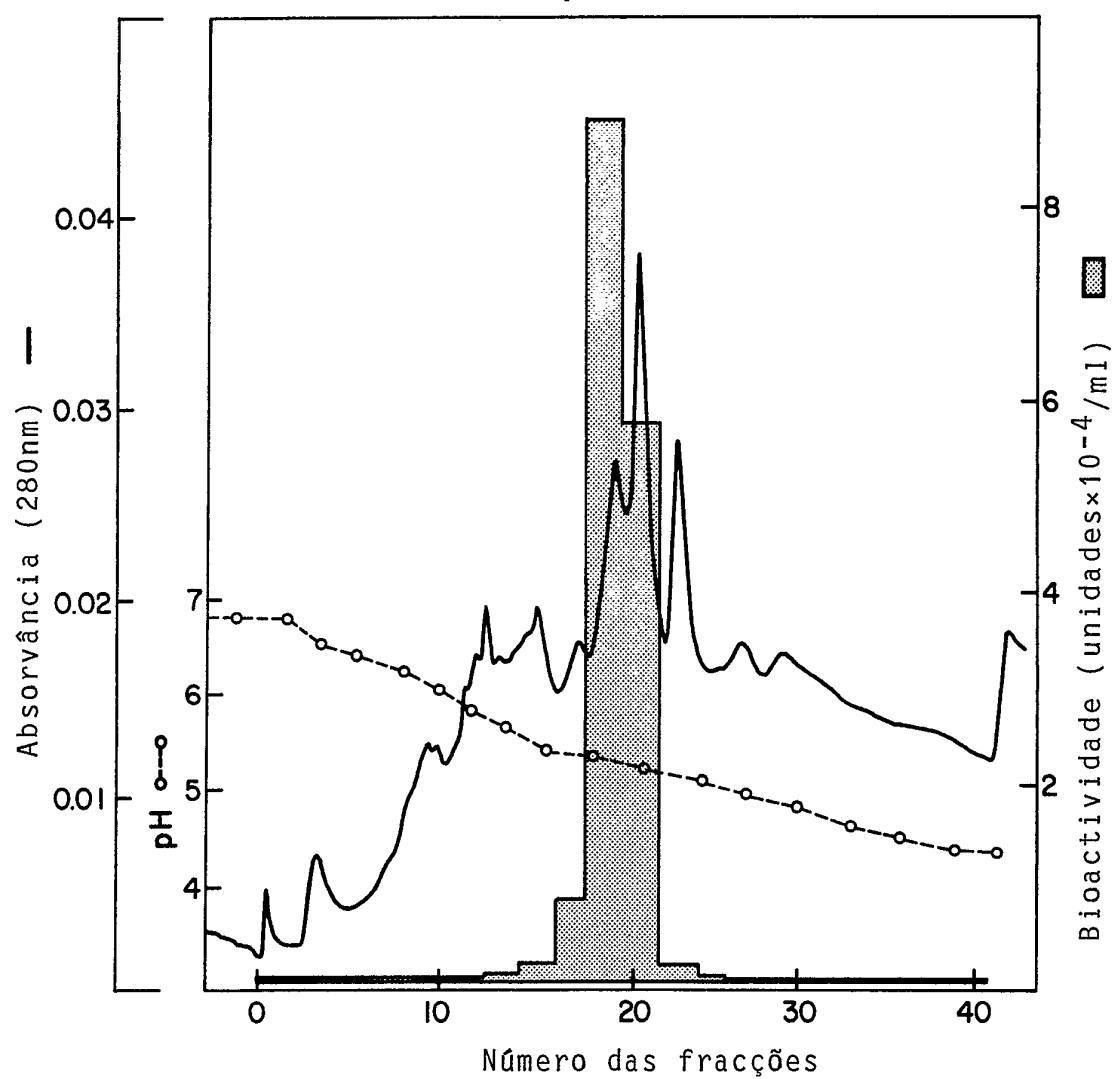
PERFIL DE ELUÇÃO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA VELOCIDADE PARA PROTEÍNAS





FOLHA 4
(11 FOLHAS)

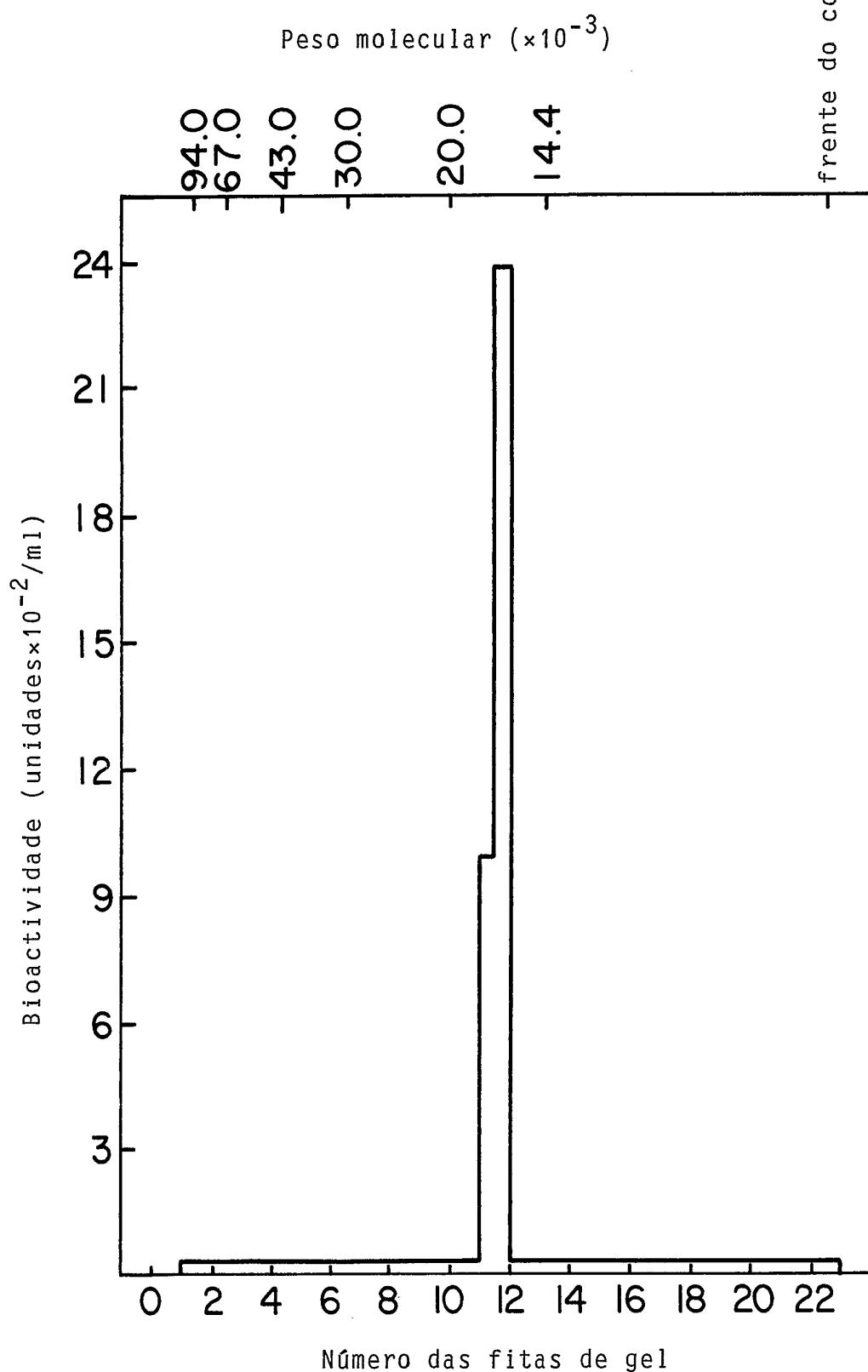
Fig.4.
PERFIL DE ELUIÇÃO - CROMATOFOCAGEM





FOLHA 5
(11 FOLHAS)

Fig. 5.





FOLHA 6
(14 FOLHAS)

Fig.6.

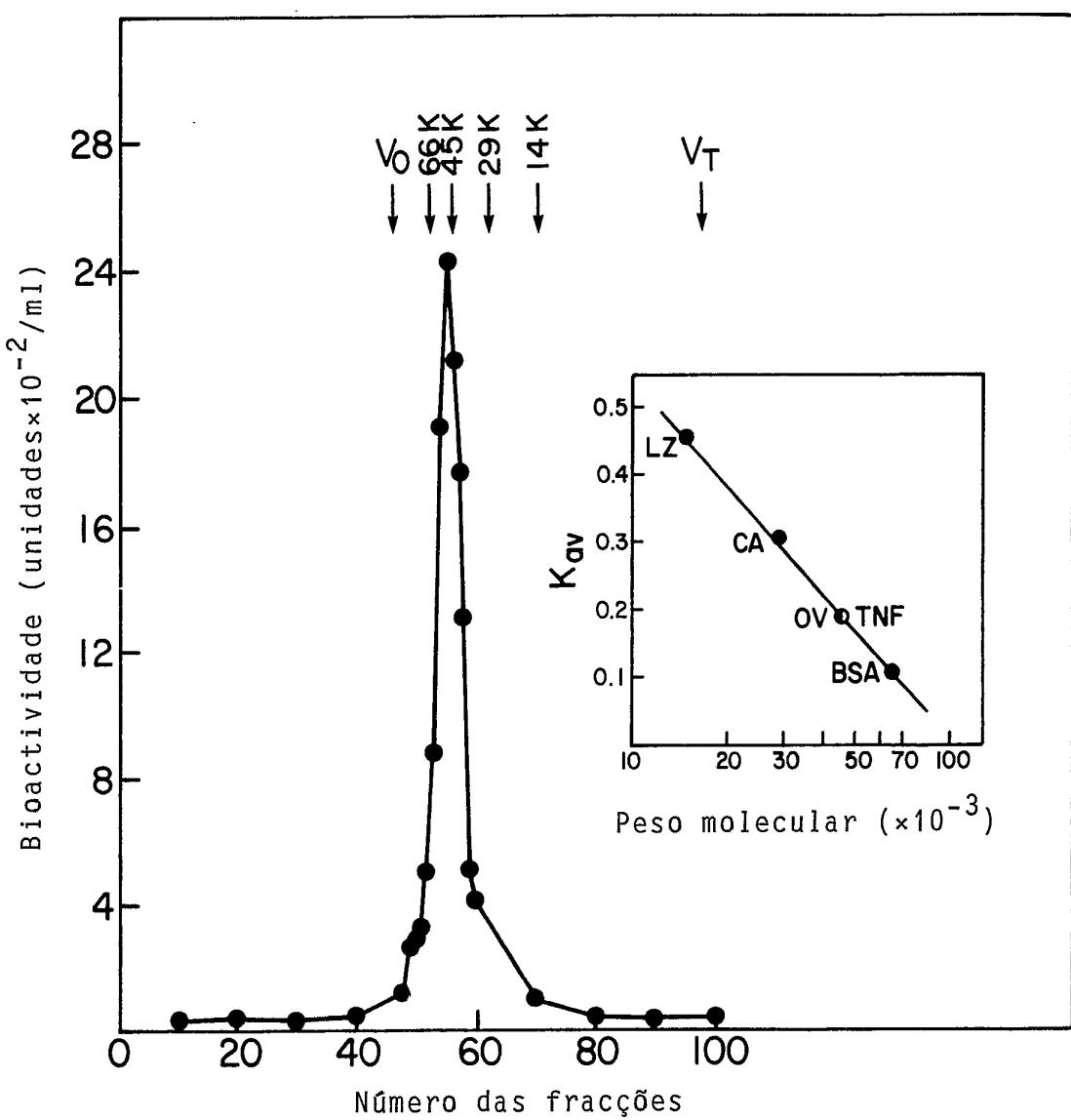


Fig. 7.

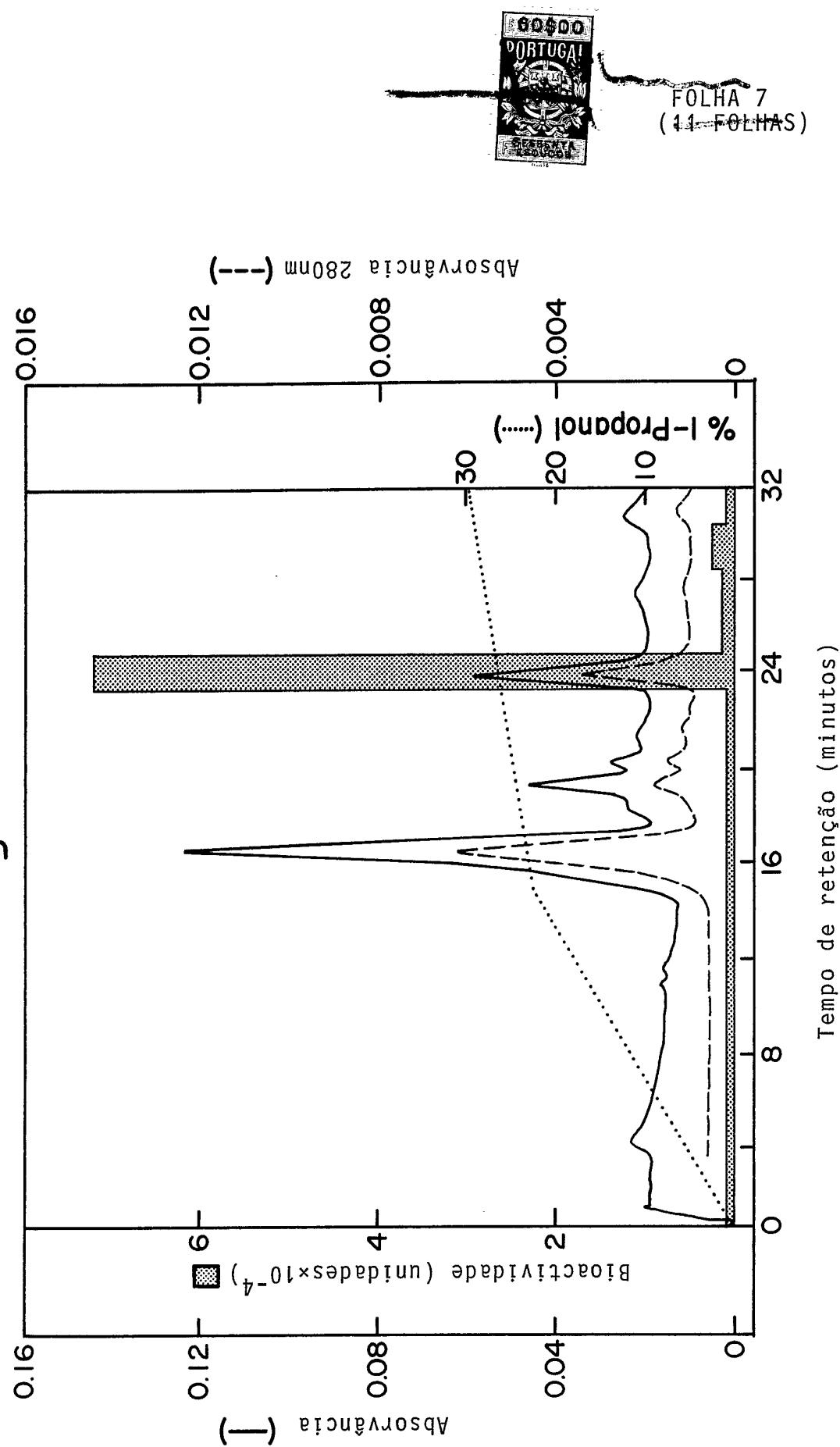




Fig. 8.

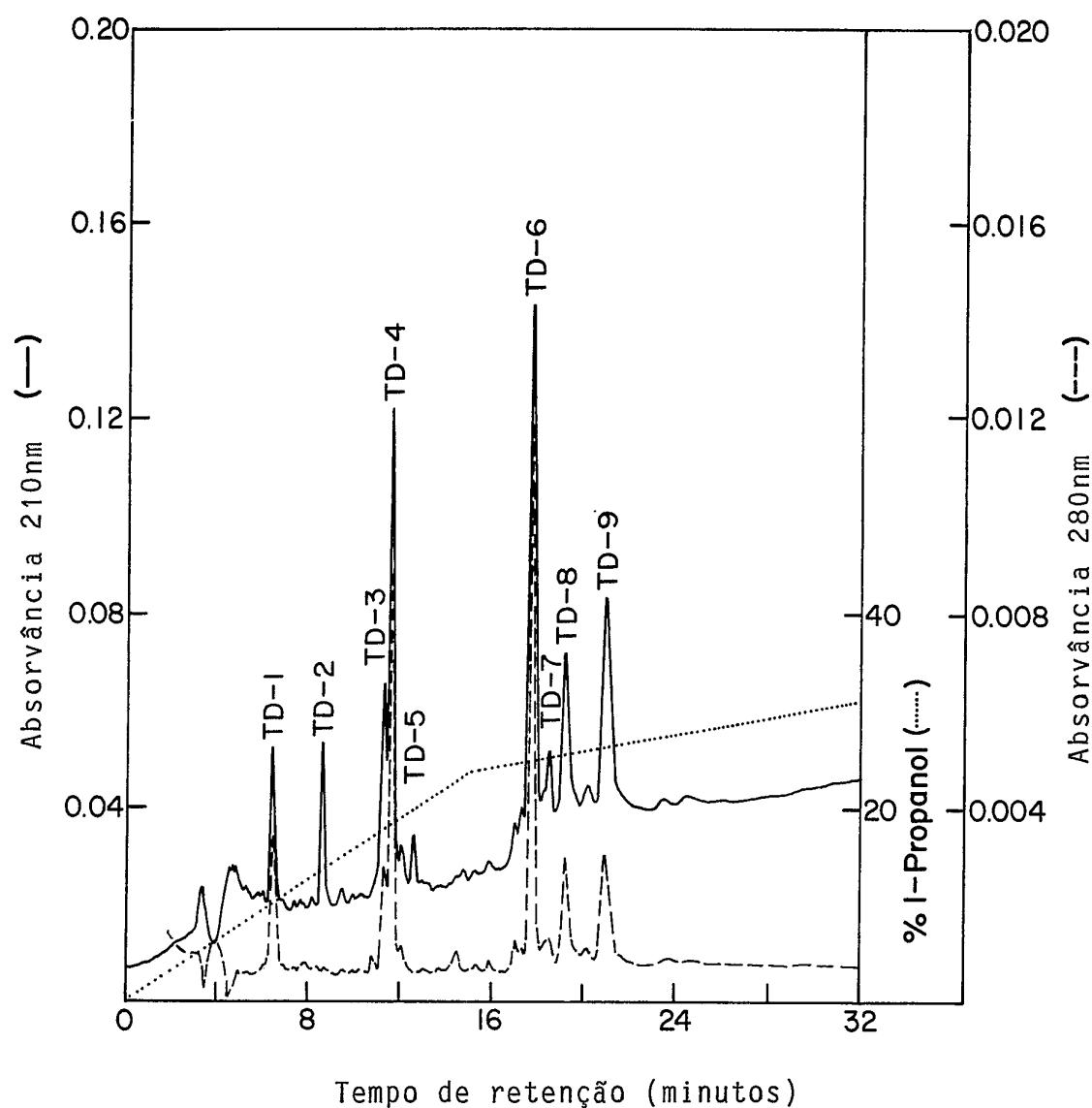
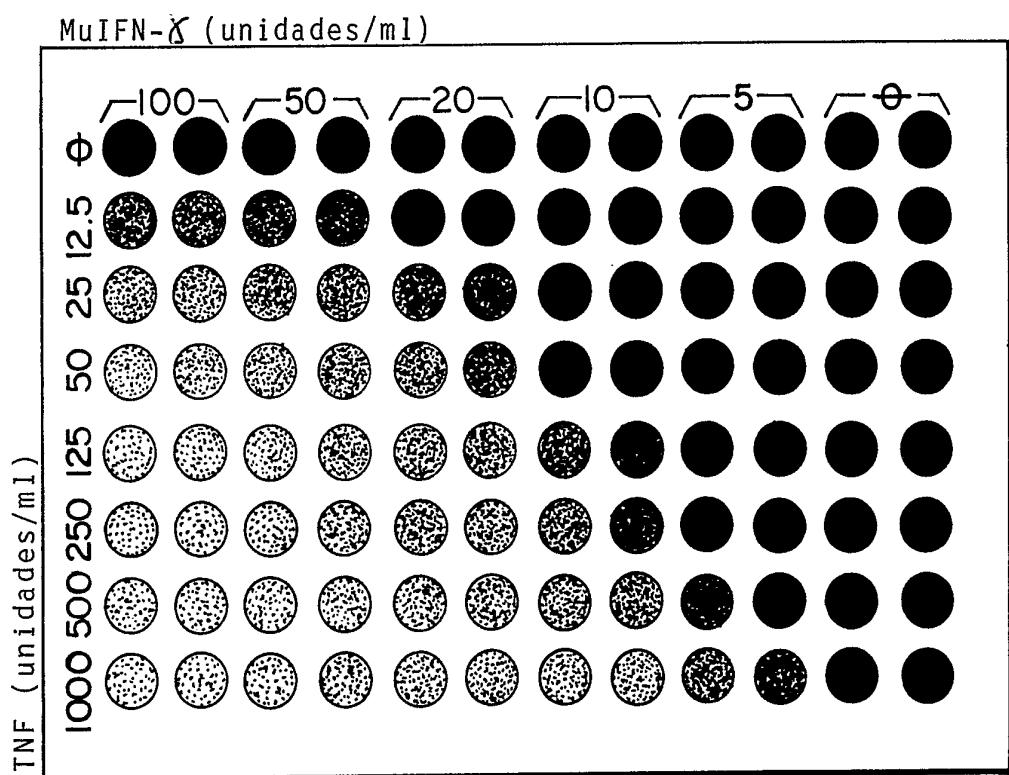




Fig. 9.

Actividade combinada do factor de necrose tumoral e interferão gama



Sequência de aminoácidos e de nucleotídeos do factor de necrose-tumoral Humano



FOLHA 10
(11 FOLHAS)

Fragmento sintético B

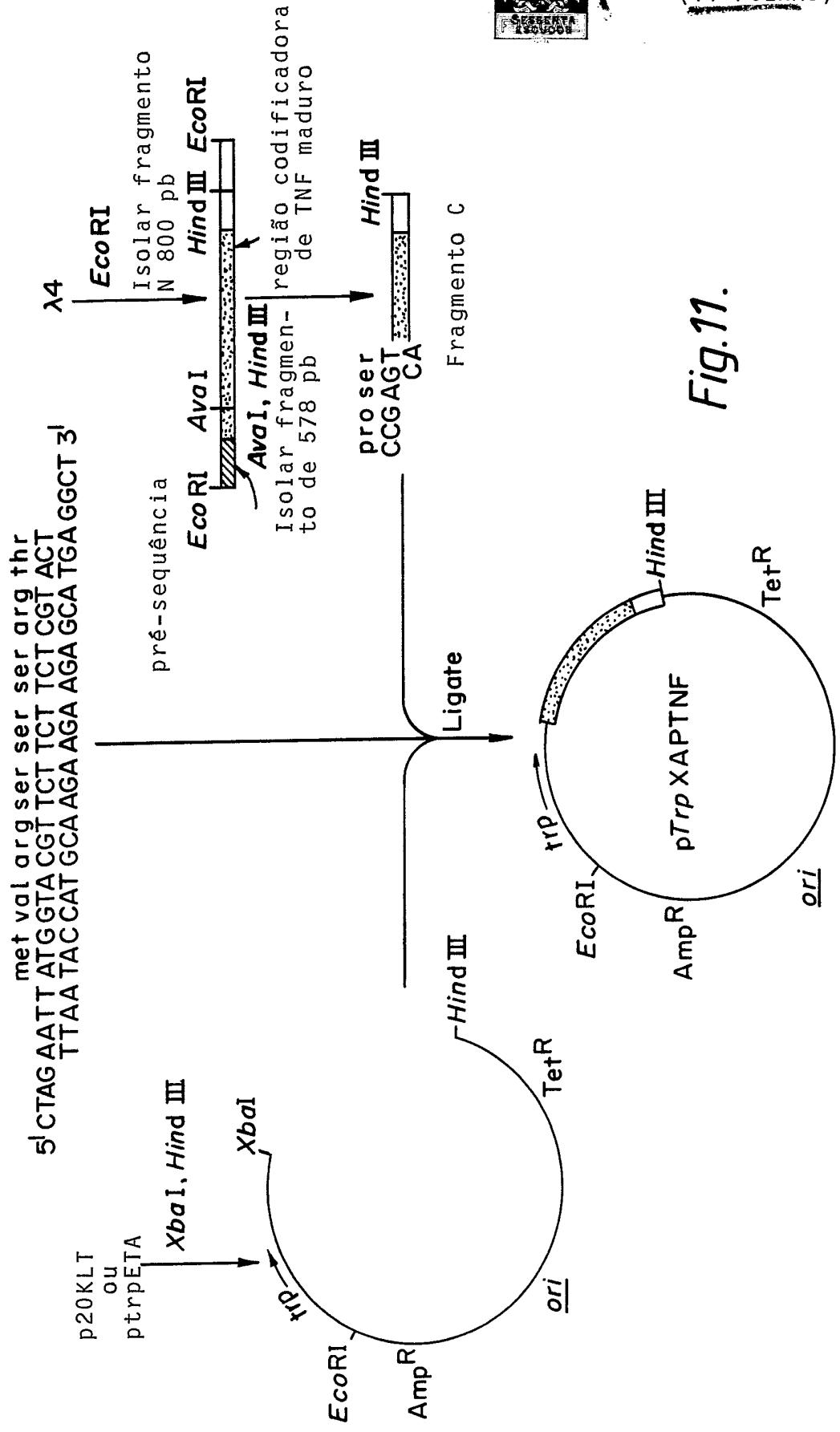


Fig. 11.

FOLHA 11
 (11 FOLHAS)