

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 97 821

REQUERENTE: REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., norte-americana (Estado de New York), com sede em 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, Estados Unidos da América

EPÍGRAFE: "Processo de obtenção de sequências de ácido nucleico e de aminoácidos de CNTFR e de obtenção de composições farmacêuticas de diagnóstico e de identificação de moléculas homólogas a CNTF e CNTFR"

INVENTORES: Samuel Davis, Stephen P. Squinto, Mark E. Furth e George D. Yancopoulos

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

Estados Unidos da América em 1 de Junho de 1990 sob o nº. 07/532 285, em 28 de Março de 1991 sob o nº. 07/676 647 e em 15 de Maio de 1991 sob o nº. 07/700 677



PATENTE N.º. 97 821

"Processo de obtenção de sequências de ácido nucleico e de aminoácidos de CNTFR e de obtenção de composições farmacêuticas de diagnóstico e de identificação de moléculas homólogas a CNTF e CNTFR"

para que

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de obtenção de sequências de ácido nucleico e de aminoácidos do receptor do factor neurotrófico ciliar (CNTFR), de sistemas de ensaio para detectar a actividade de CNTF, de sistemas de modelos experimentais para estudar o papel fisiológico de CNTF, a processos de diagnóstico para identificação de condições neurológicas relacionadas com factor neurotrófico ciliar (CNTF) e a processos para identificação de moléculas homólogas a CNTF e CNTFR.

MEMÓRIA DESCRITIVA



1. INTRODUÇÃO

O presente invento refere-se ao processo de obtenção das sequências de ácido nucleico e de aminoácidos do receptor do factor neurotrófico ciliar (CNTFR). Refere-se também a (i) sistemas de ensaio para detectar a actividade do factor neurotrófico ciliar (CNTF), (ii) sistemas de modelo experimentais para o estudo do papel fisiológico do CNTF, (iii) processos de diagnóstico para a identificação de condições neurológicas relacionadas com o CNTF, (iv) processos terapêuticos para o tratamento de condições neurológicas relacionadas com o CNTF e (v) processos para a identificação de moléculas homólogas a CNTFR.

2. ANTECEDENTES DO INVENTO

2.1. FACTOR NEUROTROFICO CILIAR

O factor neurotrófico ciliar é uma proteína que é requerida especificamente para a sobrevivência in vitro dos neurónios dos gânglios ciliares de galinha embrionária (Manthorpe et al., 1980, J. Neurochem. 34:69-75). O gânglio ciliar está localizado anatomicamente dentro da cavidade orbital, entre o rectus lateral e a bainha do nervo óptico; ele recebe fibras nervosas parassimpáticas provenientes do nervo oculomotor que inerva o músculo ciliar e o esfíncter da pupila.

Verificou-se que os neurónios do gânglio ciliar se encontram entre a população de neurónios que exhibe períodos definidos de morte celular. No gânglio ciliar de galinha observou-se que metade dos neurónios presentes no dia embrionário 8 (E8) morrem antes de E14 (Landmesser e Pilar, 1974, J. Physiol. 214:737-749). Durante o mesmo período de tempo, os neurónios do gânglio ciliar estão a formar ligações com os seus tecidos alvo, nomeadamente o corpo ciliar e a corióide do olho. Landmesser e Pilar (1974, J. Physiol. 214:751-736) observaram que a remoção de um olho antes do período de morte celular resulta na perda completa dos neurónios do gânglio ciliar no gânglio ipsilateral. Contrariamente, Narayanan e Narayanan (1978, J. Embryol. Ex. Morphol. 44:53-70) observaram que, por implantação de um



rudimento de olho adicional e, desta forma, pelo aumento da quantidade de tecido alvo disponível, a morte dos neurónios do gânglio ciliar pode ser reduzida. Estes resultados estão de acordo com a existência de um factor neurotrófico derivado do alvo que actua nos neurónios do gânglio ciliar.

Em cultura, verificou-se que os neurónios do gânglio ciliar (GC) necessitam de um factor ou factores para a sua sobrevivência. A actividade do(s) factor(es) neurotrófico(s) ciliar tem sido identificada em meios condicionados por células do músculo de galinha (Helfand et al., 1976, Dev. Biol. 50:541-547; Helfand et al., 1978, Exp. Cell Res. 113:39-45; Bennett e Nurcome, 1979, Brain Res. 173:543-548; Nishi e Berg, 1979, Nature 277:232-234; Varon et al., 1979, Brain Res. 173:29-45), em extractos musculares (McLennan e Hendry, 1978, Neurosci. Lett. 10:269-273); em extractos de embrião de galinha (Varon et al., 1979, Brain Res. 173:29-45, Tuttle et al., 1980, Brain Res. 183:161-180) e em meio condicionado por células cardíacas (para discussão ver também Adler et al., 1979, Science 204:1434-1436 e Barbin et al., 1984, J. Neurochem. 43:1468-1478).

Adler et al. (1979, Science 204:1434-1436) utilizaram um sistema de ensaio baseado em culturas em microplacas de neurónios de GC, para mostrar que se encontra uma fonte rica de CNTF nos tecidos alvo intra-oculares que são inervados pelos neurónios do GC. Das 8 000 unidades tróficas (UT), presentes no embrião com 12 dias, 2 500 UT foram detectadas no tecido ocular, parecendo a actividade estar localizada numa fracção que contém o corpo ciliar e a corióide.

Subsequentemente, Barin et al. (1984, J. Neurochem, 43:1468-1478) refere um procedimento para o enriquecimento do CNTF a partir de tecido ocular do embrião de galinha. A actividade do CNTF foi também encontrada associada a tecidos não ganglionares ciliares, incluindo o nervo ciático de ratazana (Williams et al., Int. J. Develop. Neurosci. 218:460-470). Manthorpe et al. (1986, Brain Res. 367:282-286) descrevem a purificação parcial de actividade do CNTF activo de mamíferos a partir de extractos do nervo



ciático de ratazana adulta, utilizando um processo de fraccionamento, semelhante ao empregue no isolamento do CNTF activo do olho de galinha. Adicionalmente, Watters e Hendry (1987, J. Neurochem. 49:705-713) descrevem um processo para o enriquecimento da actividade de CNTF, aproximadamente de 20 000 vezes, a partir de tecido cardíaco bovino em condições não desnaturantes, usando cromatografia de afinidade com heparina. A actividade do CNTF foi também identificada em tecidos cerebrais danificados (Manthorpe et al., 1983, Brain Res. 267:47-56; Nieto-Sampedro et al., 1983, J. Neurosci. 3:2219-2229).

Carnow et al. (1985, J. Neurosci. 5:1965-1971) e Rudge et al. (1987, Develop. Brain Res. 32:103-110) descrevem processos para a identificação de actividade semelhante à do CNTF a partir de transferências de Western (Western blots) de extractos tissulares, identificando depois as bandas proteicas contendo actividade de CNTF por inoculação das tiras de nitrocelulose numa placa de cultura com neurónios de GC e identificando as áreas de sobrevivência das células usando corantes vitais. Usando este processo, Carnow et al. (1985, J. Neurosci. 5:1965-1971) observaram que o CNTF activo do nervo ciático e do cérebro de ratazana adulta apresentam tamanho diferente (24 kD) do CNTF da galinha (20,4 kD).

Recentemente, o CNTF foi clonado e sintetizado em sistemas bacterianos de expressão, tal como descrito no Pedido de Patente dos EUA N.º. de série 07/570 651, intitulado "Ciliary Neurotrophic Factor" depositado em 20 de Agosto de 1990, por Sendtner et al., aqui incorporado, na sua totalidade, para referência. Utilizando sondas recombinantes, o ARNm de CNTF em tecidos de ratazana adulta, apresenta dimensões com cerca de 1,2kb. O CNTF do cérebro de ratazana foi clonado e verificou-se que era codificado por um ARNm contendo uma pequena região não traduzida de 77pb em 5', e uma estrutura de leitura aberta de 600pb, prevendo uma proteína com cerca de 200 aminoácidos (Stockli et al., 1989, Nature 342:920-923). O CNTF humano foi igualmente clonado e sequenciado (Pedido de Patente dos EUA N.º. de Série 07/570 651, intitulado "Ciliary Neurotrophic Factor" depositado em 20 de Agosto de 1990,



por Sendtner et al.); As suas sequências codificadoras foram substancialmente conservadas relativamente às sequências da ratazana, enquanto que as sequências não codificadoras foram menos conservadas.

2.2. PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO FACTOR NEUOTRÓFICO CILIAR

Um número de efeitos biológicos tem vindo a ser atribuído ao CNTF. Tal como foi discutido anteriormente, o CNTF foi originalmente descrito como uma actividade capaz de manter a sobrevivência dos neurónios do gânglio ciliar de galinha, um componente do sistema nervoso parassimpático, no dia E8. Uma descrição de outras propriedades biológicas de preparações que se sabe apresentarem actividade do CNTF é seguidamente referida:

Saadat et al. (1989, J. Cell Biol. 108:1807-1816) observaram que as suas preparações de CNTF altamente purificado, proveniente do nervo ciático da ratazana induziam a diferenciação colinérgica de neurónios do sistema parassimpático da ratazana, em cultura. Também Hoffman (1988, J. Neurochem. 51:109-113) verificou que a actividade do CNTF obtido do olho da galinha, aumentava o nível da actividade da colina-O-acetiltransferase, em culturas em monocamada de células da retina.

Hughes et al. (1988, Nature 335:70-73) estudaram uma população de células bipotenciais progenitoras da glia em culturas derivadas do nervo óptico e do cérebro da ratazana perinatal; estas células progenitoras mostraram originar, primeiro oligodendrócitos e depois astrócitos do tipo 2. Nas condições de cultura utilizadas, a diferenciação dos oligodendrócitos parecia ocorrer directamente a partir de uma célula progenitora dos oligodendrócitos-astrócitos do tipo 2 (O-A2), enquanto que a diferenciação dos astrócitos do tipo 2 requeria aparentemente a presença de uma proteína indutora, semelhante ou idêntica ao CNTF (ver também, Anderson, 1989, Trends Neurosci. 12:83-85).

Heymanns e Unsicker (1979, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 4:7758-7762) observaram que sobrenadantes de alta velocidade de extractos de células de neuroblastoma produziam efeitos semelhantes aqueles associados à actividade do CNTF activo do olho de ga-

linha ou do nervo ciático de ratazana; a presença de uma proteína semelhante, mas não idêntica ao CNTF (na massa molecular) foi referida.

Ebedal (1987, J. Neurosci. Res. 17:19-24) procurou actividade semelhante à do CNTF numa variedade de tecidos de ratazana e de galinha. Ele observou actividade semelhante à do CNTF entre uma gama relativamente larga de tecidos de ratazana, mas não em tecidos de galinha; verificou-se que o fígado, as células T do baço e as células da glândula submandibular de ratazana estão associadas a níveis baixos de actividade promotora da sobrevivência de GC, enquanto que os tecidos do coração, do cérebro e do músculo estriado estavam associados a elevados níveis da actividade promotora da sobrevivência de GC. De entre os tecidos testados observou-se que o nível mais elevado de actividade semelhante à do CNTF estava associado ao rim de ratazana.

Embora os estudos acima referidos mostrem que muitos tecidos e extractos celulares apresentam actividade capaz de manter a sobrevivência de populações de neurónios que são também sensíveis ao CNTF (isto é, mantêm a sobrevivência de neurónios do gânglio ciliar da galinha no dia E8 num bioensaio de cultura de tecido), não se pode assumir que a responsável por aquelas actividades seja uma proteína única ou idêntica. Tal como foi demonstrado para a família de factores de crescimento de fibroblastos (FGF) (Dionne et al. 1990, EMBO J. 9:2685-2692) por exemplo um número de polipeptidos ou proteínas diferentes apresenta idêntica actividade biológica.

Verificou-se inicialmente que a especificidade neuronal do CNTF do olho de galinha e do nervo ciático de ratazana tinha alguma sobreposição com populações de neurónios que respondiam ao NGF. Embora tivesse sido observado que o CNTF tinha alguma sobreposição da especificidade neuronal com o NGF, as características distintivas entre eles tornaram-se evidentes após estudos sobre o papel do CNTF e do NGF em populações de neurónios em desenvolvimento (Skaper e Varon, 1986, Brain Res. 389:39-46). Para além das diferenças do seu papel no desenvolvimento, o CNTF pode

também ser distinguido do NGF pela massa molecular, ponto iso-eléctrico, incapacidade para ser inactivado por anticorpos específicos para o NGF e pela capacidade apresentada pelo CNTF para manter a sobrevivência dos neurónios CGF in vitro (Barbin et al., 1984, J. Neurochem. 43:1468-1478). Lin et al. (1989), Science 246:1023-1026, referem que o CNTF não apresenta nenhuma homologia com nenhuma proteína referida anteriormente. Sendtner et al. (Pedido de Patente dos EUA N.º de série 07/570 651, intitulado "Ciliary Neurotrophic Factor" depositado em 20 de Agosto de 1990) observaram que o CNTF recombinante promove a sobrevivência de neurónios da medula espinal mediodorsal e ventral e também que o CNTF purificado a partir do nervo ciático de ratazana parecia evitar a morte celular dos neurónios motores em nervos faciais lesionados (8.º nervo craniano) da ratazana recém-nascida (Sendtner et al., 1990, Nature 345:440-441).

A clonagem e expressão do CNTF, através da tecnologia do ADN recombinante, levou a que se encontrasse um número de actividades do CNTF.

2.3. RECEPTORES DE FACTORES DE CRESCIMENTO

Um número de receptores que medeiam a ligação e a resposta a factores proteicos têm sido caracterizados e clonados no decurso dos últimos anos, incluindo os receptores da insulina, do factor de crescimento derivado de plaquetas, do factor de crescimento epidérmico e seus derivados, dos factores de crescimento de fibroblastos e de várias interleucinas e factores de crescimento hematopoiéticos. Dados recentes revelam que a certos receptores podem ligar-se vários (relacionados) factores de crescimento, enquanto que noutros casos o mesmo factor pode actuar sobre múltiplos receptores (relacionados) (e.g. Lupu et al., 1990, Science, 249:1552-1555; Dionne et al., 1990, EMBO J. 9:2685-2692; Miki et al., 1991, Science 251: 72-75). Muitos receptores, aos quais se ligam factores proteicos, podem ser caracterizados de modo lato por apresentarem regiões extracelulares, responsáveis pela ligação específica do factor, regiões transmembranares que atravessam a membrana e domínios intracelulares que estão frequentemente implicadas na iniciação da transdução do sinal, após a



ligação do factor à região externa do receptor. Curiosamente, embora muitos receptores sejam constituídos apenas por uma cadeia polipeptídica simples, outros receptores necessitam aparentemente de (pelo menos) duas subunidades individualizadas, de modo a se ligarem ao seu factor com elevada afinidade e a permitir a resposta funcional posteriormente à ligação com o factor (e.g. Hempstead et al., 1989, Science 243:373-375; Hibi et al., 1990, Cell 63:1149-1157). As porções intra e extracelular de um dado receptor partilham, frequentemente, regiões estruturais comuns a outros receptores, o que sugere existirem semelhanças do ponto de vista evolutivo e funcional entre diferentes receptores. Estas relações podem ser bastante reduzidas e podem apenas reflectir a repetição do uso de certos domínios estruturais gerais. Por exemplo, uma variedade de receptores diferentes, aos quais se ligam factores não relacionados, fazem uso de domínios de tipo "imunoglobulina" nas suas porções extracelulares, enquanto que outros receptores apresentam domínios do tipo "receptor de citoquina", nas suas regiões de ligação aos factores (e.g. Akira et al., 1990 The FASEB J. 4:2860-2867). Um vasto número de receptores com diferentes regiões extracelulares de ligação (ligando-se, assim, a diferentes factores), contêm regiões intracitoplasmáticas codificadoras de proteína-cinases específicas para a tirosina, que são activadas em resposta à ligação do factor (e.g. Ullrich e Schlesinger, 1990, Cell 61:203-212). Os mecanismos através do qual a ligação do factor "activa" o processo de transdução do sinal é ainda pouco conhecido, mesmo no caso dos receptores das tirosina-cinases. Para outros receptores, nos quais o domínio intracelular codifica uma região com função desconhecida ou nos quais o componente que se liga, se associa com uma segunda proteína com função desconhecida (e.g. Hibi et al., 1990, Cell 63:1149-1157), a activação da transdução do sinal permanece ainda mais uma incógnita.

3. SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento refere-se aos genes e proteínas do receptor do CNTF (CNTFR). Baseia-se, em parte, na clonagem e caracterização do gene do CNTFR humano e na sua expressão em células COS transfectadas.



Este invento proporciona não só sequências de ácido nucleico que codificam o CNTFR bem como os seus fragmentos. Também proporciona a proteína do CNTFR substancialmente purificada e fragmentos pépticos dela resultante.

Num aspecto adicional deste invento, sondas de CNTFR, incluindo sondas de ácido nucleico bem como de anticorpos podem ser usadas na identificação de moléculas relacionadas com CNTFR. Por exemplo, este invento proporciona tais moléculas capazes de formarem complexos com o CNTFR e, desta forma, participam no funcionamento do CNTFR. Como outro exemplo, o presente invento proporciona moléculas de receptor que são homólogas ou que apresentam reacções cruzadas, do ponto de vista antigénico mas que não são idênticas ao CNTFR. Estas concretizações particulares baseiam-se na verificação de que o CNTFR apresenta homologia com outras moléculas biológicas relevantes incluindo, muito em particular, o receptor da IL-6, mas também o receptor de PDGF, o receptor do CSF-1, o receptor da prolactina, os receptores da IL-2 e IL-4, o receptor do factor de estimulação de colónias granulócito-macrófago, GM-CSF, a glicoproteína alfa-1-beta específica da gravidez e antigénio carcinoembrionário, um marcador de tumor.

O presente invento proporciona também sistemas de ensaio para a detecção da actividade do CNTF constituídos por células capazes de expressar níveis elevados de CNTFR e sendo, por isso, extremamente sensíveis mesmo a concentrações muito baixas de CNTF ou de moléculas idênticas ao CNTF.

Adicionalmente, o presente invento proporciona sistemas de modelo experimentais para o estudo do papel fisiológico do CNTF. Tais sistemas incluem modelos animais, tais como (i) animais expostos a péptidos do CNTFR em circulação, que competem com o receptor celular na ligação ao CNTF, produzindo assim uma situação de carência de CNTF; (ii) animais imunizados com CNTFR; (iii) animais transgénicos que expressam níveis elevados de CNTFR e que, por isso, são hipersensíveis ao CNTF; e (iv) animais modificados usando a tecnologia da célula-mãe ("stem cell") embrionária nas quais os genes endógenos do CNTFR sofreram deleção do geno-



ma.

Em concretizações adicionais do invento as sondas de CNTFR podem ser usadas para a identificação de células e tecido que respondam ao CNTF em estados normais ou patológicos. Por exemplo, um paciente que sofra de desordens relacionadas com o CNTF pode apresentar expressão aberrante do CNTFR.

Adicionalmente, os genes e as proteínas do CNTFR do invento podem ser usados terapeuticamente. Por exemplo, e não como limitação, um CNTFR em circulação poderá ser usado para diminuir os níveis de CNTF em zonas traumáticas do sistema nervoso central. Alternativamente, um gene recombinante do CNTFR poderá ser introduzido em tecidos que beneficiem de sensibilidade aumentada ao CNTF, tais como os neurónios motores em pacientes que sofram de esclerose amiotrófica lateral.

4. DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. A. Diagrama esquemático da clonagem de expressão utilizando uma estratégia de ligação de ligandos marcados. B. Ensaio de ligação com anticorpo secundário iodado mostrando que, ao contrário das células COS transfectadas com uma biblioteca de ADNc original, muitas células COS, transfectadas com ADN obtido após um ciclo de selecção imunoquímica ("panning"), expressam locais de ligação do CNTF (autorradiografia realizada em placas de 60 mm, contendo células COS transfectadas; cada ponto escuro representa uma única célula COS transfectada, expressora de um local de ligação do CNTF). C. O mesmo ensaio descrito em (B) mas onde as células COS foram transfectadas com um plasmídeo não codificador do CNTFR (clone negativo) ou com um plasmídeo codificador do CNTFR (clone positivo). São apenas visíveis secções pequenas de cada placa. D. Resultados da análise por selecção de células activadas por fluorescência ("fluorescence activated cell sorting") (FACS) de células COS transfectadas com o clone positivo ou com o clone negativo de (C).

Figura 2. Sequência de ácido nucleico (SEQ ID N.º. 1) de ADNc codificador do CNTFR e a respectiva sequência deduzida de



aminoácidos (SEQ ID N°. 2).

Figura 2. Alinhamento do CNTFR humano mostrando homologias no domínio do tipo imunoglobulina e no domínio tipo receptor de citocina. Os números à esquerda indicam o número do aminoácido, a começar pela primeira metionina. Resíduos idênticos e substituições conservadas são marcadas por caixas a cheio. Foram introduzidos espaços para maximizar a homologia. IL-6=interleucina 6; CEA=antigénio carcinoembriónico; PDGF=factor de crescimento derivado de plaquetas; CSF-1=factor de estimulação de colónia 1; alfa 1- β GP=glicoproteína alfa 1- β ; PRL=prolactina; EPO=eritropoietina; IL-2=interleucina 2; IL-4=interleucina 4; GM-CSF=factor de estimulação da colónia granulócito-macrófago.

Figura 4. Relações estruturais entre o CNTFR e outros receptores com ele relacionados. O receptor humano da IL-6 e o CNTFR possuem um domínio de imunoglobulina fundido com a extremidade N do domínio de ligação do factor, proposto. Uma pequena cadeia ácida (linha em ziz-zag) liga a imunoglobulina globular e o domínio de ligação do factor proposto. Uma proteína proposta, semelhante ao gp130, é mostrada em associação com o CNTFR, tal como discutido no texto. HuGRHR - receptor da hormona do crescimento humano; RbPRLR - receptor da prolactina de coelho; MoEPOR - receptor da eritropoietina de ratinho; HuIL2R β - receptor da cadeia- β da interleucina-2 humana; HuIL6R β - receptor da interleucina-6 humana; HuCNTFR - derivado humano do receptor do factor neurotrófico ciliar; C - cisteína; X - aminoácido desconhecido; W - triptofano; S - serina; F - fenilalanina.

Figura 5. Localização tissular da mensagem do CNTFR. O ARN foi preparado a partir dos tecidos de ratazana indicados como descrito na Secção 8.1.. Os fragmentos de ADN do CNTFR resultaram da expressão de construções contendo estes genes no vector pCMX, tal como descrito na Secção 8.1.. Tecidos: cerebelo (CB); rombencéfalos; (HB) mesencéfalo (MB); tálamo (TH/HYP); corpo estriado (STRI); hipocampo B (HIP B); hipocampo A (HIP A); cortex (CORT); bolbo olfativo (OLF); cérebro adulto (AD BR); pele (SK); coração (HRT); músculo (MUS); pulmão (LUNG); intestino (INT); rim

(KID); fígado (FIG); baço (SPL); timo (THY); fígado E17 (E17 LIV).

Figura 6. pCMX com inserção do gene hCNTF-R. Construção do pCMX em pedido co-pendente.

Figura 7. A análise por transferência Northern ("Northern blot") da expressão do receptor do CNTF, do músculo estriado. Aplicaram-se 10 μ g de ARN total em cada faixa. Faixa 1, linha celular C2C12 mt de mioblasto de ratinho; faixa 2 - linha celular C2C12 mt de miotúbulo de ratinho; faixa 3 - linha celular H9C2 mt de miotúbulo de ratazana; faixa 4 - linha celular L6 mt de miotúbulo de ratazana; faixa 5 - músculo solhar de ratazana; faixa 6 - músculo extensor longo dos dedos do pé (EDL) da ratazana; faixa 7 - músculo estriado desnervado; faixa 8 - miotúbulos humanos purificados; faixa 9 - músculo estriado (a amostra de ARN foi degradada); faixa 10 - cerebelo de ratazana adulta; faixa 11 - músculo solhar, sujeito à operação de controle ("sham-operated"); faixa 12 - músculo solhar de ratazana desnervado com 72 h; faixa 13 - músculo EDL sujeito à operação de controle ("sham operated"); faixa 14 - músculo EDL desnervado com 72 h.

Figura 8. Diagrama anatômico do membro inferior direito sujeito a desnervação cirúrgica.

Figura 9. UNOP = músculos solhar de animais do grupo 1 não-operados (Tabela IV); a barra a cheio representa o lado direito e a barra a tracejado representa o lado esquerdo; NONE = músculos solhar de animais do grupo 2, sem qualquer injeção, lesionado (desnervado, lado direito) e controle (sujeitos à operação de controle, lado esquerdo); ALB = músculos solhar de animais do grupo 6, tratados com PBS/BSA (SC), lesionado (direita) e controle (esquerda); CNTF = músculos solhar de animais do grupo 5, tratados com CNTF/BSA (SC), lesionado (direita) e controle (esquerda). Barras a cheio: lesionados; barras a tracejado: controle.

5. DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Por motivos de clareza da descrição e não por motivos de limitação, a descrição detalhada deste invento será dividida nas seguintes subsecções:

- 1) Clonagem do receptor do CNTF;
- 2) Ácido nucleico codificador do receptor do CNTF;
- 3) Péptidos do CNTFR;
- 4) Expressão do receptor do CNTF;
- 5) Identificação de moléculas relacionadas com o receptor do CNTF, e
- 6) Utilidade do invento.

5.1. CLONAGEM DO RECEPTOR DO FACTOR NEUROTROFICO CILIAR

O presente invento possibilita a clonagem do receptor do CNFT (CNTFR) proporcionando um processo de selecção de células alvo que expressem o CNTFR. Ao proporcionar um meio de enriquecimento para sequências codificadoras do CNTFR, o presente invento possibilita a purificação da proteína do CNTFR e a clonagem directa de ADN codificador do CNTFR.

Por exemplo, células alvo que contêm CNTFR podem ser seleccionadas e a proteína do CNTFR pode ser purificada usando métodos conhecidos do perito na arte para a purificação de moléculas de receptor. Por exemplo, e não como limitação, o CNTF ou CNTF ligado a uma molécula detectável, tal como descrito na Secção 5.6.3., infra, no qual o marcador pode ser, por exemplo, um radiomarcador, uma determinante antigénica ou um anticorpo (CNTF/marcador) podem ser reversivelmente ligados de forma cruzada a células alvo e as proteínas associadas à membrana das referidas células alvo poderão ser sujeitas a processos de purificação. Tais processos de purificação incluem SDS-PAGE, seguida da detecção da posição do CNTF ou do CNTF/marcador no gel; por exemplo, o CNTF marcado radioactivamente pode ser usado e, ligado de forma cruzada ao seu receptor, pode ser visualizado no gel por autorradiografia. Alternativamente, poderão utilizar-se anticorpos anti-CNTF, ou anti-marcador, na identificação das posições do complexo CNTF/receptor no gel, por técnicas de transferência Western. A electroforese preparativa pode também ser utilizada no isolamento



de quantidades suficientes de proteína para possibilitar a sequenciação dos aminoácidos dos fragmentos péptidos do receptor, ou para permitir a produção de anticorpos anti-CNTFR que poderão ser utilizados na purificação de moléculas de CNTFR a partir dos extractos de células alvo. A sequência de aminoácidos obtida a partir do CNTFR purificado pode ser usada para a construção de sondas de oligonucleótidos degeneradas que poderão ser usadas na identificação do ácido nucleico codificador do CNTFR numa biblioteca de ADN genómico ou, o que seria preferível, numa biblioteca de ADNc, construída a partir de células alvo produtoras de CNTFR.

Alternativamente, o CNTFR poderá ser clonado por processos de hibridação subtractiva, nos quais o ARNm pode ser preparado a partir de células alvo que expressam o CNTFR, procedendo-se depois à subtracção das sequências que não codificam o CNTFR, por hibridação do ARNm (ou do ADNc produzido a partir dele) com ARNm ou ADNc derivado de células como neurónios que não expressem o CNTFR. O ácido nucleico que permanece após a subtracção, estará provavelmente bastante enriquecido em sequências codificadoras do CNTFR.

O ácido nucleico preparado, preferivelmente a partir de células alvo enriquecidas em sequências codificadoras de CNTFR devido a expressão endógena do CNTFR e/ou devido a processos de subtracção, descritas supra, pode também ser usado na clonagem directa do CNTFR. Por exemplo, e não como limitação, o ADN total, genómico, de células alvo que expressem o CNTFR pode ser preparado e, posteriormente, transfectado numa linha celular que não expresse o CNTFR, e que é preferivelmente derivada de uma espécie diferente da espécie da célula alvo (por exemplo, o ADN obtido a partir de uma célula humana codificadora do CNTFR pode ser transfectado numa célula de ratinho tal como uma célula L). Embora possa ser pequeno o número de células transfectadas que exprimem o CNTFR, estas células podem ser identificadas por técnicas de roseta ou por técnicas de imunofluorescência, como as descritas na secção 5.6.3., infra, e podem ser isoladas por exemplo por técnicas de selecção de células activadas por fluorescência (FACS) ou usando anticorpos conjugados com partículas



magnéticas ou por "selecção imunoquímica" conhecidas pelo perito na arte. O ADN que codifica o CNTFR pode ser clonado a partir de transfectantes produtoras de CNTFR pela produção de uma biblioteca genómica a partir dos transfectantes e depois pelo isolamento e propagação dos clones que contenham sequências de acordo com sequências de aminoácidos do CNTFR ou sequências homólogas a determinados elementos genéticos específicos de espécie; por exemplo, o ADN humano pode ser identificado pela detecção de sequências de Alu repetidas, as quais estão distribuídas com elevada frequência no genoma humano. Por exemplo, mas não por limitação, células não humanas, em cultura, que possuam ADN humano transfectado, codificador do CNTFR e que expressam o CNTFR humano, podem ser seleccionadas, propagadas e o ADN genómico preparado a partir destas células pode ser utilizado na transfecção de células não humanas em cultura, e as células expressando o CNTFR podem ser seleccionadas. Este processo pode ser repetido; o seu objectivo é diminuir em cada passo de transfecção a quantidade de ADN humano presente nas células que codificam o CNTFR.

Deste modo, quando o ADN genómico das células transfectadas que expressam o CNTFR humano é clonado para a construção de uma biblioteca, os clones que possuem o ADN humano (e que são identificadas por exemplo, pela selecção de elementos de sequências caracteristicamente humanas) apresentam maior probabilidade de conter sequências codificadoras do CNTFR quando transfecções repetidas são efectuadas.

O ARN proveniente de uma linha celular ou tecido fonte que expresse o CNTFR, ou uma biblioteca de expressão de ADNc obtida na mesma fonte pode ser introduzido em conjuntos em oócitos de Xenopus através de injeção directa; os oócitos injectados com conjuntos que codificam o CNTFR podem ser identificados ensaiando as respostas funcionais (e. g. fluxos iónicos), que podem ser induzidas pela exposição desses oócitos ao CNTFR, ou alternativamente, pela detecção de locais de ligação do CNTFR na superfície desses oócitos injectados. A divisão repetida dos vários conjuntos positivos em conjuntos cada vez mais pequenos pode levar à identificação de clones individuais que codifiquem o CNTFR.



Alternativamente, uma biblioteca de expressão de ADNc pode resultar de células-alvo que possuam o CNTFR e depois utilizadas em ensaios de expressão transiente. Numa concretização preferida do invento as referidas bibliotecas de expressão podem incorporar a origem de replicação do SV40, podendo os ensaios de expressão transiente serem efectuados usando-se células COS. Os transfectantes que expressam o CNTFR podem ser recuperados como acima se referiu e o ADN codificador do CNTFR pode ser recuperado através de métodos padrão. A sequência de ácidos nucleicos que codifica o CNTFR pode, depois, ser propagada e/ou utilizada em sistemas de expressão utilizando processos substancialmente como os referidos para ácido nucleico codificador do CNTFR, como os descrito no Pedido de Patente dos EUA N.º. de Série 07/570 651, intitulado "Ciliary Neurotrophic Factor" depositado em 20 de Agosto de 1990, de Sendtner et al.).

Numa concretização específica do invento, exemplificada na Secção 6, infra, (e ver Figura 1), a clonagem de expressão do CNTFR pode ser efectuada como a seguir se descreve. Uma biblioteca de ADNc pode ser preparada a partir de uma linha celular ou tecido que expresse o CNTFR, tal como a SH-SY5Y, de modo que o ADNc seja inserido num vector de expressão. Esta biblioteca pode a seguir ser transfectada para uma linha celular adequada, como as células COS M5, utilizando por exemplo o protocolo de transfecção DEAE/cloroquina. Vários dias após a transfecção, as células podem se destacadas das placas de cultura e submetidas ao procedimento "selecção imunoquímica" (Seed e Aruffo, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:365-3369), com as seguintes modificações:

i) em vez de se incubarem as células transfectadas com anticorpos anti-receptor, as células podem ser primeiro incubadas com CNTF marcado (por exemplo, CNTF myc), em gelo durante cerca de 30 minutos, centrifugadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS)/Ficoll a 2%, para remover o excesso de ligando e posteriormente incubadas com o anticorpo anti-marcador (por exemplo o anticorpo anti-myc, 9E10) durante cerca de 30 minutos, em gelo.

ii) as células podem posteriormente ser centrifugadas em PBS/Ficoll a 2% e depois "seleccionadas imunoquimicamente" em



placas revestidas com anticorpo que reconhece o anticorpo anti-marcador (por exemplo, se o anticorpo anti-marcador for o 9E10, anticorpo anti-ratinho).

Posteriormente, após remoção das células não aderentes, por lavagem das placas, os sobrenadantes Hirt podem ser preparados a partir das células aderentes, e o ADN plasmídico precipitado na presença de cerca de 10-20 μ g de ARNt. O ADN plasmídico resultante pode depois ser introduzido em bactérias adequadas (por exemplo, a bactéria DH10 B), através de técnicas correntes, incluindo, mas não se limitando à electroporação. As culturas resultantes das bactérias transformadas podem ser utilizadas na preparação de ADN plasmídico para outro ciclo de transfecção eucariótica e "selecionadas imunoquimicamente". Após esta segunda transfecção, "selecção imunoquímica" e preparação de ADN plasmídico e transformação, as bactérias transformantes podem ser plaqueadas em meio selectivo, as colónias individuais podem ser recolhidas e usadas na preparação de ADN plasmídico e o ADN preparado a partir de um número destes clones pode ser utilizado individualmente na transfecção de células COS. Alternativamente podem ser necessários mais ciclos de enriquecimento antes de se testarem as colónias individuais. As células COS resultantes, expressando locais de ligação do CNTF podem ser identificadas através de um certo número de técnicas, incluindo, mas não se limitando, a ensaios de ligação indirecta, usando anticorpos indicadores com marcação radioactiva ou de fluorescência. Um exemplo de ácido nucleico codificador do CNTFR é o pCMX-hCNTFR (I2), Figura 6, o qual foi depositado no NRRL com o número de acesso B-18789, e está descrito no Pedido de Patente dos EUA copendente, N^o de série intitulado "Mammalian Expression Vector" por Davis e Yancopoulos. Os clones, identificados deste modo, podem depois ser analisados por mapeamento dos fragmentos de restrição e por sequenciação do ácido nucleico utilizando técnicas padrão. Os fragmentos do ADNc codificador do CNTFR podem ser usados na identificação de sequências do ADN genómico que contenham o gene do CNTFR, por exemplo, a partir de uma biblioteca de ADN genómico, utilizando técnicas correntes de hibridação.

Uma vez obtido, um gene do CNTFR pode ser clonado ou subclonado, usando qualquer processo conhecido na arte. Um largo número de sistemas vector-hospedeiro conhecidos na arte podem ser usados. Os vectores possíveis incluem, mas não se limitam, a cosmídeos, plasmídeos ou vírus modificados, devendo porém o vector ser compatível com a célula de hospedeiro utilizada. Tais vectores incluem, mas não se limitam a bacteriófagos, como os derivados do lambda, ou plasmídeo como o pBR322, pUC ou derivados do plasmídeo Bluescript^R (Stratagene). As moléculas recombinantes podem ser introduzidas nas células hospedeiras através de transformação, transfecção, infecção, electroporação, etc..

O gene do CNTFR pode ser inserido num vector de clonagem que pode ser usado para transformar, transfectar ou infectar células hospedeiras apropriadas de modo a produzir muitas cópias das sequências do gene. Isto pode ser conseguido através da ligação do fragmento de ADN num vector de clonagem que possua terminais coesivos complementares. No entanto se os locais de restrição complementares utilizados para fragmentar o ADN não estiverem presentes no vector de clonagem, as extremidades das moléculas de ADN podem ser modificadas enzimaticamente. Pode ser vantajoso incorporar locais de clivagem para endonucleases de restrição nos iniciadores ("primers") oligonucleótidos, utilizados na reacção de polimerase, em cadeia, de modo a facilitar a inserção nos vectores. Alternativamente, qualquer local desejável pode ser produzido através da ligação de sequências nucleotídicas (ligadores ("linkers")) nas extremidades do ADN; estes ligadores ligados podem conter oligonucleótidos específicos sintetizados quimicamente que codificam sequências de reconhecimento para endonucleases de restrição. Num processo alternativo, o vector clivado e o gene do CNTFR podem ser modificados por terminação homopolimérica.

Em concretizações específicas, a transformação de células hospedeiras com moléculas de ADN recombinante que incorporem um gene do CNTFR isolado, ADNc, ou sequências de ADN sintetizado permite a produção de múltiplas cópias do gene. Deste modo, o gene pode ser obtido em grandes quantidades através do crescimento

dos transformantes, isolamento das moléculas de ADN recombinante a partir dos transformantes e, quando necessário, a recuperação do gene inserido a partir do ADN recombinante isolado.

5.2. ÁCIDO NUCLEICO CODIFICADOR DO RECEPTOR DO FACTOR NEUROTROFICO

Através dos processos descritos acima e no Exemplo da secção 6, infra, foi determinada a sequência do ácido nucleico seguinte e deduzida a correspondente sequência de aminoácidos. A sequência do CNTFR humano encontra-se descrita na Figura 2 (SEQ ID N°. 1). Esta sequência, o seu equivalente funcional ou fragmentos desta sequência com pelo menos seis nucleótidos de comprimento podem ser utilizados de acordo com o invento. Adicionalmente, este invento refere-se aos genes do CNTFR isolados a partir de suínos, ovinos, bovinos, felinos, aves, equínos ou caninos bem como de fontes primatas e de quaisquer outras espécies nas quais exista actividade do CNTFR. As sub-sequências, compreendendo porções hibridizáveis da sequência do CNTFR têm utilidade por exemplo, em ensaios de hibridação e em análise por transferência Southern e Northern.

Por exemplo, a sequência de ácido nucleico referida na Figura 2 (SEQ ID N°. 1) pode ser alterada por mutações tais como substituições, adições ou deleções que proporcionam sequências codificadoras de moléculas funcionalmente equivalentes. De acordo com o presente invento, uma molécula é funcionalmente equivalente ou activa comparativamente a uma molécula que possua a sequência representada na Figura 2 (SEQ ID N°. 2) se apresentar a capacidade de ligar o CNTF ainda que com uma afinidade não necessariamente comparável à do CNTFR natural. Devido à degeneração das sequências nucleotídicas codificadoras, outras sequências de ADN que codificam substancialmente a mesma sequência de aminoácidos como a descrita na Figura 2 (SEQ ID N°. 2) podem ser usadas na prática do presente invento. Estas sequências incluem, mas não se limitam, a sequências de nucleótidos compreendendo todo ou porções do gene do CNTFR descrito na Figura 2 (SEQ ID N°. 1), o qual se encontra alterado pela substituição de diferentes codões que codificam um resíduo de aminoácido funcionalmente equivalente

na sequência, produzindo, assim, uma alteração muda.

Adicionalmente, as sequências de ácido nucleico recombinante, codificadoras do CNTFR, deste invento, podem ser alteradas de forma a modificar o processamento ou a expressão do CNTFR. Por exemplo, e não como limitação, o gene do CNTFR pode ser combinado com uma sequência promotora e/ou a um local de ligação a ribossoma, ou uma sequência sinal pode ser inserida a montante das sequências que codificam o CNTFR de forma a permitir a secreção do CNTFR e, desta forma, a sua colheita e biodisponibilidade.

Adicionalmente, o CNTFR pode sofrer mutação in vitro ou in vivo, de forma a criar e/ou destruir sequências de tradução, iniciação ou terminação ou a criar variações em regiões de codificação e/ou formar novos locais de restrição por endonucleases ou a destruir locais pré-existentes, de forma a facilitar adicionais modificações in vitro. Qualquer técnica de mutagenese conhecida na arte pode ser usada, incluindo, mas não se limitando, a mutagenese dirigida ao local in vitro (Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551), uso de ligadores TAB^R (Pharmacia), etc..

5.3. PÉPTIDOS DO RECEPTOR DO FACTOR NEUROTROFICO CILIAR

Este invento também proporciona proteínas do CNTFR, seus fragmentos e seus derivados, possuindo a sequência de aminoácidos apresentada na Figura 2 (SEQ ID N°. 2) ou os seus equivalentes funcionais e proteínas homólogas a essa proteína, sendo essa homologia de pelo menos 30%. O invento proporciona também fragmentos ou derivados das proteínas do CNTFR que compreendem, pelo menos, 6 aminoácidos, uma(s) determinante(s) antigénica(s) ou que são funcionalmente activos. A proteína do CNTFR que apresenta a sequência de aminoácidos descrita na Figura 2 (SEQ ID N°. 2) possui uma massa molecular de aproximadamente 42 kD.

As proteínas do CNTFR, seus fragmentos ou derivados, deste invento, incluem, mas não se limitam àquelas que possuem, como sequência de aminoácidos primária, toda ou parte da sequência de aminoácidos substancialmente como a representada na Figura 2, incluindo sequências alteradas nas quais resíduos de aminoácido da



sequência são substituídos por resíduos de aminoácido funcionalmente equivalentes originando uma alteração muda. Por exemplo, um ou mais resíduos de aminoácido da sequência podem ser substituídos por outro aminoácido de polaridade semelhante, o qual actua como um equivalente funcional, resultando numa alteração muda. Estes substitutos para um aminoácido da sequência podem ser escolhidos de entre os outros membros da classe à qual o aminoácido pertence. Por exemplo, os aminoácidos não-polares (hidrófobos) incluem alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina. Os aminoácidos neutros polares incluem glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina e glutamina. Os aminoácidos com carga positiva (básicos) incluem arginina, lisina e histidina. Os aminoácidos carregados negativamente (ácidos) incluem o ácido aspártico e o ácido glutâmico. Incluídas também no âmbito deste invento encontram-se as proteínas do CNTFR, ou seus fragmentos ou derivados, que foram modificados diferenciadamente durante ou após a tradução, por exemplo, por fosforilação, glicosilação, ligação cruzada, acilação, clivagem proteolítica, ligação a uma molécula de anticorpo, a uma molécula de membrana ou a outro ligando, (Ferguson et al., 1988, Ann. Rev. Biochem. 57:285-320).

Os péptidos do CNTFR deste invento podem ser preparados por técnicas de expressão de ácidos nucleicos recombinantes ou por síntese química, utilizando técnicas padrão de síntese peptídica.

5.4. EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO FACTOR NEUROTROFICO CILIAR

Para expressar o CNTFR recombinante a sequência nucleotídica que codifica a proteína do CNTFR, ou uma sua porção, pode ser inserida num vector de expressão apropriado, isto é, um vector que contenha os elementos necessários para a transcrição e tradução da sequência que codifica a proteína, inserida. Os sinais necessários para a transcrição e tradução podem também ser proporcionados pelo gene nativo do CNTFR e/ou pelas suas regiões flanqueadoras. Uma variedade de sistemas vector-hospedeiro podem ser utilizados para expressar a sequência codificadora da proteína. Estes incluem, mas não se limitam, a sistemas de células de mamíferos infectadas com vírus (e. g. vírus vacina, adenovírus,

etc.); sistemas de células de insectos (e. g. baculovírus); microrganismos tais como leveduras contendo vectores de levedura ou bactérias transformados com ADN de bacteriófago, ADN de plasmídeo ou ADN de cosmídeo. Os elementos de expressão daqueles vectores variam na sua força e especificidade. Dependendo do sistema vector-hospedeiro utilizado, qualquer um de um certo número de elementos de transcrição e tradução adequados poderá ser usado.

Numa concretização específica do invento, o gene do CNTFR pode estar incluído no vector de expressão pCMX, depositado no NRRL com o número de acesso B-18790.

Qualquer um dos processos descritos anteriormente para a inserção de fragmentos de ADN num vector pode ser usado na construção de vectores de expressão que contenham um gene quimérico, que consiste em sinais de controlo de transcrição/tradução e em sequências codificadoras de proteínas. Estes processos podem incluir técnicas sintéticas de ADN recombinante in vitro e recombinações in vivo (recombinação genética). A expressão da sequência de ácido nucleico que codifica a proteína ou fragmentos peptídicos do CNTFR pode ser regulada por uma segunda sequência de ácido nucleico de forma a que a proteína ou péptido do CNTFR seja expressa num hospedeiro transformado com a molécula de ADN recombinante. Por exemplo, a expressão do CNTFR pode ser controlada por qualquer elemento promotor intensificador conhecido na arte. Os promotores que podem ser usados no controlo da expressão do CNTFR incluem, mas não se limitam, à região do promotor precoce de SV40 (Beruoist e Chambon, 1981, Nature 290:304-310), o promotor de CMV, o promotor que está contido na repetição terminal longa, em 3', do vírus do sarcoma de Rous (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797), o promotor da timidina-cinase do herpes (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:144-145), as sequências reguladoras do gene da metalotionina (Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42); vectores de expressão de procariotas tais como o promotor da β -lactamase (Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731), ou o promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25), ver também "Useful proteins from recombinant bacteria" no Scientific American,



1980, 242:74-94; elementos promotores de leveduras ou outros fungos, tais como o promotor do Gal 4, o promotor da ADC (álcool-desidrogenase), o promotor PGK (fosfoglicerol-cinase), o promotor da fosfatase alcalina e as seguintes regiões de controlo transcricional em animais que exibem especificidade ao nível do tecido e têm sido utilizadas em animais transgénicos: região do controlo do gene da elastase I a qual é activa em células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, Cell, 38:693-646, Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515) a região de controlo da insulina a qual é activa nas células beta pancreáticas (Hanahanm 1985, Nature 315:115-122), a região de controlo do gene da imunoglobulina a qual é activa nas células linfóides (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:674-658; Adams et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell Biol. 7:1436-1444), a região de controlo do vírus do tumor mamário do ratinho a qual é activa nas células testiculares, da mama, linfóides e mastócitos (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495), a região de controlo do gene da albumina, a qual é activa no fígado (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276), a região de controlo do gene da alfafetoproteína, a qual é activa no fígado (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58), a região de controlo do gene da alfa 1-antitripsina, a qual é activa no fígado (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171), a região de controlo do gene da beta-globulina, a qual é activa nas células mielóides (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94), a região de controlo do gene da proteína mielina básica, a qual é activa nos oligodendrócitos do cérebro (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); a região de controlo do gene da cadeia leve-2 da miosina, a qual é activa no músculo estriado (Sani, 1985, Nature 314:283-286) e a região de controlo do gene da hormona gonadotrópica de libertação, a qual é activa no hipotálamo (Mason et al., Science 234:1372-1378).

Os vectores de expressão que contêm inserções do gene do CN-TFR podem ser identificados por três abordagens gerais: a) hibridação ADN-ADN, b) presença ou ausência de funções de gene



"marcador" e c) expressão de sequências inseridas. Na primeira abordagem, a presença de um gene estranho inserido num vector de expressão pode ser detectada por hibridação ADN-ADN através da utilização de sondas que compreendem sequências homólogas a um gene do CNTFR inserido. Na segunda abordagem, o sistema recombinante vector/hospedeiro pode ser identificado e seleccionado com base na presença ou ausência de certas funções de gene "marcador" (e. g. actividade da timidina-cinase, resistência a antibióticos, transformação do fenótipo, formação de corpos de oclusão em baculovírus, etc.) causada pela inserção de genes estranhos no vector. Por exemplo, se o gene do CNTFR for inserido na sequência do gene marcador do vector, os recombinantes contendo a inserção de CNTFR podem ser identificados pela ausência da função do gene marcador. Na terceira abordagem, vectores de expressão recombinantes podem ser identificados por ensaios de detecção do produto da expressão do gene estranho, expressa pelo recombinante. Tais ensaios podem basear-se nas propriedades físicas ou funcionais do produto do gene do CNTFR, por exemplo, pela ligação do receptor do CNTF a um anticorpo que reconhece directamente o CNTFR.

Numa concretização adicional, células que normalmente não expressem o CNTFR podem ser transfectadas com ácido nucleico recombinante, codificador do CNTFR e, posteriormente, testadas no que respeita à expressão do CNTFR funcional pela exposição dos transfectantes CNTF e depois pela medição do aumento dos níveis de AMPc.

Uma vez identificada e isolada uma molécula de ADN recombinante particular, a sua propagação pode ser conseguida através dos vários métodos conhecidos na arte. Após escolha do sistema hospedeiro adequado e das condições de crescimento, os vectores de expressão recombinantes podem ser propagados e preparados em quantidade. Tal como foi anteriormente referido, os vectores de expressão que podem ser utilizados incluem, mas não estão limitados, aos seguintes vectores ou seus derivados: vírus humanos ou animais, tais como os vírus vacina ou os adenovírus; vírus de insectos, tais como os baculovírus; vectores de leveduras; vectores de bacteriófagos (como o lambda) e vectores de ADN de plasmídeos



e cosmídeos para citar apenas alguns.

Adicionalmente, pode escolher-se uma estirpe de células hospedeiras que module a expressão das sequências inseridas ou que modifique e processe o produto do gene de um modo escolhido. A expressão a partir de certos promotores pode ser aumentada pela presença de certos indutores; desta forma pode controlar-se a expressão da proteína do CNTFR, manipulada geneticamente. Para além disso, células hospedeiras diferentes apresentam mecanismos característicos e específicos de processamento e modificação transducional e pós-transducional (ex: glicosilação, clivagem) de proteínas. Linhas celulares ou sistemas de hospedeiros apropriados podem ser escolhidos de forma a garantir a modificação ou processamentos desejados da proteína estranha expressa. Por exemplo, a expressão num sistema bacteriano pode ser usada para produzir um centro proteico não glicosilado. A expressão em leveduras pode ser usada para produzir o produto glicosilado. A expressão em células de mamíferos pode ser usada para garantir a glicosilação "nativa" de proteínas heterólogas do CNTFR. Por outro lado, diferentes sistemas de expressão vector/hospedeiro podem efectuar reacções de processamento tais como clivagens proteolíticas em diferentes extensões.

Uma vez identificado um recombinante que expresse o gene do CNTFR, o produto do gene deve ser analisado. Isto pode ser conseguido através de ensaios baseados nas propriedades físicas ou funcionais do produto.

Uma vez identificada a proteína do CNTFR ela pode ser isolada e purificada por métodos padrão, incluindo a cromatografia (ex: cromatografia de permuta iónica, de afinidade e de cromatografia de selecção por tamanhos em coluna), centrifugação, solubilização diferencial ou por qualquer outra técnica padrão para a purificação de proteínas. Em particular, a proteína do CNTFR pode ser isolada pela sua ligação a uma coluna de afinidade, compreendendo o CNTFR ligado a um suporte estacionário.

Proporcionam-se, também, sequências complementares às se-



quências de ADN ou ARN codificadoras do CNTFR ou uma sua porção funcionalmente activa. Num aspecto particular podem ser sintetizados oligonucleótidos anti-sentido ("antisense") a, pelo menos, uma porção do ARNm do CNTFR.

5.5. IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS RELACIONADAS COM O RECEPTOR DO FACTOR NEUROTROFICO CILIAR

Sistemas receptor múltiplo-factor têm sido definidos como aqueles onde o mesmo factor se pode ligar a diferentes receptores (ver supra). Como este pode ser o caso do CNTFR, o presente invento permite a identificação de qualquer receptor adicional do CNTF através de processos idênticos aos usados na obtenção do CNTFR, já aqui referidos, excepto no que refere à fonte de ARN usada na preparação da biblioteca de expressão de ADNC. Pode-se escolher um fonte que esteja muito provavelmente a exprimir um receptor diferente do receptor do CNTF; as fontes poderão ser testadas no que respeita a ligações de CNTF não atribuída ao CNTFR (sondas genéticas e reagentes de anticorpos, produzidos a partir de sequências do CNTFR poderão ser usadas para comparar as proteínas responsáveis pela ligação do CNTF em linhas celulares ou tecidos fonte com o CNTF aqui descrito). Adicionalmente, dado que são conhecidos receptores que ligam mais do que um factor relacionado (ver supra), a identificação do CNTFR deverá permitir a identificação de ligandos nativos adicionais que se liguem a este receptor.

Num aspecto adicional do invento, a sequência do CNTFR poderá ser usada na identificação de outras moléculas relacionadas com o CNTFR. O CNTFR possui motivos que são partilhados com uma variedade de outros receptores. A porção extracelular do CNTFR contém um domínio "imunoglobulina" na extremidade N bem como um domínio "receptor de citoquina" que se encontra separado do domínio "imunoglobulina" por uma curta região charneira. Embora muitos receptores apresentem homologia relativamente aos domínios "imunoglobulina" ou "receptor de citoquina", apenas um receptor - o receptor da IL-6 - partilha com o CNTFR a mesma disposição particular destes domínios. O receptor da IL-6 é, pois, a proteína mais relacionada com o CNTFR. Curiosamente, o receptor da IL-6

assemelha-se também ao CNTFR na medida em que possui um domínio intracitoplasmático muito curto que, aparentemente, não é necessário para iniciar respostas após a ligação da IL-6 (Hibi et al., 1990, Cell 63:1149-1157). Recentemente, foi clonado molecularmente um novo transductor de sinal para o receptor da IL-6, designado por gp 130. Este transductor não se liga directamente à IL-6, mas confere ao receptor da IL-6 uma alta afinidade de ligação e é necessário para a transdução do sinal da IL-6 (Hibi et al., 1990, Cell 63:1149-1157). A clonagem do CNTFR revela que ele partilha algumas características importantes com o receptor da IL-6, que não se encontram noutros receptores conhecidos, o que permitiu a definição de uma nova família de receptores. As homologias apresentadas por estes dois primeiros membros desta família de receptores, como foi definido pelo presente invento, podem ser usadas na identificação de receptores adicionais relacionados, usando sondas de ADN ou de anticorpos que correspondem às regiões homólogas, ou pela aplicação da técnica da reacção da polimerase, em cadeia, (PCR) juntamente com oligonucleótidos degenerados correspondentes a regiões partilhadas com homologia de aminoácidos (e. g. Maisonpierre et al., 1990. Science 247:1146-1451). O presente invento poderá também ser utilizado para testar se o CNTFR utiliza o mesmo transductor de sinal que o receptor da IL-6 ou se utiliza uma molécula relacionada. Finalmente, a identificação de receptores relacionados com o CNTFR poderá contribuir para a identificação de novos ligandos que se liguem aqueles receptores.

De acordo com o presente invento, pela pesquisa de uma biblioteca de ADN (compreendendo ADN genómico ou, preferencialmente ADNc) com oligonucleótidos correspondentes à sequência do CNTFR derivada de dados relativos à sequência proteica ou da sequência de ácido nucleico apresentada na Figura 2 (SEQ ID N.º. 1), podem identificar-se os clones que codifiquem novos membros da família acima referida. Pela diminuição da selectividade da hibridação, podem aumentar as hipóteses de identificar membros algo divergentes daquela família. Pode também ser desejável utilizar sequências substancialmente partilhadas pelos membros da família que foram sequenciados; essas regiões altamente conservadas poderão vir a ser particularmente úteis na identificação de membros adicio-



nais da família. O rastreio de bibliotecas pode ser realizado através da técnica de hibridação de Benton e Davis (1977, Science, 196:180) ou de Grunstein e Hogness (1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3961-3965). Os clones identificados por hibridação poderão ser analisados adicionalmente e novos membros da família poderão ser identificados pelo mapeamento dos fragmentos de restrição e por técnicas de sequenciação de acordo com os métodos bem conhecidos na arte.

Poderá ser conveniente utilizar a técnica da reacção da polimerase, em cadeia, (PCR) (Saiki et al., 1985, Science 230:1350-1354) para a identificação de membros adicionais da superfamília do CNTFR. Por exemplo, iniciadores com sentido ("sense") e anti-sentido, correspondentes a sequências conhecidas do CNTFR podem ser usadas na PCR, usando ADNc como molde. Pode ser desejável construir aqueles iniciadores de forma a que eles incluam locais de clivagem de enzimas de restrição que podem facilitar a inserção dos produtos obtidos na PCR em vectores de clonagem apropriados. Os produtos obtidos na PCR poderão ser inseridos em vectores adequados e os clones resultantes poderão ser pesquisados quanto a novos membros da família. Tal pesquisa pode ser efectuada através do emprego de técnicas padrão, incluindo análise de hibridação pelo uso de sondas correspondentes a sequências conhecidas. Por exemplo uma série de sondas representando regiões diferentes de uma proteína do CNTFR caracterizada podem ser hibridadas de forma a duplicar filtros contendo ADN de clones produzidos através da utilização da PCR, como foi anteriormente referido. Pode observar-se que vários clones podem hibridar com algumas sondas, mas não com outras. Novos membros da família podem também ser identificados pelo aumento da selectividade das condições de hibridação, enquanto que novos membros não idênticos a sondas derivadas de membros conhecidos hibridarão menos fortemente se a selectividade for maior. Alternativamente novos membros daquela família podem ser identificados por mapeamento de restrição ou pela análise de sequenciação através do uso de técnicas padrão, de forma a revelar diferenças nos mapas de restrição ou das sequências relativas a membros conhecidos.



Em concretizações adicionais, o presente invento proporciona moléculas que formam complexos com o CNTFR e que por isso podem participar na função do CNTFR. Por exemplo, verificou-se, por análise da sequência, que o CNTFR não parece possuir um domínio citoplasmático; pode, de facto, estar ligado à membrana por uma ligação GPI (glicosilfosfatidilinositol) (revisto em Fergunson et al., 1988, Ann. Rev. Biochem. 57:285-320). Isto sugere que pelo menos uma outra molécula forma uma associação com o CNTFR, para participar na transdução do sinal através da membrana celular. Tal molécula pode ser, por exemplo, uma proteína como a GP130 que é encontrada associada com o receptor da IL-6 (Taga et al., 1989, Cell 58:578-58); isto pode ser particularmente provável à luz da homologia entre o CNTFR e o receptor da IL-6. As moléculas que se encontram associadas com o CNTFR na membrana celular podem ser isoladas e identificadas por qualquer método conhecido na arte, incluindo, mas não se limitando, a métodos de ligação química cruzada, co-precipitação com anticorpos anti-CNTFR, ou através de CNTFR/marcador e/ou técnicas de purificação de proteínas ou de lípidos.

Para além disso, o presente invento proporciona outras moléculas, para além do CNTF, que podem ser capazes de se ligarem ao CNTFR. Essas moléculas são definidas como as que competem com o CNTFR, incluindo outros ligandos normais, pela ligação ao CNTFR e incluem péptidos, derivados de péptidos e compostos não pépticos (e. g. peptidomiméticos).

5.6. UTILIDADE DO INVENTO

5.6.1. SISTEMAS DE ENSAIO

O presente invento proporciona sistemas de ensaio nos quais a actividade do CNTF, ou actividades semelhantes à actividade do CNTF, resultantes da exposição a um composto peptídico ou não peptídico, pode ser detectada pela medição de uma resposta fisiológica ao CNTF numa célula ou linha celular que responde ao CNTF, a qual expressa moléculas de CNTFR do invento. Uma resposta fisiológica pode compreender qualquer efeito biológico do CNTF, incluindo, mas não se limitando àqueles descritos na Secção 2.2., supra, assim como à activação da transcrição de certas sequências

de ácidos nucleicos (e. g., elementos do promotor/intensificador assim como genes estruturais), processamento relacionado com o CNTF, tradução, fosforilação, indução de processos secundários em resposta a processos induzidos directa ou indirectamente pelo CNTF e alterações morfológicas, tais como o desenvolvimento de neurites, ou a capacidade de promover a sobrevivência das células tais como as células do gânglio ciliar, neurónios motores, células de Purkinje ou neurónios do hipocampo, para nomear apenas alguns.

Numa concretização específica preferida do invento, a interacção funcional entre o CNTF e o CNTFR pode ser observada pela detecção de um aumento da produção de genes precoces imediatos de resposta primária, activados em resposta a vários sinais transmembranares estimulados pelo factor de crescimento, incluindo, mas não se limitando a c-fos e c-jun. Por exemplo, a activação dos genes precoces imediatos pode ser detectada por análise por transferência Northern dos níveis de ARNm dos genes precoces imediatos. Numa concretização preferida do invento, os níveis de ARNm de c-fos e c-jun podem ser determinados por análise por transferência Northern de ARNm preparado a partir das células-alvo incubadas com CNTF, onde a actividade do CNTF é evidenciada por um aumento dos níveis de c-fos e c-jun. De notar, em concretizações particulares do invento, uma vez produzidas as células-alvo que contêm o ácido nucleico codificador do CNTFR recombinante ou seleccionadas por ligação ao CNTF, pode ser desejável assegurar que as células-alvo respondem caracteristicamente ao CNTF ou a compostos com actividade semelhante ao CNTF. No contexto do presente invento o termo "actividade semelhante ao CNTF" significa actividade biológica que é semelhante, podendo ou não ser idêntica à do CNTF; estas actividades incluem, mas não se limitam àquelas descritas na Secção 2.2 supra ou à activação de promotores precoces imediatos particulares, tais como os promotores de fos ou jun.

O presente invento contribui para o desenvolvimento de novos sistemas de ensaio que podem ser utilizados na pesquisa de compostos relativamente à actividade de CNTF ou à actividade



semelhante a CNTF. As células-alvo que se ligam ao CNTF podem ser produzidas por transfecção com ácido nucleico codificador do CNTFR ou pode ser identificado e segregado, por exemplo, por selecção de células activadas por fluorescência activada, sedimentação de rosetas ou diluição limitante como descrito na Secção 5.6.3., infra.

Uma vez produzidas ou identificadas linhas de células-alvo pode ser desejável seleccionar células que sejam excepcionalmente sensíveis ao CNTF. Estas células-alvo podem possuir um maior número de CNTFR; as células-alvo que possuem uma abundância relativa de CNTFR podem ser identificadas por selecção das células-alvo que se ligam a elevados níveis de CNTF, por exemplo células que quando incubadas com CNTF/marcador e submetidas a ensaios de imunofluorescência produzam um grau relativamente elevado de fluorescência. Alternativamente, células que sejam excepcionalmente sensíveis ao CNTF podem exhibir uma resposta biológica relativamente forte, tal como um aumento brusco nos produtos dos genes precoces imediatos, tais como c-fos ou c-jun, em resposta à ligação do CNTF. Através do desenvolvimento dos sistemas de ensaio, utilizando células-alvo, que são extremamente sensíveis ao CNTF, o presente invento proporciona processos de pesquisa para a actividade do CNTF ou actividade semelhante à do CNTF que são capazes de detectar baixos níveis de actividade do CNTF.

Em particular, utilizando técnicas de ADN recombinante, o presente invento proporciona células-alvo para o CNTF que são manipuladas de modo a serem altamente sensíveis ao CNTF. Por exemplo o gene do receptor do CNTF, clonado de acordo com os processos descritos na Secção 5.1., pode ser inserido em células que sejam naturalmente sensíveis ao CNTF, de tal modo que o gene do CNTFR recombinante seja expresso em níveis elevados e que as células-alvo, resultantes da manipulação, expressem um elevado número de CNTFR na sua superfície.

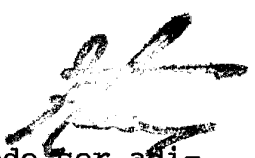
Alternativamente, ou adicionalmente, as células-alvo podem ser manipulados de modo a conter um gene recombinante que seja expresso a níveis elevados em resposta à ligação CNTF/receptor.



Este gene recombinante pode ser preferencialmente associado com um produto facilmente detectável. Por exemplo, mas não como limitação, regiões de controlo transcricional (isto é, regiões promotor/intensificador) de um gene precoce imediato podem ser utilizadas para controlar a expressão de um gene repórter numa construção que pode ser introduzida nas células-alvo. A construção gene precoce imediato/gene repórter expressa a níveis elevados nas células-alvo, por acção de um forte promotor/iniciador ou por um elevado número de cópias, pode ser utilizada para produzir uma resposta amplificada da ligação ao CNTFR. Por exemplo, e não como limitação, um promotor sensível ao CNTFR (tal como o promotor do c-fos e c-jun) pode ser utilizado para controlar a expressão de genes repórter detectáveis, incluindo a β -galactosidase, a hormona do crescimento, a cloranfenicol-acetiltransferase, a neomicina-fosfotransferase, a luciferase ou a β -glucoronidase. A detecção dos produtos destes genes repórter, bem conhecidos do perito na arte, pode servir com um indicador sensível da actividade do CNTF ou actividade semelhante à do CNTF, de compostos farmacêuticos.

As construções de gene codificador de CNTFR ou repórter ou as discutidas acima, podem ser inseridas em células-alvo utilizando qualquer processo conhecido na arte, incluindo, mas não limitado, a transfecção, electroporação, processos de fosfato de cálcio/DEAE dextrano e caçadeira celular ("cell gun"), assim como a produção de animais transgénicos possuindo as construções acima mencionadas como transgenes e a partir dos quais as células-alvo podem ser seleccionadas utilizando os processos acima referidos.

Os sistemas de ensaio do presente invento permitem a pesquisa eficiente de compostos farmacêuticos quanto à utilidade para o tratamento de doenças associadas ao CNTF. Por exemplo, e não como limitação, pode ser desejável pesquisar um agente farmacêutico quanto à actividade de CNTF e eficácia terapêutica na degeneração do cerebelo. Numa aplicação específica do invento, as células de Purkinje, sensíveis ao CNTF, podem ser identificadas, isoladas e depois cultivadas em microalvéolos numa placa de cultura de alvéolos múltiplos. O meio de cultura com o agente de teste adiciona-



do, ou com CNTF adicionado, em numerosas diluições, pode ser adicionado aos alvéolos conjuntamente com os controlos adequados. As células podem então ser examinadas quanto à sua sobrevivência melhorada, desenvolvimento de neurites, e assim por diante, e podem ser determinadas as actividades do agente de teste e do CNTF, assim como as suas actividades relativas. Como outro exemplo, mostram-se que as lesões dos neurónios motores respondem favoravelmente ao CNTF (Sendtner et al., 1990, Nature 345:440). Pode, assim, ser desejável identificar compostos semelhantes ao CNTF que possam, tal como o CNTF, evitar a morte celular dos neurónios motores após a axotomia. Os neurónios motores sensíveis ao CNTF podem ser utilizados em sistemas de ensaio para identificar compostos úteis no tratamento de doenças dos neurónios motores. Considerando que se verificou que o CNTF é eficaz na prevenção da morte celular dos neurónios motores após a axotomia, o que é claramente uma observação extremamente importante quando são planeados tratamentos para lesões da medula espinal, esclerose lateral amiotrófica e neuropatia diabética, na criação de drogas que poderão ser eficazes no tratamento destas desordens, incluindo as drogas que possam ser necessárias para passar a barreira sangüínea-cérebro, é essencial ter acesso a sistemas de pesquisa seguros e sensíveis, tal como os processos fornecidos pelo presente invento. Noutro exemplo, se se verificar que uma doença particular se encontra associada a uma resposta anormal ao CNTF num tecido particular, um tratamento razoável para a doença seria o de proporcionar CNTF exógeno ao paciente. No entanto, pode ser aconselhável desenvolver moléculas que possuam um tempo de semi-vida maior do que o CNTF endógeno ou que actuem como agonistas do CNTF, ou cujo alvo seja um tecido em particular. Deste modo, os processos deste invento podem ser utilizados para produzir sistemas de pesquisa eficientes e sensíveis, que possam ser utilizados para identificar moléculas com as propriedades desejadas. Sistemas de ensaio semelhantes podem ser utilizados para identificar antagonistas de CNTF.

5.6.2. SISTEMAS DE MODELO EXPERIMENTAIS

O presente invento proporciona também sistemas de modelo experimentais para estudar o papel fisiológico do CNTF. Nestes sis-



temas de modelo, a proteína do CNTF, fragmentos peptídicos, ou seus derivados, podem ser fornecidos ao sistema ou produzidos no próprio sistema. Estes sistemas de modelo podem ser utilizados para estudar os efeitos do excesso ou carência do CNTFR. Os sistemas de modelo experimentais podem ser usados no estudo dos efeitos do aumento ou diminuição da resposta ao CNTFR em culturas de células ou de tecidos, nos próprios animais, em células ou tecidos particulares num animal vivo ou em sistemas de cultura de tecidos ou durante determinados períodos de tempo (inclusive durante a embriogénese) em concretizações nas quais a expressão do CNTFR é controlada por um promotor induzível ou regulado no decurso do desenvolvimento. Em concretizações particulares deste invento, o promotor do CMV pode ser usado para controlar a expressão do CNTFR em animais transgénicos. O termo "animais transgénicos" tal como aqui usado, refere-se a animais transgénicos não humanos, incluindo mosaicos transgénicos, portadores de um transgene em algumas ou em todas as suas células, que incluem quaisquer espécie não humana e que foram produzidos por qualquer método conhecido na arte, incluindo, mas não se limitando a técnicas de micro-injecção, fusão celular, transfecção, electroporação, etc.. Por exemplo, os animais podem ser produzidos por um método de micro-injecção de zigotos, como o descrito em Brinster et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:4438-4442.

O presente invento também proporciona sistemas de modelo de doenças auto-imunes, nas quais a resposta auto-imune é dirigida no sentido do CNTFR. Estes modelos compreendem animais que foram imunizados com quantidades imunogénicas de CNTFR e que se verificou, preferivelmente que produziam anticorpos anti-CNTFR e/ou imunidade mediada por células. Para produzir tal sistema de modelo, pode ser desejável administrar o CNTFR conjuntamente com um adjuvante imunitário como o bacilo de Calmette e Guérin (BCG).

5.6.2.1. MODELOS PARA ACTIVIDADE NO CNTF AUMENTADA

Por exemplo, e não como limitação, um sistema de modelo experimental pode ser criado de forma a ser usado no estudo dos efeitos do excesso de actividade do CNTF. Num tal sistema, a resposta ao CNTF pode ser aumentada pelo aumento, através de técni-

cas de engenharia genética, do número de CNTFR das células que constituem o sistema de modelo relativamente a células que não foram manipuladas. Pode ser preferível proporcionar selectivamente um número de CNTFR aumentado em células que, normalmente, expressam os CNTFR.

As células podem ser modificadas de forma a produzir um maior número de CNTFR por infecção com um vírus portador de um gene do CNTFR do invento. Alternativamente, o gene do CNTFR pode ser proporcionado a células por transfecção.

Se o sistema de modelo é um animal, um gene recombinante do CNTFR pode ser introduzido nas células do animal por infecção com um vírus portador do gene do CNTFR. Alternativamente, pode criar-se um animal transgénico, portador do gene do CNTFR como um transgene.

De forma a assegurar a expressão do CNTFR, o gene de CNTFR deverá ser colocado sob o controlo de uma sequência promotora adequada. Pode ser desejável colocar o gene do CNTFR sob o controlo de um promotor constitutivo e/ou específico para um tecido, incluindo, mas não se limitando ao promotor da enolase específica do neurónio do SNC do neurofilamento, e da tirosina-hidroxilase, um promotor induzível tal como o promotor da metalotionina, o promotor, activado por UV na repetição terminal longa do vírus da imunodeficiência adquirida humana (Valeri et al., 1988, Nature 333:78-81), ou o promotor do CMV (contido no pCMX, infra) ou um promotor regulado no decurso do desenvolvimento.

Pelo aumento do número de CNTFR celulares, pode conseguir-se um aumento da resposta ao CNTF endógeno. Se o sistema de modelo possui uma quantidade diminuta ou mesmo nula de CNTF, este poderá ser adicionado ao sistema. Pode também ser desejável adicionar CNTF adicional ao sistema de modelo de forma a ser possível avaliar os efeitos do excesso de actividade do CNTF. Uma sobre-expressão (ou secreção) do CNTF poderá constituir o melhor processo para estudar os efeitos da presença de níveis elevados de CNTF em células que já expressam o CNTFR. Mais preferível seria expressar

o CNTFR em todas as células (expressão geral) e determinar quais as células que são, então, dotadas com capacidade de resposta funcional ao CNTF, permitindo assim, a identificação de um segundo componente receptor, caso ele exista.

5.6.2.2. MODELOS PARA ACTIVIDADE DO CNTF DIMINUÍDA

Alternativamente, como exemplo, mas não como limitação, um sistema de modelo experimental pode ser criado de forma a ser usado no estudo dos efeitos da actividade diminuída do CNTF. Este sistema pode permitir a identificação de processos ou de neurónios que necessitem de CNTF e que representem potenciais alvos terapêuticos. Num tal sistema, a resposta ao CNTF pode ser diminuída se forem proporcionados CNTFR que não estejam associados com a superfície celular ou que tenham sido modificados de forma a não serem eficazes na transdução da resposta ao CNTF.

Por exemplo, a proteína do CNTFR, o péptido ou derivado pode ser fornecido ao sistema de forma a que o receptor assim fornecido possa competir com o CNTFR endógeno pela ligação do CNTF diminuindo, assim, a resposta ao CNTF. O CNTFR pode ser uma célula isenta de receptor que é adicionada ao sistema ou produzida pelo sistema. Por exemplo, uma proteína do CNTFR que não possua o domínio transmembranar pode ser produzida por células dentro do sistema, tal como um CNTFR sem âncora que pode ser segregado a partir da célula produtora. Alternativamente, a proteína, o péptido ou o derivado do CNTFR pode ser adicionado a um espaço extracelular dentro do sistema.

Em concretizações adicionais do invento, um gene recombinante do CNTFR pode ser usado para inactivar ou "pôr fora de acção" o gene endógeno por recombinação homóloga, criando, assim, uma célula, tecido ou animal deficiente em CNTFR. Por exemplo, e não como limitação, um gene recombinante do CNTFR pode ser alterado, de forma a conter uma mutação de inserção como, por exemplo, o gene neo, o qual inativa o CNTFR. Tal construção, sob o controlo de um promotor adequado, pode ser introduzida numa célula, tal como uma célula-mãe embrionária, através de técnicas como a transfecção, transdução, injeção, etc.. As células que contenham

a construção podem ser seleccionadas pela resistência a G418. As células desprovidas do gene intacto do CNTFR poderão ser, posteriormente identificadas, por exemplo, por transferência Southern ou transferência Western ou por análise da expressão. As células, desprovidas do gene intacto do CNTFR, podem, posteriormente, ser fundidas com células embrionárias precoces, de forma a gerar animais transgénicos, deficientes em CNTFR. A comparação de um tal animal com um animal que não expressa o CNTF endógeno poderá revelar que os dois fenótipos coincidem completamente ou que não coincidem, o que implica a presença de factores ou receptores adicionais semelhantes ao CNTF.

Tal animal poderá ser utilizado para definir populações específicas de neurónios, ou quaisquer outros processos in vivo, normalmente dependentes do CNTF. Assim é de esperar que aquelas populações ou processos sejam afectados se o animal não expressar o CNTFR e, desta forma, não possa responder ao CNTF.

Alternativamente, uma proteína péptido ou derivado do CNTFR recombinante que compita com o receptor endógeno para o CNTF, pode ser expresso na superfície de células dentro do sistema, podendo ser alterada, de forma a impedir a transdução da resposta à ligação do CNTF.

As proteínas, péptido ou derivados do CNTFR recombinantes, descritos acima, podem ligar o CNTF, com uma afinidade semelhante ou diferente da afinidade do CNTFR endógeno relativamente ao CNTF. Para diminuir mais eficientemente a resposta ao CNTF, a proteína, péptido ou derivado do CNTFR, poderá ligar o CNTF com uma maior afinidade do que a exibida pelo receptor nativo.

Se a proteína, péptido ou derivado do CNTFR, é produzida no seio do sistema de modelo, o ácido nucleico codificador da proteína, o péptido ou o derivado do CNTFR, poderá ser fornecido ao sistema por infecção, transdução, transfecção, etc., ou como um transgene. Tal como discutido acima, o gene do CNTFR poderá ser colocado sob o controlo de um promotor adequado, o qual poderá, por exemplo, ser um promotor específico para um tecido ou



um promotor induzível ou um promotor regulado no decurso do desenvolvimento.

Numa concretização específica do invento, o gene endógeno do CNTFR de uma célula poderá ser substituído por um gene mutante do CNTFR por recombinação homóloga.

Em concretizações adicionais do invento, a expressão do CNTFR pode ser reduzida, proporcionando células que expressam CNTFR com quantidades de ARN ou ADN anti-sentido, eficazes na redução da expressão da proteína do CNTFR.

5.6.3. APLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO

De acordo com o presente invento, podem ser usadas sondas de CNTFR na identificação de células ou tecidos que respondem ao CNTFR em estados normais ou de doenças. O presente invento proporciona processos para a identificação de células que respondam ao CNTFR que compreendem detectar a expressão do CNTFR nessas células. A expressão do CNTFR pode ser evidenciada pela transcrição do ARNm do CNTFR ou pela produção da proteína do CNTFR. A expressão do CNTFR pode ser detectada utilizando sondas que identificam o ácido nucleico ou a proteína do CNTFR.

Um tipo de sondas que pode ser utilizado na detecção da expressão do CNTFR é uma sonda de ácido nucleico a qual pode ser usada na detecção do ARN codificador do CNTFR, por qualquer processo conhecido na arte, incluindo mas não se limitando a hibridação in situ, análise por transferência Northern ou técnicas relacionadas com PCR.

Outro tipo de sondas que pode ser utilizado é o CNTFR marcado, como referido na U.S. N.º. de Série 07/532 285, cujo texto completo está aqui incorporado para referência.

De acordo com o presente invento, o termo CNTF "marcado" deve ser entendido como uma molécula de CNTF que se encontra ligada a um segundo composto detectável (o "marcador"). O composto detectável pode compreender um radioisótopo, uma porção fluo-

cente, ou um ligando capaz de se ligar a um receptor ou uma substância detectável por colorimetria ou que apresenta actividade catalítica. Em concretizações preferidas, o marcador pode ser uma determinante antigénica tal como um anticorpo que é capaz de se ligar ao marcador. Em concretizações específicas, o marcador pode ser o próprio anticorpo; numa concretização específica do invento o marcador é o anticorpo monoclonal RP3-17. É desejável que o marcador não interfira com a actividade biológica do CNTF e que os métodos de detecção do marcador não interfiram substancialmente com a ligação do CNTF ao seu receptor.

O marcador pode ser ligado ao CNTF utilizando qualquer método conhecido na arte. Em concretizações preferidas do invento, o marcador é ligado covalentemente ao CNTF, mas em alguns casos pode ser desejável ligar o marcador por forças não-covalentes (por exemplo se o marcador for uma molécula imunoglobulina).

O marcador pode apresentar qualquer peso molecular adequado para conservar a sua função de detector sem alterar substancialmente a actividade biológica do CNTF que a ele se encontra ligado. Se o marcador possuir uma determinante antigénica, é desejável que ele compreenda pelo menos 5 a 15 aminoácidos.

De modo a ilustrar, mas não como limitação, num processo específico do invento, o CNTF pode ser marcado utilizando uma reacção de polimerase em cadeia de "remendo", na qual o factor neurotrófico recombinante (CNTF) é manipulado de forma a possuir no seu terminal C 10 aminoácidos correspondentes a uma determinante antigénica conhecida. Por exemplo, mas não como limitação, esta determinante antigénica pode corresponder a um epítipo definido da proteína do proto-oncogene humano c-myc.

Por exemplo, e não como limitação, o processo de PCR de "remendo" pode ser utilizado para ligar o marcador myc de 10 amino-ácidos como a seguir se descreve (o presente invento proporciona qualquer marcador de aminoácido ligado através de processos análogos). Um iniciador 5' de PCR, corresponde a uma sequência do CNTF a montante de um local de enzima de restrição único numa



construção de expressão bacteriana, pode ser utilizado numa reacção de PCR com um iniciador de "remendo" que compreende uma sequência de ácidos nucleicos, correspondente à sequência do CNTF do terminal 3', e uma sequência de ácido nucleico codificadora do péptido marcador, utilizando ADNc de células sensíveis ao CNTF como molde.

A reacção de PCR deve também conter um iniciador 3', correspondente à sequência do iniciador de "remendo" e incluir uma sequência de ácido nucleico que incorpora locais de endonucleases de restrição únicos. Em concretizações preferidas, os iniciadores 5' e 3' podem ser utilizados em excesso em relação ao iniciador de "remendo", de forma a que a amplificação por PCR entre o iniciador 5' e o iniciador de "remendo" possa terminar após poucos ciclos de PCR, enquanto que a amplificação entre os iniciadores 5' e 3' possa iniciar-se e continuar a produzir um alto rendimento da sequência CNTF/marcador de comprimento total. A técnica de "remendo" ultrapassa a necessidade de iniciadores longos cuja síntese pode ser difícil ou demorada. O produto CNTF/marcador amplificado pode ser purificado em gel, digerido com enzimas de restrição que clivem em locais inseridos por engenharia genética, nos terminais do produto e depois subclonados nos correspondentes locais de restrição de um vector de expressão. Por exemplo, para produzir o CNTF-marcador myc, os iniciadores seguintes podem ser utilizados: iniciador 5' = 5' GAC TCG AGT CGA CAT CGG AGG CTG ATG GGA TGCC 3' (SEQ ID N.º. 3), iniciador de "remendo" = 3' CTA AAG ACT CCT CCT AGA CAT CGC CGG CGT ATCG 5' (SEQ ID N.º. 4); os iniciadores podem ser utilizados numa razão de 100 ng do iniciador 5'/100 ng de iniciador 3'/1 ng iniciador de "remendo"; para detalhes ver a Secção 6, infra. A expressão do CNTF/marcador pode ser efectuada como descrito para a expressão do CNTF recombinante no Pedido de Patente dos EUA N.º. de Série 07/570 651, intitulada "Ciliary Neurotrophic Factor", depositada em 20 de Agosto de 1990, ou na Publicação de PCT N.º. W091(04316, publicado em 4 de Abril de 1990 por Sendtner et al..

O presente invento proporciona também um marcador que compreende uma molécula de imunoglobulina, ou uma sua porção, por

exemplo um fragmento Fc, F(ab)₂ ou F(ab)' de uma molécula de anticorpo. O marcador deverá ligar-se ao CNTF e pode ser um anticorpo policlonal ou monoclonal.

De acordo com o invento, o CNTF marcado pode ser incubado com células em condições que promovam a ligação do CNTF a essas células. Em muitos casos, isto pode ser conseguido com condições de cultura padrão. Por exemplo, numa concretização preferida do invento as células podem ser incubadas durante cerca de 30 minutos na presença do CNTF marcado. Se o marcador for uma molécula de anticorpo pode ser preferível permitir primeiro que o CNTF se ligue às células e, subsequentemente, lavar as células de forma a remover o ligando não-ligado e depois adicionar o anticorpo marcador anti-CNTF.

Em concretizações particulares do invento, o CNTF marcado à superfície de células sensíveis ao CNTF, a partir de agora designadas células alvo, pode ser detectado por ensaios de roseta, nos quais células indicadoras capazes de se ligarem ao marcador são incubadas com células que possuam o CNTF/marcador de tal forma que adiram ao CNTF/marcador na superfície destas células, de modo a formarem agregados em forma de roseta à volta das células que possuam o CNTF/marcador. Estas rosetas podem ser visualizadas por técnicas normais de microscopia em células em cultura em placas ou, alternativamente, podem-se separar as células em roseta das células que não estão em roseta por centrifugação em gradiente de densidade. Numa concretização específica preferida do invento, as células alvo tais como neurónios podem ser colhidas e colocadas em cultura em placas a uma concentração de cerca de 200 células/alvéolo numa placa de cultura de múltiplos alvéolos (ex.: 60 alvéolos), num meio como o RPMI 1640 contendo 10% de soro bovino fetal e 2 mM de glutamina. As células em cultura em placa podem ser incubadas durante 16 a 24 horas a 37°C numa estufa contendo uma atmosfera húmida e 5% de CO₂, de forma a permitir a adesão. Depois, pode ser removido o excesso de meio de cultura e as células podem ser incubadas durante cerca de 30 minutos, à temperatura ambiente, com o CNTF marcado. As células podem depois ser lavadas várias vezes com PBS (com cálcio e magnésio) suplementado



com 1% de albumina de soro bovino (BSA), de forma a remover o ligando não ligado e depois incubadas durante cerca de 30 minutos à temperatura ambiente com cerca de 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticorpo que reconhece a molécula do marcador. As células podem ser lavadas várias vezes com PBS, de forma a remover o anticorpo não ligado. De seguida, as células alvo (que apresentam o CNTF/marcador ligado ao anticorpo anti-marcador) podem ser incubadas à temperatura ambiente durante uma hora com uma suspensão de cerca de 0,2% (v/v) de células indicadoras formadoras roseta, que se ligam ao anticorpo anti-marcador (tais como as células indicadoras que possuem imunoglobulina de coelho anti-ratinho). As placas podem ser depois lavadas e observadas no microscópio de contraste de fase para a detecção de rosetas. Por exemplo, se um anticorpo anti-marcador for produzido por um ratinho, as células indicadoras podem ser produzidas revestindo eritrócitos (tais como eritrócitos humanos O^+) com anticorpo anti(imunoglobulina de ratinho) produzido por outra espécie. As células indicadoras podem ser preparadas incubando eritrócitos com anticorpo anti-imunoglobulina (a uma concentração superior a 1 mg/ml) na presença de 0,01% de $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ diluído em solução salina de acordo com o procedimento de Albino et al. (1981, J. Exp. Med. 154:1764-1778). Alternativamente, podem ser usados partículas magnéticas ou outros processos conhecidos na arte.

Em concretizações alternativas do invento, o CNTF marcado à superfície de células alvo pode ser detectado pela utilização de técnicas de imunofluorescência, nas quais uma molécula que reaja com o marcador, preferencialmente um anticorpo, produz, directa ou indirectamente, fluorescência. A fluorescência pode ser observada por microscopia ou utilizada para segregar células contendo o CNTF/marcador por selecção de células activadas por fluorescência. Numa concretização específica do invento, apresentada como exemplo, as células alvo podem ser trituradas e ressuspensas num tampão de ensaio contendo o CNTF/marcador (com concentração em excesso) e azida de sódio (0,05%) durante cerca de 30 minutos a 4°C . As células podem depois ser lavadas três vezes com o tampão de ensaio por centrifugação a 800 rpm durante 5 minutos. As células podem então ser incubadas com o anticorpo anti-marcador a uma

concentração de cerca de 10 $\mu\text{g/ml}$, durante cerca de 30 minutos a 4°C, lavadas como acima referido e depois incubadas com anti-imunoglobulina biotinada e um conjugado estreptavidina-vermelho do Texas, durante cerca de 30 minutos a 4°C. As células podem então ser lavadas, ressuspensas em solução de montagem, cobertas com uma lamela e examinadas por microscopia de fluorescência.

O presente invento também proporciona processos para detectar outras formas de marcadores, tais como marcadores cromogénicos, catalíticos, etc.. Os processos de detecção para um dado marcador dependem das condições necessárias para produzir um sinal do marcador, mas devem ser facilmente discerníveis por um perito na arte.

Contudo uma outra variedade de sondas que pode ser usada é o anticorpo anti-CNTFR.

De acordo com o invento, a proteína do CNTFR, ou os seus fragmentos ou derivados, podem ser utilizados como um imunogénio para a produção de anticorpos anti-CNTFR. Proporcionando a produção de quantidades relativamente abundantes de proteína do CNTFR, usando técnicas recombinantes para a síntese proteica (baseada nas sequências de ácido nucleico do CNTFR proporcionadas pelo invento), o problema da limitação da quantidade do CNTFR foi obviado.

De modo a melhorar ainda a probabilidade de produzir uma resposta imunitária anti-CNTFR, a sequência de aminoácidos do CNTFR pode ser analisada de modo a identificar porções da molécula que possam estar associadas com imunogenicidade aumentada. Por exemplo, a sequência de aminoácidos pode ser submetida à análise por computador para identificar epítomos de superfície, que se apresentam como pontos gerados pelo computador, de hidrofília, probabilidade de superfície, flexibilidade, índice antigénico, hélice anfifílica, folha anfifílica e estrutura secundária do CNTFR. Alternativamente, as sequências de aminoácidos deduzidas do CNTFR de diferentes espécies podem ser comparadas e regiões relativamente não-homólogas identificadas; estas regiões não-homólo-



gas provavelmente serão mais imunogénicas entre as várias espécies.

Para a preparação de anticorpos monoclonais específicos dirigidos para o CNTFR, qualquer técnica que proporcione a produção de moléculas de anticorpo por linhas celulares contínuas em cultura pode ser utilizada. Por exemplo, a técnica do hibridoma, originalmente desenvolvida por Kohler e Milstein (1977, Nature 256:495-497), bem como a técnica do trioma, a técnica do hibridoma das células B humanas (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72) e a técnica do hibridoma EBV para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Cole et al., 1985, in "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96), e similares estão dentro do âmbito do presente invento.

Os anticorpos monoclonais para o uso terapêutico, podem ser anticorpos monoclonais humanos ou anticorpos monoclonais quiméricos humanos anti-ratinho (ou outras espécies). Os anticorpos monoclonais humanos podem ser obtidos por qualquer uma das numerosas técnicas conhecidas na arte (e. g., Teng et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:7308-7312; Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72-79; Olsson et al., 1982, Meth. Enzymol. 92:3-16). As moléculas de anticorpos quiméricos podem ser preparadas de forma a conterem um domínio de ligação a um antigénio de rato e uma região constante humana (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851; Takeda et al., 1985, Nature 314:452).

Vários procedimentos conhecidos na arte podem ser utilizados para a produção de anticorpos policlonais específicos para epítopos do CNTFR. Para a produção de um anticorpo vários animais hospedeiros podem ser imunizados por injeção da proteína do CNTFR ou seu fragmento ou derivado, incluindo, mas não se limitando, a coelhos, ratinhos, ratazanas, etc.. Vários adjuvantes podem ser utilizados para aumentar a resposta imunológica, dependendo das espécies hospedeiras utilizadas e incluindo, mas não se limitando, aos adjuvantes completo e incompleto de Freund, geles minerais tais como hidróxido de alumínio, substâncias activas de

superfície tais como a lisolecitina, polióis plurónios, polianíons, péptidos, emulsões oleosas, hemocianinas de lapa (gênero *Fissurella*), dinitrofenol e adjuvantes, potencialmente úteis para o Homem, como o BCG (bacilo de Calmette e Guérin) e o *Corynebacterium parvum*.

Um clone molecular de um anticorpo específico para um epítopo de CNTFR pode ser preparado por técnicas conhecidas. A metodologia do ADN recombinante (ver por exemplo, Maniatis et al., 1982, "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) pode ser usada para construir sequências de ácido nucleico que codificam uma molécula de anticorpo monoclonal ou uma sua região de ligação a antígeno.

As moléculas de anticorpo podem ser purificadas por técnicas conhecidas como por exemplo, cromatografia de imunoabsorção ou de imunoafinidade, métodos cromatográficos, tais como HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), ou uma combinação destes, etc..

O presente invento proporciona moléculas de anticorpo, bem como fragmentos dessas moléculas de anticorpo. Os fragmentos do anticorpo que possuem o ideotipo da molécula podem ser produzidos por técnicas conhecidas. Por exemplo, tais fragmentos incluem, mas não se limitam ao fragmento $F(ab')_2$, o qual pode ser produzido por digestão da molécula do anticorpo com pepsina; aos fragmentos Fab' , os quais podem ser obtidos pela redução das pontes disulfureto do fragmento $F(ab')_2$ e aos fragmentos Fab que podem ser obtidos pelo tratamento da molécula do anticorpo com papaína e um agente redutor.

As sondas acima mencionadas, podem ser utilizadas experimentalmente na identificação de células ou tecidos que até agora não mostrem expressar o CNTFR. Para além disso, estes processos podem ser utilizados para identificar a expressão do CNTFR em tecidos aberrantes, tal como tumores. Em concretizações adicionais, estes processos podem ser usados em diagnóstico para comparar a expressão do CNTFR em células, fluidos ou tecido de um paciente

que sofra de uma desordem, com células, fluidos ou tecido de uma pessoa saudável. A palavra "fluido" refere-se a qualquer fluido corporal, mais particularmente ao sangue ou ao fluido cerebrospinal. Uma diferença nos níveis de expressão do CNTFR no paciente quando comparados com os de uma pessoa saudável podem indicar que a desordem do paciente pode estar relacionada, primária ou secundariamente, com o metabolismo do CNTFR. Um aumento dos níveis de CNTFR, por exemplo pode indicar que a desordem do paciente se encontra associada a um aumento da sensibilidade a níveis normais de CNTF ou, alternativamente, pode sugerir que os níveis de CNTF do paciente sejam tão baixos que tenham provocado um aumento do número de receptores, como modo de compensação. Estas etiologias podem ser distinguidas umas das outras pela administração de CNTF ao paciente. Se a sua condição piorar o paciente pode sofrer de hipersensibilidade ao CNTF; se a sua condição melhorar ele pode sofrer de deficiência de CNTF. Regimes terapêuticos baseados em CNTF ou em antagonistas do CNTF podem ser escolhidos de acordo com a situação. As diferenças na expressão podem ser detectadas ao nível proteico e/ou do ARN; isto é, pela medição da quantidade da proteína do CNTFR ou do ARN do CNTFR num paciente, relativamente às mesmas quantidades numa pessoa saudável.

As sondas acima mencionadas podem também ser utilizadas para seleccionar células sensíveis ao CNTFR para uso em sistemas de ensaio, tal como descrito acima, no Pedido de Patente dos E.U.A. Nº. de Série 07/532 285 ou de acordo com processos padrão de selecção e escolha de células.

5.6.4. APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

O presente invento também proporciona processos nos quais um paciente sofrendo de uma desordem, tal como uma desordem neurológica, é tratado com uma quantidade eficaz de proteína do CNTFR, fragmento de péptido ou um derivado deste invento. Os processos terapêuticos, incluindo a administração de CNTFR, de agonistas do CNTFR, antagonistas do CNTFR (que competem com o CNTF endógeno) ou anticorpos anti-CNTFR, estão dentro do âmbito do presente invento.

O presente invento também proporciona composições farmacêuticas compreendendo proteínas do CNTFR, fragmentos de péptidos ou derivados num veículo farmacológico adequado.

A proteína do CNTFR, o fragmento de péptido ou o derivado pode ser administrado sistemicamente ou localmente. Qualquer modo de administração apropriado conhecido na arte pode ser utilizado incluindo, mas não se limitando, à administração intravenosa, intratecal, intra-arterial, intranasal, oral, subcutânea, intraperitoneal ou injeção local ou por implantação cirúrgica. As formulações de libertação sustida são também proporcionadas.

À medida que o conhecimento das doenças neurodegenerativas/neurotraumas se tornou mais claro, tornou-se evidente que pode ser benéfica a diminuição do efeito trófico do CNTF endógeno. Assim, em áreas de trauma do sistema nervoso, pode ser desejável proporcionar antagonistas do CNTF, incluindo, mas não se limitando, a CNTFR isento de células que pode competir com o receptor celular endógeno pela ligação do CNTF. Nestas circunstâncias pode ser desejável proporcionar o antagonista do CNTF localmente no local traumatizado, em vez de ser aplicado sistemicamente. A utilização de uma implantação que proporcione o CNTFR pode ser desejável.

Alternativamente, certas condições podem beneficiar de um aumento da sensibilidade ao CNTF. Pode, portanto, ser benéfico aumentar o número ou a afinidade de ligação dos CNTFR em pacientes que sofram de tais condições. Isto pode ser conseguido através de terapia de gene. A expressão selectiva de CNTFR recombinante em células apropriadas, pode ser conseguida utilizando genes de CNTFR controlados por promotores induzíveis ou específicos de tecido ou pela produção de infecção localizada com vírus defectivos de replicação, contendo um gene de CNTFR recombinante. As condições que podem ser beneficiadas através de um aumento da sensibilidade ao CNTF incluem particularmente, mas não estão limitadas, a desordens de neurónios motores, incluindo esclerose lateral amiotrófica, a doença de Werdnig-Hoffmann, atrofia muscular crónica da espinal proximal e o síndrome pós-polio. Tal tra-

tamento pode também ser utilizado em desordens neurológicas associadas com diabetes, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e coreia de Huntington.

O invento proporciona ainda tratamento para as desordens de um tecido ou tipo de células específico, pela administração de CNTF, desde que aqueles expressem receptores do CNTF. Numa concretização específica mostrou-se que o gene do CNTFR é expresso nas células musculares (ver Secção 8, infra) e que o CNTF evita a perda de peso muscular e de conteúdo de proteína miofibrilar associado à atrofia desnervativa in vivo (ver Secção 9, infra). Do mesmo modo, o presente invento proporciona processos de tratamento para desordens de células musculares ou desordens envolvendo a unidade neuromuscular, compreendendo a administração ao paciente com necessidade de tal tratamento de (i) uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência nucleotídica que codifica o CNTFR ou uma sua porção funcionalmente activa ou um seu derivado, de modo a ser expresso, ou de (ii) CNTF, ou uma sua porção funcionalmente activa ou um seu derivado. Tais desordens incluem, mas não se limitam, àquelas nas quais alterações atroficas ou distróficas do músculo constituem a principal patologia encontrada. Por exemplo, essa atrofia muscular pode resultar da desnervação (perda de contacto entre o músculo e o respectivo nervo) devido a trauma do nervo; neuropatias periféricas degenerativas, metabólicas ou inflamatórias (e. g. síndrome de Guillian-Barre) ou lesão dos nervos causada por toxinas ambientais ou drogas. Noutra concretização, a atrofia muscular resulta de desnervação causada por neuropatia motora. Estas neuropatias motoras incluem, mas não se limitam, a: doença de neurónio motor adulto, incluindo esclerose lateral amiotrófica (ALS ou doença de Lou Gehrig); atrofia musculares espinais infantis ou juvenis e neuropatia motora auto-imune com bloqueio da condução multifocal. Noutra concretização, a atrofia muscular resulta de desuso crónico. Esta atrofia de desuso pode derivar de condições incluindo, mas não se limitando a: paralisia devido a um ataque, trauma da medula espinal, trauma cerebral ou outros traumas do Sistema Nervoso Central; imobilização esquelética devido a trauma (tal como a fractura, entorse ou deslocação) ou acamados por longos

períodos. Ainda noutra concretização, a atrofia muscular resulta da tensão metabólica ou insuficiência nutricional, incluindo, mas não limitada, a caquexia do cancro e outras doenças crónicas, jejum ou rabdomioblastoma, desordens endócrinas tais como, mas não se limitando a, desordens da glândula tiróide e diabetes. A atrofia muscular pode também ser devida a um síndrome de distrofia muscular, incluindo, mas não limitado aos tipos de Duchenne, Becker, miotónico, facioescapulo-humeral, Emery-Dreifuss, oculofaringeal, escapulo-humeral, invólucro dos membros ("limb girdle") e congénitos e a distrofia conhecida como Miopatia Distal Hereditária. Numa concretização adicional, a atrofia muscular é devida a uma miopatia congénita, incluindo, mas não limitado a Hipotonia Congénita Benigna, doença do núcleo central, Miopatia Nemalina e miopatia Miotubular (centronuclear). Adicionalmente, os ácidos nucleicos codificadores de CNTFR ou o CNTF e os seus fragmentos activos ou seus derivados podem ser utilizados no tratamento de miopatias adquiridas (tóxicas ou inflamatórias). As miopatias que ocorram como uma consequência de uma doença inflamatória de um músculo incluem, mas não estão limitadas a polimiosites e dermatomiosites. As miopatias tóxicas podem ser devidas a agentes incluindo, mas não se limitando a amiodarona, cloroquina, clofibrato, colchicina, doxorubicina, etanol, hidroxicloquina, organofosfatos, peri-hexilina e vincristina.

Noutra concretização adicional do invento, os pacientes que sofram de um excesso de CNTFR, hipersensibilidade ao CNTF, excesso de CNTF, etc., podem ser tratados pela administração de quantidades eficazes de ARN anti-sentido ou oligodesoxiribonucleótidos anti-sentido, correspondentes à região codificadora do gene do CNTFR diminuindo, deste modo, a expressão do CNTFR.

6. EXEMPLO: EXPRESSÃO DA CLONAGEM DO RECEPTOR DO FACTOR NEUROTROFICO CILIAR

6.1. MATERIAIS E PROCESSOS

6.1.1. CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO CNTF

Células SH-SY5Y (originalmente obtidas do Dr, June Biedler) foram usadas como fonte de ARNm na construção de uma biblioteca

de ADNc usando o vector de expressão pCMX (descrito no pedido de Patente dos EUA N°. de Série 07/678 408, depositado em 28 de Março de 1991, ver supra), um derivado do vector pCDM8 (Seed, 1987, Nature, 329:840-842). As inserções para a biblioteca de ADNc foram seleccionadas num gel de agarose para dimensões superiores a 1 kb.

6.1.2. PROCESSO DE "SELECÇÃO IMUNOQUÍMICA"

O processo de "selecção imunoquímica", desenvolvido por Seed e Aruffo (1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:3365-3369), foi modificado como a seguir se descreve: em vez de se incubarem as células com anticorpos que reconhecem o receptor, as células foram incubadas primeiro com CNTF/myc (1 µg/ml), no gelo, durante 30 minutos, seguidamente centrifugadas em PBS/2% de Ficoll, para remover o excesso de ligando, e seguidamente incubadas com o anticorpo 9E10, obtido no Oncogene Sciences, Manhasset, N.Y.), durante, 30 minutos, no gelo. Seguiu-se nova centrifugação em PBS/2% de Ficoll e selecção imunoquímica em placas revestidas com um anticorpo monoclonal de ratinho anti-péptido myc obtido na Sigma. As placas foram preparadas como a seguir se descreve: placas bacteriológicas com 60 mm (Falcon 1007 ou equivalente), ou placas com 10 cm tais como as Fisher 8-757-12 foram revestidas com um anticorpo monoclonal de ratinho anti-myc, diluído a 10 µg/ml em 50 mM de Tris HCl, pH 9,5. Usaram-se 3 ml de anticorpo para revestir cada placa de 6 cm ou 10 ml por cada placa de 10 cm; as placas foram expostas ao anticorpo durante cerca de 1,5 horas e a seguir o anticorpo foi removido para a placa seguinte e deixou-se repousar durante 1,5 horas e, a seguir, novamente removido para uma terceira placa. As placas foram lavadas três vezes com NaCl 0,15 M (para isso é conveniente um balão de lavagem) e incubadas com 3 ml de BSA de 1 mg/ml em PBS, durante a noite. Em particular a "selecção imunoquímica" foi realizada do seguinte modo: as células foram cultivadas em placas de 100 mm. O meio foi aspirado de cada placa, adicionaram-se 2 ml de PBS/EDTA 0,5 mM/0,02% de azida e incubou-se a mistura a 37°C durante 30 minutos, com o objectivo de soltar as células da placa. As células foram trituradas vigorosamente com uma pipeta de Pasteur curta, recolhidas de cada placa para um tubo de centrífuga e centrifuga-

das durante 4 minutos a 200 x g (posição 2.5.). As células foram ressuspensas em 0,5-1,0 ml de PBS/EDTA/azida/5% de FBS e incubadas com CNTF/myc durante 30 minutos no gelo. Após a adição de igual volume de PBS/EDTA/azida, a suspensão foi cuidadosamente colocada em camadas em 3 ml de PBS/EDTA/azida/2% de Ficoll e centrifugada a 200 x g (posição 2.5.), durante 4 minutos, e o sobrenadante cuidadosamente aspirado. As células foram posteriormente incubadas com o anticorpo 9E10, durante 30 minutos, no gelo e a centrifugação em PBS/EDTA/azida/2% de Ficoll foi repetida. As células foram retomadas em 0,5 ml de PBS/EDTA/azida e alíquotas foram adicionadas a placas revestidas com anticorpo monoclonal de ratinho anti-myc, contendo 3 ml de PBS/EDTA/azida/5% de FBS. As células provenientes na máximo de 2 placas de 60 mm foram colocadas numa placa de 60 mm e deixadas a sedimentar à temperatura ambiente durante 1-3 horas. As células em excesso que não aderiram à placa foram removidas por lavagem suave com PBS/5% de soro ou com meio (2-3 lavagens de 3 ml foram usualmente suficientes).

6.1.3. IDENTIFICAÇÃO DE CLONES CONTENDO O GENE DO RECEPTOR DO FACTOR NEUROTROFICO CILIAR

O ADN plasmídico da biblioteca de expressão foi transfectado em células COSM5 (aproximadamente 200-500 ng por placa de 100 mm; foram transfectados duas placas), utilizando DEAE/cloroquina de acordo com procedimentos padrão. Dois dias após a transfecção, as células foram destacadas das respectivas placas e submetidas ao procedimento "selecção imunoquímica" de Aruffo/Seed, modificado como acima se descreveu.

Após lavagem das placas para remoção das células não aderentes, os sobrenadantes Hirt (Hirt, 1967, J. Mol. Biol. 26:365-369) foram preparados e o ADN plasmídico foi precipitado na presença de 10-20 µg de ARNt. O ADN resultante foi introduzido em bactérias DH10B (Electromax, BRL) por electroporação, de acordo com as instruções do fabricante. As culturas, obtidas a partir das bactérias electroporadas, foram usadas na preparação de ADN plasmídico para um outro ciclo de transfecção e "selecção imunoquímica"; uma placa de células COS transfectadas com ADN plasmídico revelou claramente um elevado número de células COS expressoras



do CNTFR por um ensaio indirecto de ligação a um anticorpo iodoado (ver Figura 1B para dados representativos; ver abaixo os métodos de ensaio). Após o segundo ciclo de "selecção imunológica"/isolamento de ADN plasmídico/electroporação daqueles transfectantes, os transformantes bacterianos, resultantes da electroporação, foram plaqueados em placas com ampicilina. As colónias individuais de bactérias foram recolhidas e o ADN plasmídico, preparado a partir de cada clone, foi transfectado individualmente em células COS. Dos 15 plasmídeos testados, 14 resultaram em células COS transfectadas expressoras dos locais de ligação do CNTF, detectados por uma variedade de ensaios de ligação, incluindo o ensaio indirecto de ligação a anticorpos e a selecção de células activadas por fluorescência, descritas abaixo.

6.1.4. ENSAIO DE LIGAÇÃO DIRECTA ^{125}I -HCNTF

As células COS foram transfectadas com ADN plasmídico da biblioteca, da biblioteca enriquecida ou de clones individuais. Após 48 horas, foi removido o meio e substituído por 0,25 ml do tampão de ligação (RPMI com 10% de FBS e 0,1% de azida) contendo ^{125}I -hCNTF sozinho ou com CNTF não marcado. As incubações com ^{125}I -hCNTF decorreram durante 60 minutos à temperatura ambiente. Depois das incubações estarem completas, removeu-se solução de ^{125}I -hCNTF e lavaram-se as células três vezes com 1 ml de tampão de ligação e depois foram lisadas com 0,25 ml de NaOH 0,1 N. Este lisado foi transferido para tubos de poliestireno 12x75 mm e colocado num contador gama. A ligação não específica foi determinada pela adição de hCNTF não marcado, pelo menos num excesso de 100 vezes. Após a última lavagem as placas foram autorradiografadas.

6.1.5. SELECÇÃO DE CÉLULAS ACTIVADAS POR FLUORESCÊNCIA

As células COS transfectadas foram incubadas sequencialmente com CNTF/myc, anticorpo 9E10 e anticorpo de cabra, anti-ratinho, marcado com FITC. A seguir, as células foram destacadas das placas e sujeitas a análise por FACS. Os resultados das transfecções com plasmídeos positivos e negativos estão descritos na Figura 1D; as células COS transfectadas com o plasmídeo expressor do receptor do CNTF contêm uma grande subpopulação que apresenta, por



este ensaio, intensa fluorescência.

6.1.6. IODAÇÃO DO hCNTF

Iodaram-se 10 μg de hCNTF (560 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em NaPO_4 10 mM, pH 7,4) com 1 mCi ^{125}I Na utilizando lactoperoxidase 6 ng/ μl (Sigma) durante 15 minutos a 20°C. Após 15 minutos a reacção foi terminada com igual volume de tampão contendo NaI 0,1 M, 0,1% de BSA e 0,1% de citocromo C, 0,3% de HOAc, 0,05% de vermelho de fenol e 0,02% de NaN_3 . Foram recolhidas alíquotas para a determinação da contagem dos precipitados de TCA. O restante foi aplicado a uma coluna de BioRad PD-10 biogel, equilibrada com NaPO_4 0,05 M. NaCl 0,1 M, 0,5 mg/ml de sulfato de protamina e 1 mg/ml de BSA. Foram recolhidas fracções e efectuadas as contagens dos precipitados de TCA.

6.1.7. SEQUENCIAÇÃO DO CNTFR

A sequenciação foi efectuada utilizando um conjunto (U.S. Biochemical) de didesoxi ADN de dupla cadeia usando Sequenase[®], de acordo com as instruções do fabricante.

6.1.8. ENSAIO DE LIGAÇÃO INDIRECTA COM ^{125}I -ANTICORPO DE CABRA ANTI-RATINHO

As células COS foram transfectadas com ADN plasmídico da biblioteca, da biblioteca enriquecida ou de clones individuais. Após 48, as células foram incubadas sequencialmente durante 30 minutos, no gelo, com PBS (com Ca, Mg) 5% de FBS contendo:

- 1) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de CNTF-myc
- 2) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de 9E10;
- 3) ^{125}I -anticorpo de cabra, anti-ratinho (GAM) (0,5-1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$).

As células foram lavadas 3x5 minutos em PBS/5% de FBS, após cada passo. Após a última lavagem, as placas foram autorradiografadas. Para clones individuais, uma estimativa quantitativa da quantidade total de radioactividade ligada foi determinada por um contador gama portátil.



6.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1. ANÁLISE DE RESTRIÇÃO

Da análise de restrição verifica-se que os 14 clones positivos podem ser incluídos em quatro classes:

- a) 12-17 (2 kb)
 - b) I1=I5=I6 (2 kb)
 - c) I4=I8=I9=I11=I15 (4 kb)
 - d) I10=I12=I13 (1,6 kb)
- (I3 foi negativo)

Os membros de cada classe produzem um padrão idêntico de bandas por digestão com o enzima PstI. Análises de restrição posteriores revelaram que as quatro classes de clones se sobrepõem e os dados da sequência, preliminares, confirmam que eles partilham sequências sobrepostas nas suas extremidades 5'. Curiosamente, a classe b) mostrou possuir a sua inserção na orientação errada no vector em relação ao elemento promotor eucariótico. Tal como pode ser visto na Tabela I, estes clones são baixos expressores relativamente aos outros clones. A transcrição nestes clones, pode resultar de um fraco promotor críptico na região a jusante do poli-ligador do vector.

6.2.2. TRANSCRIÇÃO E TRADUÇÃO IN VITRO

Para caracterizar as proteínas codificadas pelas quatro classes de clones, estes foram todos transcritos a partir de um promotor T7 na região 5' do poli-ligador do vector. Após a tradução in vitro os produtos foram analisados por electroforese em gel de poliacrilamida. A classe a) não produziu proteína, uma vez que está na orientação errada relativamente ao promotor T7. As outras três classes produziram proteínas de tamanhos idênticos (aproximadamente 42 kd), o que significa que codificaram a mesma proteína.



TABELA I
Quantificação da ligação ^{125}I -Gam em clones CNTFR

Clone	CPM ligado
I1	2000
I2	8500
I3	600
I4	9000
I5	2000
I6	1600
I7	6000
I8	7500
I9	7000
I10	4500
I11	7000
I12	5000
I13	8000
I14	10000
I15	8000
Controlo negativo	500
Fundo	250

6.2.3. ANÁLISE DA LIGAÇÃO COM CNTF

Os resultados do ensaio de ligação indirecta CNTF-myc utilizando o anticorpo anti-myc 9E10 e o ^{125}I -anticorpo de cabra anti-ratinho, encontram-se na Figura 1B e 1C bem como na Tabela I. Na Figura 1B, a placa da esquerda resulta da transfecção da biblioteca não enriquecida, enquanto que a placa da direita, resulta da transfecção da biblioteca enriquecida que contém ADN plasmídico, recuperado após um ciclo de "selecção imunoquímica" (utilizando aproximadamente a mesma quantidade de ADN como para a biblioteca não enriquecida). É de notar o elevado número de manchas escuras observadas apenas na placa da direita, cada uma representando uma única célula COS expressora do local de ligação do CNTF-myc, detectada por autorradiografia.

Para os clones individuais positivos, discutidos na Secção 6.2.1., uma estimativa quantitativa da radioactividade total foi determinada por um contador gama portátil. Os resultados deste ensaio, para os clones individuais I1-I15 encontram-se na Tabela I e demonstram que 14 dos 15 clones expressam locais de ligação do CNTF, como foi determinado pelo ensaio de ligação indirecta de anticorpo. Adicionalmente, fragmentos das placas de alguns clones individuais foram, autorradiografados, como se refere na Figura 1C.

A segunda prova de ligação indirecta utilizou CNTF-myc seguida pelo anticorpo 9E10, anticorpo de cabra, anti-ratinho, marcado com FITC e análise por FACS, como referido na Figura 1D. Células COS transfectadas com clones positivos, mostraram um aumento de 100 vezes na expressão do CNTFR, quando comparada com células transfectadas com clones negativos.

Os dados de ligação indirecta, obtidos utilizando CNTF-myc foram verificados utilizando a ligação directa com ^{125}I -CNTF, como descrito na Tabela II. O receptor expresso nas células COS transfectadas liga-se especificamente ao CNTF iodado bem como ao ligando CNTF-myc, tal como acontecia com as células SH-SY5Y, a partir das quais o CNTFR foi clonado. Cada célula COS transfectada expressa cerca de 30 vezes mais receptor por célula do que as células SH-SY5Y.

TABELA II
Análise de ligação com CNTF iodado

Conc. de ^{125}I -CNTF	<u>COS I2</u>		<u>SH-SY5Y</u>	
	cpm ligado específico	cpm/célula*	cpm ligado específico	cpm/célula
2,16 nM	1412	$2,17 \times 10^{-2}$	1284	$4,28 \times 10^{-3}$

Os ensaios de ligação em monocamada foram realizados em placas de cultura de 24 alvéolos usando 3×10^5 células

SH-SY5Y/alvéolo ou $6,5 \times 10^4$ células COS/alvéolo. O valor específico de cpm ligado foi calculado subtraindo o valor de cpm ligado na presença de CNTF não marcado, em excesso de 1000 vezes ao valor do cpm ligado apenas na presença de ^{125}I -CNTF na concentração indicada. Não se detectou ligação específica nas células COS não transfectadas.

* As células COS foram ensaiadas 48 horas após a transfecção por DEAE Dextrano no qual, tipicamente apenas 20-40% das células são transfectadas. Assumindo existirem 20% de células COS transfectadas, o valor específico de cpm ligado indica que cada célula COS transfectada expressa 30 vezes mais receptores por célula do que as células SH-SY5Y.

6.2.4. SEQUÊNCIAS DO CNTFR E HOMOLOGIA COM OUTROS RECEPTORES DE FACTORES DE CRESCIMENTO

O CNTFR contém motivos que são partilhados com uma variedade de outros receptores. A porção extracelular do CNTFR possui um domínio "imunoglobulina" na sua extremidade N e um domínio "receptor de citocina", o qual se encontra separado do domínio "imunoglobulina" por uma curta região de charneira. Embora muitos receptores apresentem homologia com os domínios "imunoglobulina" e "receptor de citocina" (Figura 3) apenas um receptor - o receptor da IL-6 - partilha a mesma disposição particular desses domínios com o CNTFR (Figuras 3 e 4). O receptor da IL-6 é, assim, a proteína mais semelhante ao CNTFR (Figura 4). Curiosamente, o receptor da IL-6 assemelha-se também ao CNTFR no facto de possuir um domínio intracitoplasmático muito curto o qual não é, aparentemente necessário para a iniciação das respostas, após a ligação da IL-6 (Hibi et al., 1990, Cell 63:1149-1157). Recentemente, um novo transductor de sinal para o receptor da IL-6, denominado gp130, foi clonado molecularmente. Este transductor não se liga ao receptor da IL-6, mas confere alta afinidade de ligação ao receptor da IL-6 e é necessário para a transdução do sinal da IL-6 (Hibi et al., 1990, Cell 63:1149-1157). A nossa clonagem do CNTFR revela que ele partilha características importantes com o receptor da IL-6, que não se encontram noutros receptores conhecidos, o que permite definir uma nova família de

receptores. Estas semelhanças entre o CNTFR e a IL-6R sugerem que o CNTFR deverá utilizar o mesmo transductor de sinal, ou uma molécula semelhante, que o receptor da IL-6. Finalmente, a identificação de receptores relacionados com o CNTFR poderá contribuir para a identificação de novos ligandos destes receptores.

7. EXEMPLO: LOCALIZAÇÃO TISSULAR DA MENSAGEM PARA O CNTFR

7.1. MATERIAIS E PROCESSOS

7.1.1. PREPARAÇÃO DA SONDA DO CNTFR

A clonagem molecular da região codificadora para o hCNTFR, no vector de expressão pCMX, encontra-se descrita no Pedido de Patente dos EUA intitulado "Mammalian Expression Vector", depositado conjuntamente com o presente pedido, e o vector de expressão resultante encontra-se representado na Figura 6. A sonda de PCR, que se estende da base 889 à base 1230 das sequências do CNTFR, foi sintetizada e utilizada como sonda para análise por transferência Northern.

7.1.2. PREPARAÇÃO DE ARN E TRANSFERÊNCIAS NORTHERN

Tecidos seleccionados foram dissecados a partir de ratasanas Sprague-Dawley e foram imediatamente congelados em azoto líquido. Os ARN foram isolados por homogeneização dos tecidos em LiCl 3 M e ureia 6 M, tal como é descrito em Bothwell et al. (1990, Methods of Cloning and Analysis of Eucaryotic Genes, Boston, MS, Jones e Bartlett). Os ARN (10 µg) foram fraccionados por electroforese, em geles de 1% agarose-formaldeído, em quadruplicado (Bothwell et al., 1990, Methods of Cloning and Analysis of Eucaryotic Genes, Boston, NS, Jones e Bartlett), seguida de transferência por capilaridade para membranas de nylon (MagnaGraph, Micron Separations Inc.) com 10xSSC (pH 7). Os ARN foram reticulados por UV às membranas por exposição a luz ultravioleta (Stratalinker, Stratagen, Inc.) e hibridados a 68°C com sondas radiomarcadas, na presença de Na₃PO₄ 0,5 M (pH 7), 1% de albumina de soro bovino (fracção V, Sigma, Inc.), 7% de SDS, EDTA 1 mM (Mahmoudi et al., 1989, Biotechniques 7:331-333), 100 µg/ml de ADN de esperma de salmão sonificado e desnaturado. Os filtros foram lavados a 68°C com 3xSSC, 0,1% de SDS e submetidos a autorradiografia, durante 1 dia a 2

semanas, com 1 ou 2 ecrans de intensificação (Cronex, DuPont) e filme de raios-X (SAR-5, Kodak) a 70°C. A coloração dos geles com brometo de etídio mostrou que foram ensaiados níveis equivalentes de ARN total nas diferentes amostras (como em Maissonpierre et al., 1990, Science, 247:1446-1451).

7.2. RESULTADOS

Tal como é mostrado na Figura 5, o ARNm do CNTFR era detectável nos tecidos do sistema nervoso central, apresentando baixos níveis no nervo ciático, células adrenais e no músculo. Isto poderá indicar que o CNTFR possui não só actividade neurotrófica mas também actividade miotrófica e pode explicar o envolvimento do sistema nervoso central e muscular em certas desordens, tal como a distrofia muscular de Duchennes e distrofia miotónica congénita, nas quais os pacientes podem sofrer de atraso mental. A expressão do CNTFR no músculo sugere que o CNTF pode ter um papel na fisiologia muscular. Assim adicionalmente à acção nos neurónios, o CNTF pode ter uma acção importante no músculo, funcionando como um agente miotrófico ou tendo um efeito no desenvolvimento e/ou diferenciação muscular.

8. EXEMPLO: EVIDÊNCIA DE QUE O RECEPTOR DO CNTF ESTÁ LIGADO À SUPERFÍCIE CELULAR POR UMA LIGAÇÃO GLICOSIL-FOSFATIDILINOSITOL (GFI)

8.1. MATERIAIS E PROCESSOS

As células SH-SY5Y foram cultivadas em placas de 24 alvéolos (Falcon), em meio RPMI, suplementado com 10% de soro bovino fetal, inactivado. Para experiências, nas quais o tratamento com fosfolipase (e o controlo) foram efectuados antes da ligação ao CNTF, o meio foi aspirado, as células foram lavadas duas vezes com PBS (+Ca/Mg) e depois incubadas com PBS (+Ca/Mg) suplementado ou não com fosfatidilinositol-fosfolipase específica (PI-PLC) para uma concentração final de 500 mU/ml (adquirida à Boehringer Mannheim, catálogo # 1143-069), durante 45 minutos a 37°C. As células foram então lavadas três vezes com tampão de ligação (PBS (+Ca/Mg) e 5% de soro bovino fetal) e depois incubadas com 250 µl de tampão de ligação contendo CNTF iodado (aproximadamente 100 pM) com ou sem um excesso de mil vezes de CNTF não marcado, du-

rante 30 minutos à temperatura ambiente. Para experiências, nas quais o CNTF iodado foi ligado previamente ao tratamento com o PI-PLC, as células foram primeiro incubadas com o tampão de ligação contendo o CNTF iodado com ou sem o excesso de CNTF não marcado, a 37°C durante 45 minutos. As células foram então lavadas duas vezes com PBS (+Ca/Mg) e depois incubadas, durante 45 minutos, com PBS (+Ca/Mg) suplementado com ou sem PI-PCL (concentração final de 500 mU/ml). As células foram depois lavadas três vezes com o tampão de ligação. Em todos os casos, as células foram ressuspensas em 0,1 N de NaOH e depois contadas.

8.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sequência do receptor do CNTF revelou que a proteína codificada termina numa região hidrófoba que se seguia a domínios extra-citoplasmáticos, sem qualquer aparente sequência de paragem de transferência ou domínio intra-citoplasmático. Esta estrutura parece remanescente das extremidades C encontradas nas proteínas membranares, que não possuem regiões transmembranares e encontram-se ligadas à superfície celular por ligações GFI (Ferguson e Williams, 1988). Assim, foram efectuadas experiências para testar se o receptor do CNTF estava ou não ligado à superfície celular através de uma ligação GFI. Tal como é mostrado na Tabela III, o tratamento de células SH-SY5Y com PI-PLC, eliminou completamente a capacidade das células SH-SY5Y se ligarem subsequentemente ao CNTF, o que é consistente com a noção de que o receptor do CNTF está ligado à superfície celular através de uma ligação GFI. No entanto, o CNTF já ligado às células SH-SY5S não pode ser libertado através do tratamento com PI-PLC (Tabela III). Curiosamente, uma forma solúvel do receptor de IL-6 pode estar estreitamente associada a uma segunda proteína de membrana (GP130), requerida para a transdução do sinal de IL-6. Deste modo, a prevenção da libertação do receptor de CNTF, antes da ligação ao CNTF, pode ser devida a uma associação entre o CNTF, o seu receptor e o transdutor do sinal (GP130 ou um análogo de GP130). Alternativamente, a ligação ao CNTF pode alterar a estrutura do receptor do CNTF, tornando-o menos susceptível ao PI-PLC (várias proteínas ligadas por GFI possuem formas resistentes ao PI-PLC).



A verificação de que o receptor do CNTF se encontra ligado à superfície celular através de uma ligação GFI possui importantes ramificações. Representa o primeiro receptor de factor de crescimento conhecido ligado à membrana desta maneira, aumentando a possibilidade de receptores adicionais poderem ser ligados por GFI. Como várias proteínas possuem formas ligadas por GFI e formas que contêm os domínios transmembranares convencionais, as nossas verificações apontam para a possibilidade do receptor de CNTF possuir uma extremidade C alternativa que poderá codificar uma região transmembranar e, similarmente, que o receptor de IL-6 possui uma forma ligada por GFI. As formas de receptores de factor de crescimento ligadas por GFI, podem ser capazes de utilizar novos mecanismos de regulação e libertação do receptor. Por exemplo, a regulação no sentido da diminuição dos receptores de superfície pode ocorrer rapidamente, por libertação dos receptores ligados por GFI, através da activação das actividades da fosfolipase extra-citoplasmática. Estes receptores libertos podem também actuar noutras células, tanto sozinhos como ligados ao CNTF, da mesma maneira que o receptor de IL-6 solúvel se liga ao IL-6 e activam as células que expressam o GP130.

A possibilidade de que a libertação dos receptores de CNTF, utilizando o PI-PLC, possa bloquear a acção do CNTF pode ter implicações importantes. Pode ser utilizada para verificar se os feitos observados do CNTF são devidos ao receptor do CNTF clonado. Terapeuticamente, o PI-PLC pode ser utilizado para libertar os receptores do CNTF e possivelmente bloquear a acção do CNTF, nos casos em que se pensa que a actividade do CNTF seja prejudicial.

Se a libertação do receptor do CNTF bloqueável com PI-PLC, for devida à formação de um complexo terciário entre o CNTF, o seu receptor e a potencial proteína do transdutor do sinal, então esta característica do receptor pode ser utilizada para definir e clonar molecularmente a molécula transdutora.



TABELA III

Análise do tratamento com PI-PLC na ligação do
CNTF às células SH-SY5S

	CPM ligado	
	<u>Sem frio</u> <u>em excesso</u>	<u>Com frio</u> <u>em excesso</u>
<u>Pré-tratamento com PI-PLC</u>		
Sem PI-PLC	1440	370
Com PI-PLC	420	310
<u>Ligação ao CNTF antes de PI-PLC</u>		
Sem PI-PLC	1250	310
Com PI-PLC	1060	300

9. OS EFEITOS IN VIVO DO CNTF NO MÚSCULO

ESTRIADO DESNERVADO DA RATAZANA

O objectivo das experiências aqui descritas foi examinar os efeitos do CNTF recombinante, purificado, no músculo estriado desnervado in vivo e determinar se o CNTF pode evitar algumas alterações fenotípicas associadas à atrofia desnervativa, tal como a perda de peso muscular e do conteúdo de proteína miofibrilar. Verificámos que o receptor do CNTF é expresso no músculo estriado, tanto nos miotúbulos como nos mioblastos, e que o CNTF evita a perda do peso molecular e do conteúdo de proteína miofibrilar, associada com a atrofia desnervativa.

9.1. O RECEPTOR DO CNTF É EXPRESSO NO MÚSCULO

ESTRIADO TANTO NOS MIOTÚBULOS COMO NOS MIOBLASTOS

A análise por transferência Northern foi efectuada em amostras de ARN, derivadas de uma variedade de tecidos de ratazana, de modo a identificar os alvos celulares primários do CNTF, tal como mostra a Figura 5. Uma sonda derivada da região codificadora do receptor do CNTF humano, identificou um transcrito de 2 kb cuja expressão estava geralmente restringida ao sistema nervoso central, excepto no músculo estriado, onde os níveis encontrados eram surpreendentemente elevados, e na glândula adrenal e nervo



ciático, onde os níveis encontrados eram baixos.

Uma análise mais detalhada da expressão do receptor do CNTF, especificamente no músculo estriado, foi efectuada, como descrito acima, por transferência Northern, utilizando ARNm preparado a partir de tipos específicos de músculo de ratazana, de miotúbulos purificados de músculo humano e de várias linhas celulares de músculo estriado originado a partir de ratinho e ratazana (Figura 7). Utilizando uma sonda humana para o receptor do CNTF, foram detectadas duas espécies de ARNm (2,0 e 1,7 kb) em várias amostras de ARN muscular. A Figura 7 mostra que o receptor do CNTF é expresso nas linhas celulares do miotúbulo e do mioblasto do músculo, do ratinho (faixas 1 e 2) e da ratazana (faixas 3 e 4), bem como nas fibras musculares vermelhas do músculo solhar e fibras musculares brancas do músculo EDL (faixas 5 e 6, respectivamente). Parece que o nível de ARNm do receptor do CNTF aumentou no músculo solhar (faixa 12) e no músculo EDL (faixa 14), que foram primeiro desnervados durante 72 horas relativamente aos seus controlos contralaterais submetidos à operação de controlo (faixas 11 e 13, respectivamente). Curiosamente, os níveis mais elevados de expressão foram observados em amostras de ARN de miotúbulos derivados de músculo estriado humano, fetal. Estes miotúbulos foram cultivados e depois purificados dos fibroblastos e de outras células não musculares, por selecção de células activadas por fluorescência, antes do isolamento de ARN (faixa 8). Saliente-se que foram identificadas por transferência Northern de células de músculo, duas espécies distintas de ARNm do receptor do CNTF, e que a mensagem de 1,7kb do receptor do CNTF era preferencialmente expressa na linha celular de mioblasto C2C12 mb (faixa 1) e pode representar uma forma alternativa com junção ("spliced") do receptor.

9.2. O CNTF EVITA A PERDA DO PESO MUSCULAR E DO CONTEÚDO PROTEICO MIOFIBRILAR ASSOCIADOS COM A ATROFIA DESNERVATIVA

9.2.1. CIRÚRGIA DE DESNERVAÇÃO

Os vários grupos de animais utilizados para estes estudos encontram-se descritos na Tabela IV. Geralmente, um único grupo compreende três animais. Para todos os grupos experimentais, foi



feita uma incisão inicial de aproximadamente 20 cm, na pele do membro posterior direito e a meio da coxa. Após esta operação cirúrgica, o corte de 20 cm foi também efectuado no membro posterior esquerdo e a meio da coxa, de modo a ser efectuada a operação de controlo.

Nos grupos de animais 2-6, o músculo solhar do membro posterior direito foi desnervado por remoção cirúrgica de um segmento do nervo ciático direito de 2-5 mm, ao nível do meio da coxa, deixando um coto de nervo distal de 32 a 35 mm (marcado como A na Figura 8). O músculo solhar esquerdo serviu como controlo na operação de controlo, na qual o nervo ciático deste músculo foi deslocado cuidadosamente 32 a 35 mm do seu ponto de inervação no músculo solhar. Todas as intervenções cirúrgicas foram efectuadas enquanto os animais estavam sob anestesia suave por cloro-pentobarbital (0,3 g/kg). Os animais do grupo 1 (controlos) não foram sujeitos a qualquer desnervação nem foram injectados. Todos os animais pesavam entre 100 e 150 gramas.

9.2.2. TRATAMENTOS

Os animais dos grupos 1 e 2 não foram tratados. Os animais do grupo 3 foram injectados diariamente, durante um total de 4 dias, intramuscularmente (IM) com solução salina tamponada por fosfato (PBS) contendo 1 mg/ml de BSA (PBS/BSA). As injeções múltiplas foram efectuadas nos músculos a meio da coxa, em ambos os lados do animal. Os animais do grupo 4 foram injectados IM, diariamente, durante quatro dias com CNTF recombinante de ratazana (1 mg/kg), contendo 1 mg/ml de BSA (CNTF/BSA). As injeções múltiplas foram efectuadas em ambos os lados do animal, como descrito acima. Os animais do grupo 5 foram também injectados diariamente com rCNTF/BSA, mas subcutaneamente (SC), em vez de IM. Os animais do grupo 6 foram injectados diariamente (SC) com PBS/BSA.

TABELA IV

<u>Grupo</u>	<u>#</u> <u>Animais</u>	<u>Protocolo</u> <u>cirúrgico</u>	<u>Tempo de</u> <u>desner-</u> <u>vação</u>	<u>Tratamento</u>
1	3	Nenhum	96 horas	Nenhum
2	3	R-Den/L-Sham	96 horas	Nenhum
3	3	R-Den/L-Sham	96 horas	PBS/BSA (1 mg/ml)
4	3	R-Den/L-Sham	96 horas	CNTF/BSA (1 mg/kg) (IM)
5	3	R-Den/L-Sham	96 horas	CNTF/BSA (1 mg/kg) (SC)
6	3	R-Den/L-Sham	96 horas	PBS/BSA (SC)

R-Den = membro posterior direito desnervado; L-Sham = membro posterior esquerdo sujeito à operação de controlo.

9.2.3. ANÁLISE DO PESO MUSCULAR E DA PROTEÍNA

Sacrificaram-se animais por decapitação, 96 horas após a cirurgia de desnervação ter sido efectuada e os músculos solhares foram cuidadosamente excisados, de tendão a tendão. Os músculos solhares foram colocados num recipiente de pesagem em gelo, os tendões foram removidos com um bisturi e os músculos foram então imediatamente pesados de modo a evitar qualquer desidratação. Para preparar os homogeneizados de proteína miofibrilar, os músculos solhares excisados foram juntos, picados enquanto estavam no gelo numa sala arrefecida e depois homogeneizados em PBS contendo sacarose 0,32 M e $MgCl_2$ 3 mM (2,5% p/v). O homogeneizado foi centrifugado a aproximadamente 800xg e os sobrenadantes foram ensaiados, de modo a determinar a proteína total miofibrilar por músculo, utilizando o procedimento da ligação de corante da Bio-Rad de acordo com as recomendações do fabricante.

A Figura 9 mostra que o músculo solhar desnervado diminui significativamente ($p < 0,01$), em peso em húmido, aproximadamente 25% às 96 horas. As injeções diárias de PBS/BSA não tiveram efeito nesta perda de peso de músculo, dependente da desnervação. Contudo, músculos solhares desnervados de ratazanas injectadas

diariamente com CNTFR (1 mg/kg)/BSA pesavam aproximadamente menos 5% do que os seus controlos contralaterais, sujeitos à operação de controlo. Os pesos em húmido dos músculos solhares desnervados tratados com CNTF e dos sujeitos à operação de controlo, não diferem significativamente dos controlos não operados. O CNTF quando injectado SC diariamente, durante 4 dias (grupo 5), também parece evitar significativamente a perda de proteína miofibrilar induzida pela desnervação e a perda de proteína era semelhante ao decréscimo do peso em húmido do músculo (Tabela V).

TABELA V
Efeito do CNTF no conteúdo proteico do
músculo solhar desnervado

<u>Amostra do músculo</u>	<u>Proteína total</u>	
	<u>miofibrilar</u> <u>(mg/músculo)</u>	<u>% de</u> <u>controlo</u>
Grupo 1 - sem desnervação	7,5	
Grupo 2 - den. - sem injeção	5,8	80
- controlo - sem injeção	7,2	
Grupo 3 - den + PBS (IM)	5,2	75
- controlo + PBS (IM)	6,9	
Grupo 4 - den + CNTF (IM)	6,5	83
- controlo + CNTF (IM)	7,8	
Grupo 5 - den + CNTF (SC)	6,6	93
- controlo + CNTF (SC)	7,1	
Grupo 6 - den + PBS (SC)	5,3	67
- controlo + PBS (SC)	7,9	

(IM) = injeção intramuscular; (SC) = injeção subcutânea;
os dados representam o conteúdo proteico total da mistura de três
músculos solhares juntos

Quando injectados IM diariamente, observou-se um efeito menos pronunciado do CNTF na proteína total miofibrilar.

Verificámos que o CNTFR é expresso no músculo estriado, quer nos miotúbulos quer nos mioblastos, e que o CNTF evita tanto a perda de peso muscular como do conteúdo proteico associados à atrofia desnervativa.

10. DEPÓSITO DO MICRORGANISMO

O depósito seguinte foi feito a 26 de Março de 1991 na Agricultural Research Culture Collection (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Illinois, 61604:

E. coli portadora do plasmídeo pCMX-hCNTFR (I2), um plasmídeo de expressão constituído por sequências codificadoras do hCNTFR, sendo NRRL B-18789 o número de acesso atribuído.

Várias referências foram aqui citadas, cujas descrições foram aqui incorporadas para referência.

O presente invento não deve ser limitado no seu âmbito pelas construções depositadas ou pelas concretizações descritas nos exemplos que se pretende que ilustrem apenas alguns aspectos do invento e quaisquer concretizações que são funcionalmente equivalentes e estão no âmbito do presente invento. De facto, várias modificações adicionais do invento para além daquelas aqui mostradas e descritas tornar-se-ão evidentes para os peritos na arte e pretende-se que estejam incluídas no âmbito das reivindicações em apêndice.



R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1 - Processo para a identificação de uma célula que se liga a CNTF, caracterizado por compreender detectar a expressão do receptor de CNTF pela célula.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender ainda a detecção da presença de ARN codificando o receptor de CNTF, por hidridação de uma amostra da célula que se suspeita que contenha ARN codificando o receptor de CNTF, com uma sonda de ácido nucleico, compreendendo a sonda pelo menos uma porção de seis nucleótidos.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender ainda a detecção da presença de proteína de receptor de CNTF por (i) exposição da célula a um anticorpo anti-receptor de CNTF, sob condições que permitam a ocorrência da ligação imuno específica e (ii) detecção da ligação do anticorpo à célula.

4 - Processo para o diagnóstico de uma desordem relacionada com CNTF, caracterizado por compreender detectar a diferença entre a quantidade de receptor em células ou tecido provenientes de um paciente e a quantidade de receptor de CNTF em células ou tecidos comparáveis de uma pessoa saudável.

5 - Processo para o diagnóstico de uma desordem relacionada com CNTF, caracterizado por compreender detectar a diferença entre a quantidade de receptor de CNTF ou de um seu fragmento no fluido proveniente de um paciente e a quantidade de receptor de CNTF ou de um seu fragmento no fluido comparável de uma pessoa saudável.

6 - Processo para o diagnóstico de uma desordem relacionada com CNTF, caracterizado por compreender detectar a diferença entre a quantidade de ARN de receptor de CNTF numa amostra do paciente e a quantidade de ARN de receptor de CNTF numa amostra comparável de uma pessoa saudável.

7 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a quantidade de ARN receptor de CNTF ser medida por hibridação de uma amostra contendo ácido nucleico com uma sonda de ácido nucleico que compreende pelo menos uma porção de seis nucleótidos.

8 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a quantidade de receptor de CNTF ou do seu fragmento ser medida por (i) exposição das células ou do tecido a um anticorpo anti-receptor de CNTF sob condições que permitam que ocorra a ligação imuno específica ao receptor de CNTF e (ii) medição da quantidade de ligação do anticorpo.

9 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a quantidade de receptor de CNTF ser medida por (i) exposição das células ou do tecido a CNTF marcado sob condições que permitam que ocorra a ligação ao receptor de CNTF e (ii) medição da quantidade de CNTF marcado.

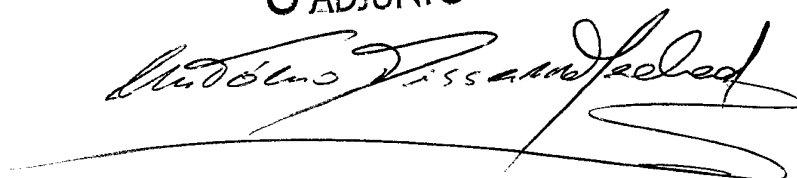
10 - Processo para identificação de moléculas relacionadas com o receptor de CNTF, as quais são membros da família de moléculas que inclui o receptor de IL-6, caracterizado por compreender:

- (i) analisar uma biblioteca de ADN relativamente aos clones que se hibridam com porções de ácido nucleico codificando receptor de CNTF;
- (ii) isolar e propagar clones que se hibridam ao ácido nucleico codificando receptor de CNTF;
- (iii) determinar a sequência de ácido nucleico dos clones isolados e propagados no passo (ii); e
- (iv) comparar as sequências de ácido nucleico determinadas no passo (iii) com as sequências de ácido nucleico de membros da família conhecidos.

Lisboa, 31. MAI 1991

Por REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

=O AGENTE OFICIAL=
O ADJUNTO



PREPARAÇÃO DA BIBLIOTECA DE
ADNc EM CÉLULAS SY5Y

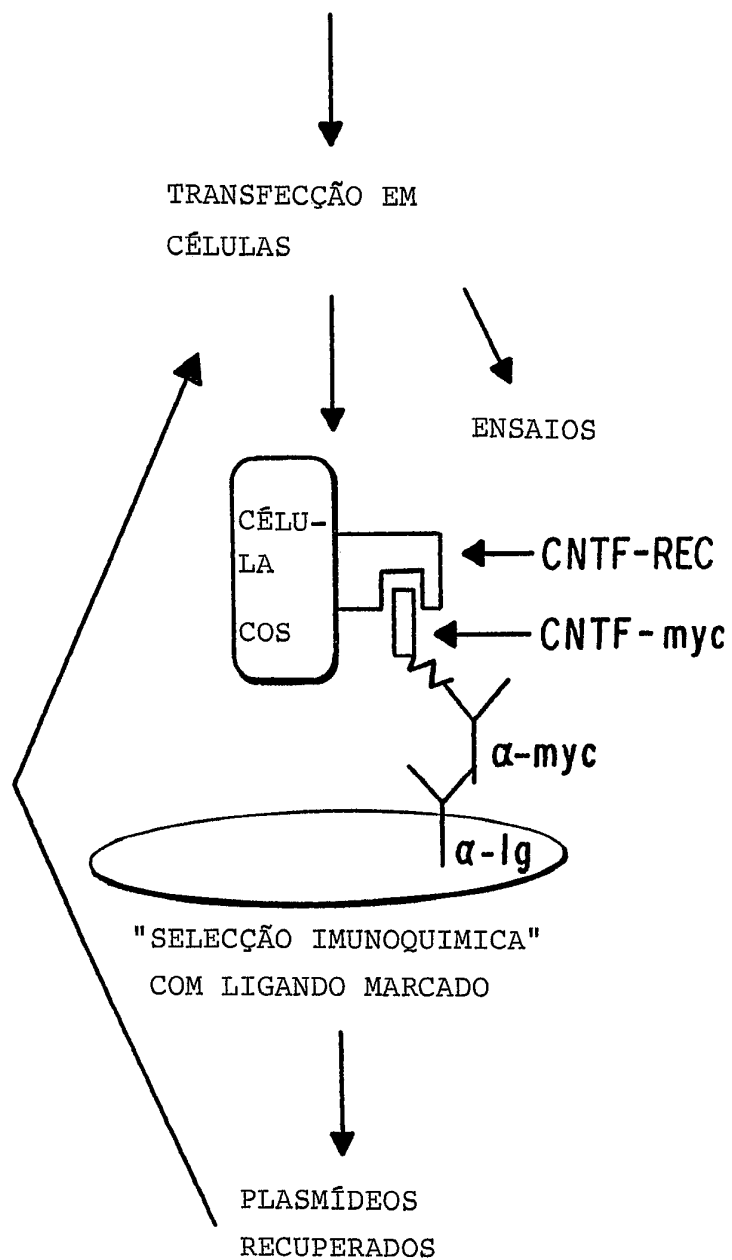
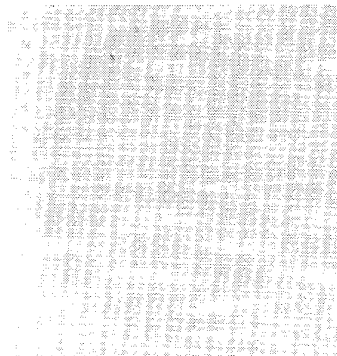
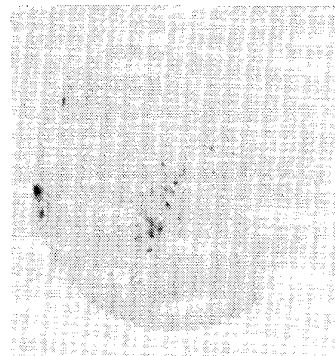


FIG. 1A



ANTES DA "SELECÇÃO
IMUNOQUIMICA"

FIG.1B (i)



APÓS "SELECÇÃO
IMUNOQUIMICA" COM LIGANDO
MARCADO

FIG.1B (ii)



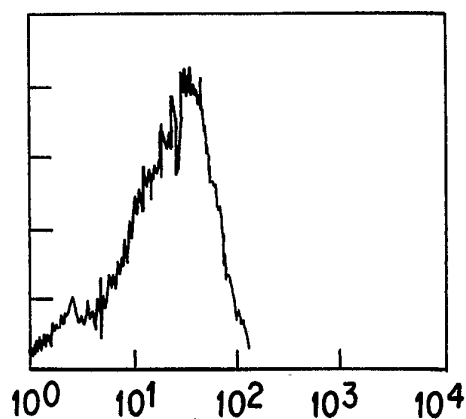
CLONE
NEGATIVO

FIG.1C (i)



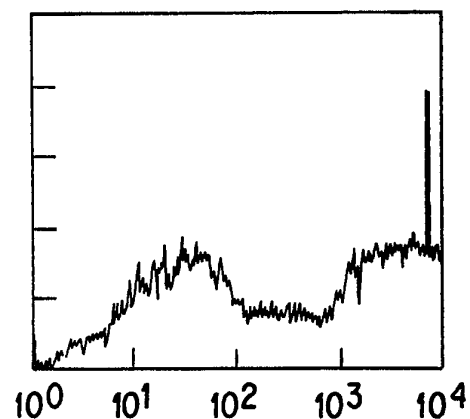
CLONE
POSITIVO

FIG.1C (ii)



CLONE NEGATIVO

FIG.1D(i)



CLONE POSITIVO

FIG.1D(ii)

10 CCTCGAGATC CATTGTGCTC AAAGGGGGC GGCAGGGAG GCGGCGGCTC CAGCCGGCGC GCGGCGAGGC TCGGCGGTGG 80
 GGAGCTCTAG GTAAACACGAG TTTCCGGCGG CCGTGGCCTC CGCGGCGGAG GTGCGCCGCG CCGCGCTCCG AGCCGCCACC
 90 100 110 120 130 140 150
 GATCCGGCGG GCGGTGCTAG CTCCGGGCTC CCTGGCTGCG TCGCTGCCGG GGGCGGTGCG AAGGCGCGGC
 CTAGGCCGCC CGCCACGATC GAGGCGGAG GGCAGGAGC AGCGACGGCC CCCGCCAGCC TTCGCGCGCG

160 170 180 190 200 210 220 230
 GCGAAGCCCG GGTGGCCCGA GGGCGGACT CTAGCCTTGT CACCTCATCT TGCCCCCTTG GTTTTGGAAG TCCTGAAGAG
 CGCTTCGGGC CCACCGGCT CCGCGGCTGA GATCGGAACA GTGGAGTAGA ACGGGGGAAC CAAAACCTTC AGGACTTCTC
 240 250 260 270 280 290 300
 TTGGTCTGGA GGAGGAGGAG GACATTGATC TGCTTGGTGT GTGGCCAGTG GTGAAGAG ATG GCT GCT CCT GTC
 AACGAGCCT CCTCCTCCTC CTGTAACCTAC ACGAACCACA CACCGGTAC CACTTCTC TAC CGA CGA GGA CAG
 Met Ala Ala Pro Val>

310 320 330 340 350 360
 CCG TGG GCC TCG TGT GCT GTG CTT GCC GCC GCC GCA GTT GTC TAC GCC CAG AGA CAC AGT CCA
 GGC ACC CGG ACG ACA CGA CAC GAA CCG CGG CGG CGT CAA CAG ATG CGG GTC TCT GTG TCA GGT
 Pro Trp Ala Cys Cys Ala Val Leu Ala Ala Ala Val Val Tyr Ala Gln Arg His Ser Pro
 370 380 390 400 410 420 430
 CAG GAG GCA CCC CAT GTG CAG TAC GAG CGC CTG GGC TCT GAC GTG ACA CTG CCA TGT GGG ACA
 GTC CTC CGT GGG GTA CAC GTC ATG CTC GCG GAC CCG AGA CTG CAC TGT GAC GGT ACA CCC TGT
 Gln Ala Pro His Val Gln Tyr Glu Arg Leu Gly Ser Asp Val Thr Leu Pro Cys Gly Thr>

440 450 460 470 480 490
 GCA AAC TGG GAT GCT GCG GTG ACG TGG CGG GTA AAT GGG ACA GAC CTG GCC CCT GAC CTG CTC AAC
 CGT TTG ACC CTA CGA CGC CAC TGC ACC GCC CAT TTA CCC TGT CTG GAC CGG GGA CTG GAC GAG TTG
 Ala Asn Trp Asp Ala Ala Val Thr Trp Arg Val Asn Gly Thr Asp Leu Ala Pro Asp Leu Leu Asn
 500 510 520 530 540 550 560
 GGC TCT CAG CTG GTG CTC CAT GGC CTG GAA CTG GGC CAC AGT GGC CTC TAC GCC TGC TTC CAC
 CCG AGA GTC GAC CAC GAG GTA CCG GAC CTT GAC CCG GTG TCA CCG GAG ATG CCG ACG AAG GTG
 Gly Ser Gln Leu Val Leu His Gly Leu Glu Leu Gly His Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Phe His>

FIG.2A

570 580 590 600 610 620
 CGT GAC TCC TGG CAC CTG CGC CAC CAA GTC CTG CTG GGC TTG CCG CCG CGG GAG CCT GTG
 GCA CTG AGG ACC GTG GAC GCG GTG GTT CAG GAC GAC GTA CAC CCG AAC GGC GGC GCC CTC GGA CAC
 Arg Asp Ser Trp His Leu Arg His Gln Val Leu Leu His Val Gly Leu Pro Pro Arg Glu Pro Val
 630 640 650 660 670 680 690
 CTC AGC TGC CGC TCC AAC ACT TAC CCC AAG GGC TTC TAC TGC AGC TGG CAT CTG CCC ACC CCC
 GAG TCG ACG GCG ACG TTG TGA ATG GCG TTC CCG AAG ATG ACG TCG ACC GTA GAC GGC TGG GGG
 Leu Ser Cys Arg Ser Asn Thr Tyr Pro Lys Gly Phe Tyr Cys Ser Trp His Leu Pro Thr Pro>

700 710 720 730 740 750
 ACC TAC ATT CCC AAC ACC TTC AAT GTG ACT GTG CTG CAT GGC TCC AAA ATT ATG GTC TGT GAG AAG
 TGG ATG TAA GGG TTG TGG AAG TTA CAC TGA CAC GAC GAC GTA CCG AGG TTT TAA TAC CAG ACA CTC TTC
 Thr Tyr Ile Pro Asn Thr Phe Asn Val Thr Val Leu His Gly Ser Lys Ile Met Val Cys Glu Lys
 760 770 780 790 800 810
 GAC CCG GCC CTC AAG AAC CGC TGC CAC ATT CGC TAC ATG CAC CTG TTC TCC ACC ATC AAG TAC
 CTG GGT CCG GAG TTC TTG GCG ACG GTG TAA GCG ATG TAC GTG GAC AAG AGG TGG TAG TTC ATG
 Asp Pro Ala Leu Lys Asn Arg Cys His Ile Arg Tyr Met His Leu Phe Ser Thr Ile Lys Try>

820 830 840 850 860 870 880
 AAG GTC TCC ATA AGT GTC AGC AAT GCC CTG GGC CAC AAT GCC ACA GCT ATC ACC TTT GAC GAG TTC
 TTC CAG AGG TAT TCA CAG TCG TTA CCG GAC CCG GTG TTA CCG TGT CGA TAG TGG AAA CTG CTC AAG
 Lys Val Ser Ile Ser Val Ser Asn Ala Leu Gly His Asn Ala Thr Ala Ile Thr Phe Asp Glu Phe
 890 900 910 920 930 940
 ACC ATT GTG AAG CCT GAT CCT CCA GAA AAT GTG GTA GCC CCG CCA GTG CCC AGC AAC CCT CGC
 TGG TAA CAC TTC GGA CTA GGA GGT CTT TTA CAC CAT CCG GCC GGT CAC GGC TCG TTG GGA GCG
 Thr Ile Val Lys Pro Asp Pro Pro Glu Asn Val Val Ala Arg Pro Val Pro Ser Asn Pro Arg>

950 960 970 980 990 1000 1010
 CCG CTG GAG GTG ACG TGG CAG ACC CCC TCG ACC TGG CCT GAC CCT GAG TCT TTT CCT CTC AAG TTC
 GCC GAC CTC CAC TGC ACC GTC TGG GGG AGC TGG ACC GGA CTG GGA CTC AGA AAA GGA GAG TTC AAG
 Arg Leu Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Ser Thr Trp Pro Asp Pro Glu Ser Phe Pro Leu Lys Phe

FIG.2B

1020 1030 1040 1050 1060 1070
 TTT CTG CGC TAC CGA CCC CTC ATC CTG GAC CAG TGG CAG CAT GTG GAG CTG TCC GAC GGC ACA
 AAA GAC GCG ATG GCT GGG GAG TAG GAC CTG GTC ACC CTC GTC GAC CAC CTC GAC AGG CTG CCG TGT
 Phe Leu Arg Tyr Arg Pro Leu Ile Leu Asp Gln Trp Gln His Val Glu Leu Ser Asp Gly Thr>
 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 GCA CAC ACC ATC ACA GAT GCC TAC GCC GGG AAG GAG TAC ATT ATC CAG GTG GCA GCC AAG GAC AAT
 CGT GTG TGG TAG TGT CTA CGG ATG CGG CCC TTC CTC ATG TAA TAG GTC CAC CGT CGG TTC CTG TTA
 Ala His Thr Ile Thr Asp Ala Tyr Ala Gly Lys Glu Tyr Ile Ile Gln Val Ala Ala Lys Asp Asn
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GAG ATT GGG ACA TGG AGT GAC TGG AGC GTA GCC GCC CAC GCT ACG CCC TGG ACT GAG GAA CCG
 CTC TAA CCC TGT ACC TCA CTG ACC TCG CAT CGG CGG GTG CGA TGC GGG ACC TGA CTC CTT GGC
 Glu Ile Gly Thr Trp Ser Asp Trp Ser Val Ala Ala His Ala Thr Pro Trp Thr Glu Glu Pro>
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270
 CGA CAC CTC ACC ACG GAG GCC CAG GCT GCG GAG ACC ACG ACC ACG ACC ACC AGC TCC CTG GCA CCC
 GCT GTG GAG TGG TGC CTC GTC CGG GTC CGA CGC CTC TGG TGC TGG TCG TGG TCG AGG GAC CGT GGG
 Arg His Leu Thr Thr Glu Ala Gln Ala Ala Glu Thr Thr Thr Ser Ser Ser Leu Ala Pro
 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 CCA CCT ACC ACG AAG ATC TGT GAC CCT GGG GAG CTG GGC AGC GGC GGG GGA CCC TGC GCA CCC
 GGT GGA TGG TGC TTC TAG ACA CTG GGA CCC CTC GAC CCG TCG CCG CCC CCT GGG ACG CGT GGG
 Pro Pro Thr Thr Lys Ile Cys Asp Pro Gly Glu Leu Gly Ser Gly Gly Pro Gys Ala Pro>
 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TTC TTG GTC AGC GTC CCC ATC ACT CTG GCC CTG GCT GCC GCT GCC GGC ACT GCC AGC AGT CTC TTG
 AAG AAC CAG TCG CAG GGG TAG TGA GAC GAC CGG GAC CGA CGG CGA CGG TGA CCG TCG TCA GAG AAC
 Phe Leu Val Ser Val Pro Ile Thr Leu Ala Leu Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ser Ser Leu Leu
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 ATC TGAGCC CGGCACCCCA TGAGGACATG CAGAGCACCT GCAGAGGAGC AGGAGGCCGG AGCTGAGCCT
 TAG ACTCGG GCGGTGGGT ACTCCTGTAC GTCTCGTGGA CGTCTCCTCG TCCTCCGGCC TCGACTCGGA
 Ile>

FIG.2C

1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550
GCAGACCCCG GTTCTATT TGCACACGG CAGGAGGACC TTTTGCAATC TCTTCAGACA CAATTTGTGG AGACCCCGGC
CGTCTGGGGC CAAAGATAAA ACGTGTGCCC GTCCCTCTGG AAAACGTAAG AGAAGTCTGT GTTAAACACC TCTGGGGCCG
1560 1570 1580 1590
GGGCCCCGGC CTGCCGCCCC CCAGCCCTGC CGCACCAAGC T
CCCGGGCCCG GACGGGGGGG GGTGCGGACG GCGTGGTTCG A

FIG.2D

DOMÍNIO TIPO "RECEPTOR DE CITOQUINA"

hCNTFR	116	C	RSNTYPKGSY	C	S	W	-24aa-	C	-9 aa-	C	-33aa-	FDEFTI	V
hIL6R	121	C	FRKSPLSNVV	C	E	W	-30aa-	C	-10aa-	C	-32aa-	FQCGGI	L
rPRLR	31	C	RSPD-KETFT	C	W	W	-26aa-	C	-10aa-	C	-33aa-	VDVTYI	V
mEPOR	52	C	FTQR-LEDLV	C	F	W	-25aa-	C	-15aa-	C	-29aa-	IHINEV	V
hIL2R	36	C	FYNS-RANIS	C	V	W	-25aa-	C	-11aa-	C	-37aa-	FKPFEN	L
mIL4R	34	C	FSDY-IRTST	C	E	W	-28aa-	C	-11aa-	C	-28aa-	FSPSGN	V
hGM-CSFR	126	C	FIYN-ADIMN	C	T	W	-26aa-	C	-12aa-	C	-31aa-	LDTKKI	E

KDPD	P	EN	V	VARPVPSNPRRL	E	V	T	W	-53aa-	V	AAK----	DNEIGT	WS	D	WS
QDPD	P	AN	I	TVTAVARNPRWLS	S	V	T	W	-50aa-	V	VQLRAQEEFGQGE	WS	WS	E	WS
EPEP	P	RN	L	TLEVQQLKDKKTY		L	-	W	-55aa-	V	QTRCKPDH---	GY	WS	R	WS
LLDA	P	AG	L	-LARRAEEGSHVV		L	R	W	-53aa-	V	RARMA-EPFSGF	WS	WS	A	WS
RLMA	P	IS	L	QV-VHVEHRCN-		I	S	W	-55aa-	V	RVKPL--QGEFTT	WS	WS	P	WS
KPLA	P	DN	L	TLHTNVSD-EWL-		L	T	W	-57aa-	V	RVRS---QILTGT	WS	WS	E	WS
RFNP	P	SN	V	TV---RCNTHCL		V	R	W	-56aa-	V	KIRAA-D-VRILN	WS	WS	S	WS

FIG. 3B



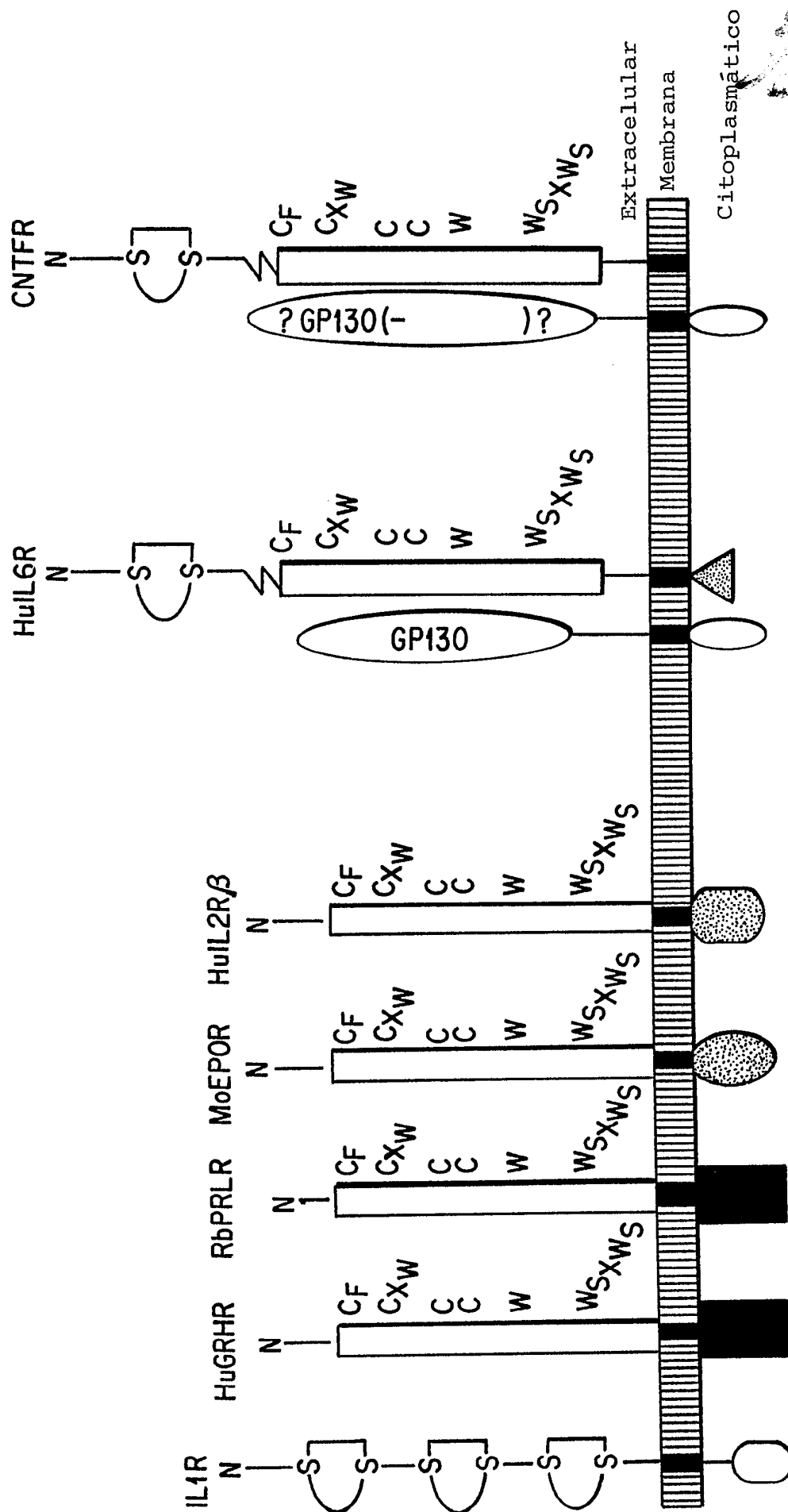


FIG. 4

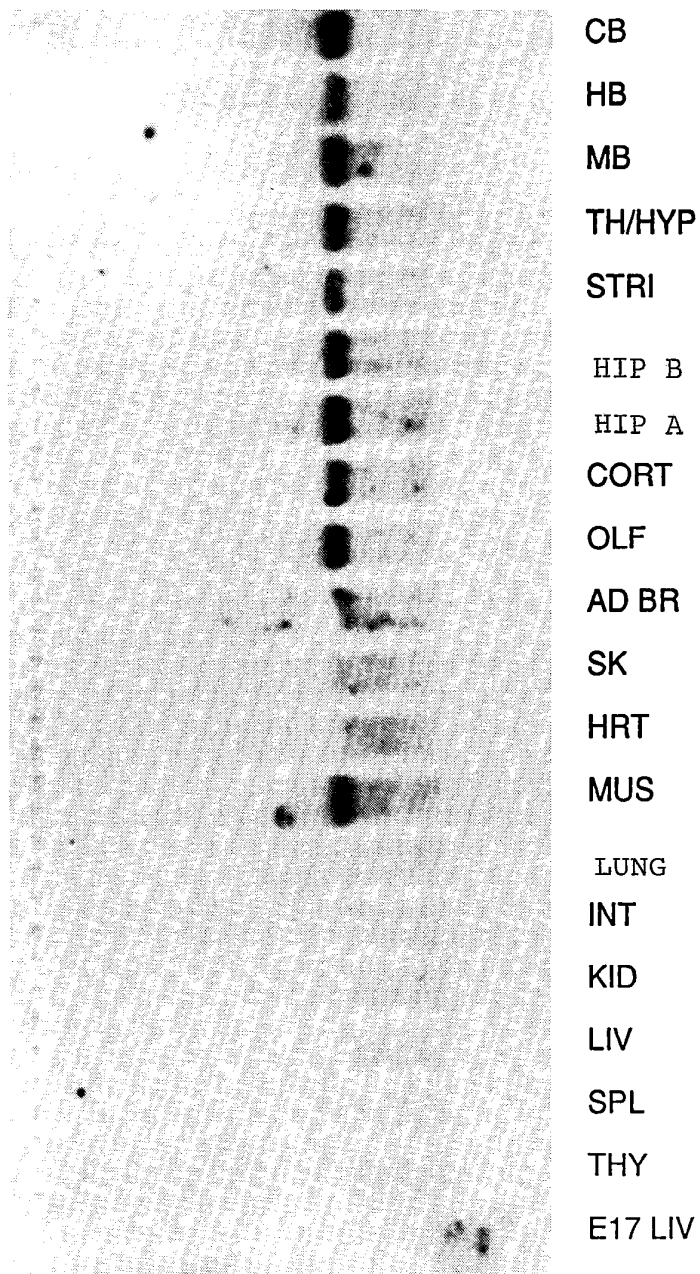


FIG. 5

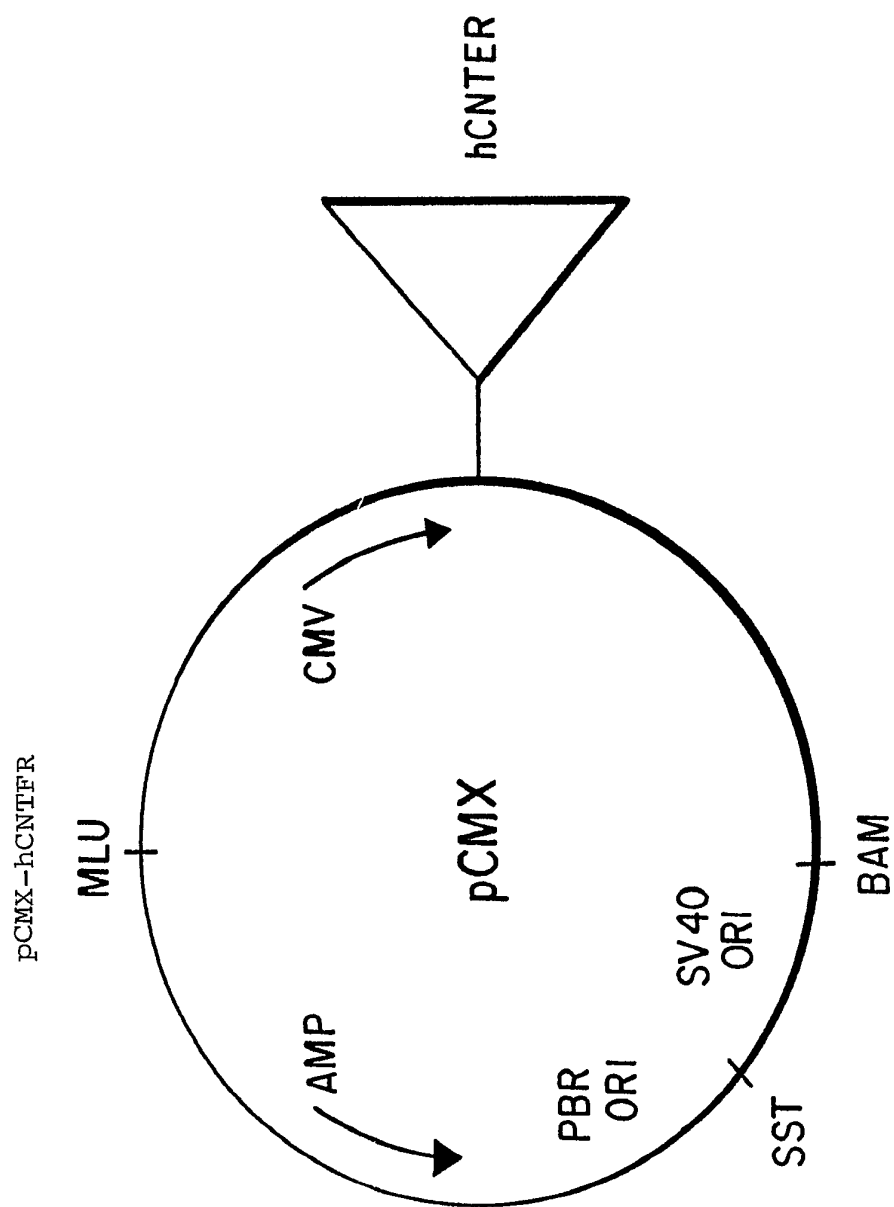


FIG. 6

[Handwritten signature]

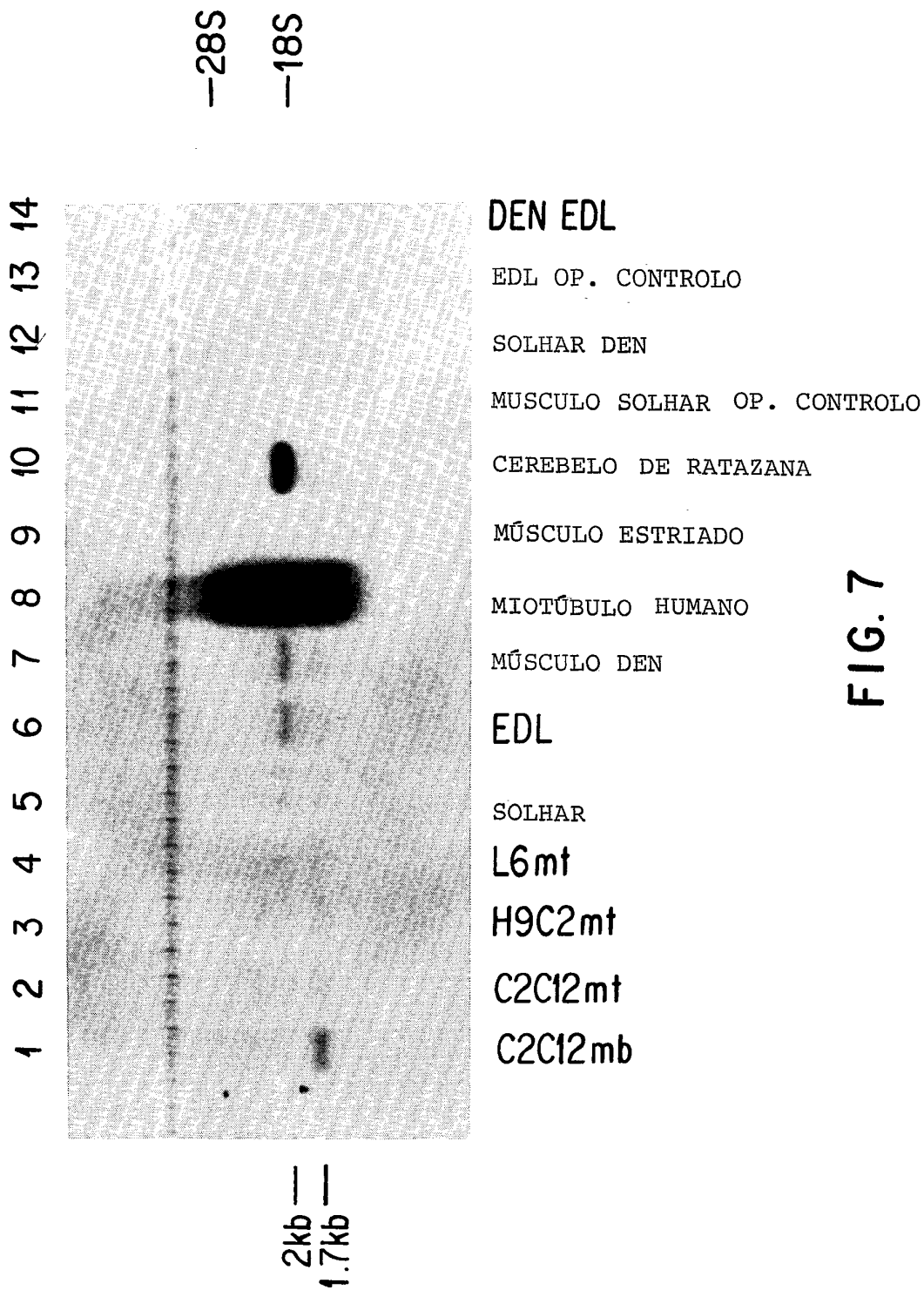


FIG. 7

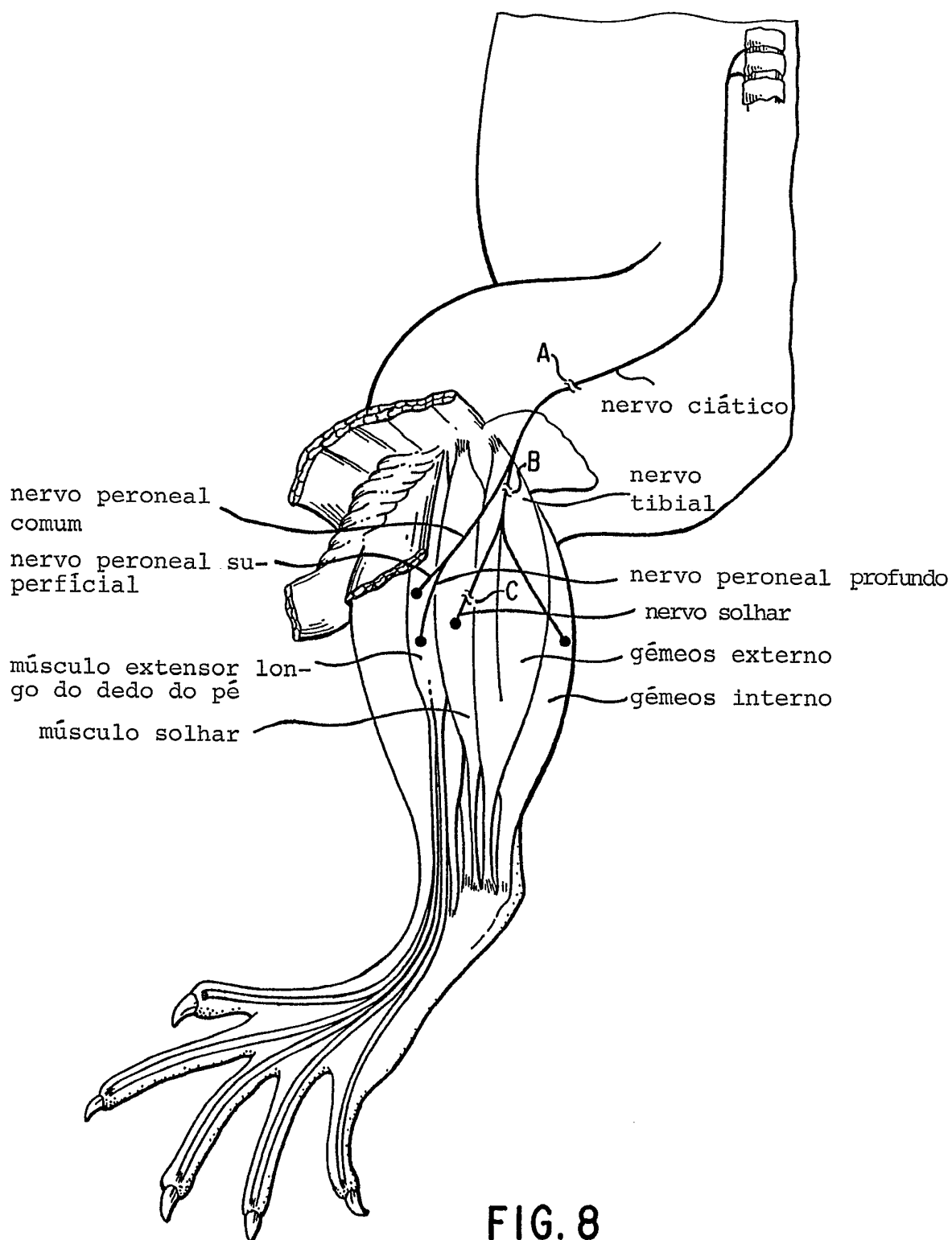


FIG. 8

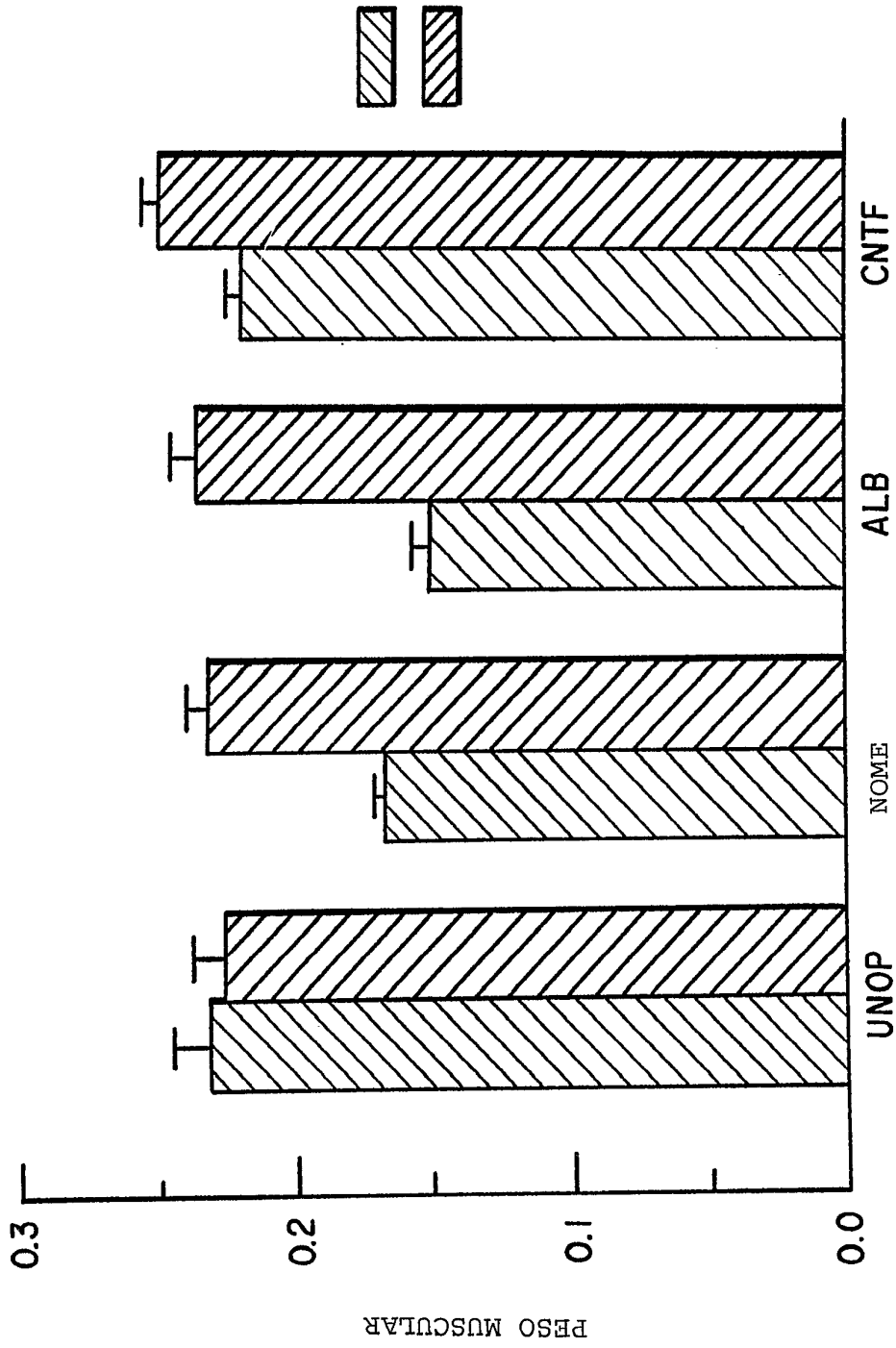


FIG. 9