

(11) *Número de Publicação:* **PT 89081 B**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C07K013/00 A C12N015/00 B

C12P021/02 B C12N005/00 B

A61K037/02 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) *Data de depósito:* 1988.11.24

(30) *Prioridade:* 1987.11.24 US 124896
1988.11.17 US 271521

(43) *Data de publicação do pedido:*
1989.11.30

(45) *Data e BPI da concessão:*
03/93 1993.03.25

(73) *Titular(es):*

AMGEN, INC.
1840, DEHAVILLAND DRIVE THOUS. OAKS,
CALIFORNIA 91320 US

(72) *Inventor(es):*

TSUTOMU ARAKAWA US
GARY M. FOX US

(74) *Mandatário(s):*

ANTÓNIO LUÍS LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
RUA DE MIGUEL LUPI 16 R/C 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ANÁLOGOS DO FACTOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS

(57) *Resumo:*

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 89 081

REQUERENTE: AMGEN INC., norte-americana, industrial, com sede em 1900 Oak Terrace Lane, Thousand Oaks, California 91320, Estados Unidos da América.

EPÍGRAFE: " PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ANÁLOGOS DO
FACTOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS "

INVENTORES: Tsutomu Arakawa, e Gary M. Fox.

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

Estados Unidos da América, em 24 de Novembro de 1987, sob o nº. 124,896 e em 17 de Novembro de 1988, sob o nº. 271,521.

50487-387

4.

AMGEN INC.

"Processo para a produção de análogos do factor de
crescimento de fibroblastos"

A presente invenção refere-se a análogos do factor de crescimento de fibroblastos. Em especial, a presente invenção refere-se a análogos do factor de crescimento de fibroblastos básicos recombinantes ("r-bFGF") em um hospedeiro de estirpe E. Coli, (*Escherichia Coli*) e a polinucleótidos que codificam esses factores.

A nomenclatura utilizada é a seguinte:

FGF = factor de crescimento de fibroblastos,
aFGF = factor de crescimento de fibroblastos ácido,
n-FGF = FGF natural ou de ocorrência natural,
h-FGF = FGF humano,
b-FGF = FGF bovino,
h-bFGF = FGF básico humano,
b-bFGF = FGF básico bovino,
r-bFGF = FGF básico recombinante,
rh-bFGF = FGF básico humano recombinante,
rb-bFGF = FGF básico bovino recombinante.

4.

Antecedentes

O factor de crescimento de fibroblastos (FGF), foi primeiro descoberto por Gospodarowicz, "Nature", 249, 1974, p. 123, sob a forma de uma actividade derivada de tecido do cérebro bovino ou de pituitária que era mitogénica para fibroblastos e células endozeliais. Verificou-se mais tarde que o mitogéno principal do cérebro é diferente do isolado da pituitária. Estes dois factores foram designados por FGF básico e ácido porque apresentam actividades biológicas similares mas não idênticas pois diferem no seu ponto isoelétrico.

Subsequentemente isolaram-se outros mitogénos de células endoteliais, a partir de um certo número de tecidos e de tumores que eram muito similares ou idênticos ao FGF básico. Estes factores incluem, por exemplo, o factor de crescimento derivado de hepatoma (KIAGS brun et al, "PNAS", 83, 1986 p. 2448-2452, e Lobb et al; "J. Biol. Chem." 23, 1984 p. 6295-6299), factor de crescimento derivado de condrossarcoma (Shing et al, "Science", 223, 1984, p. 1296-1299), factor de crescimento derivado de beta retina (Baird et al, "Biochemistry", 24, 1985 p. 7855-7860), factor de crescimento derivado de cartilagem (Sullivan e Klagsbrun; "J. Biol Chem.", 260, 1985, p. 2399-2403), factor 2 de crescimento astrogliol (Pettman et al, "FEBS Lett."; 189, p. 102-108) factor de crescimento derivado do olho (Courty et al, "Biochimie", 67, 1985, p. 265-2698) factor de crescimento derivado de hipotálamo catiónico (Klagsbrun e Shing, "PNAS", 82, 1985, p. 805-809), factores de crescimento da

classe 2 e de ligação à beta heparina (Lobb e Fett, "Biochemistry", 23, 1984, p. 6265-6299; Lobb et al "Biochem.", 24, 1985, p. 4969-4973; Lobb et al; "BBRC", 131, 1985 p. 586-592; Lobb et al, "J. Biol. Chem", 261, 1986 p. 1924-1928) e um componente de factor de crescimento derivado de macrófagos (Bair et al, "BBRC", 126, 1985, p. 358-364).

Todos os factores acima referidos partilham a propriedade de bFGF de ligação estreita com a heparina e todos são proteínas básicas. Também se descobriu um grupo similar de factores que se ligam à heparina tipificados por aFGF. Estas moléculas eluem da heparina a uma baixa concentração de cloreto de sódio e têm pontos isoeléctricos na região ácida. A propriedade de ligação à heparina destes factores facilita a sua purificação permitindo o isolamento de proteína suficiente para a análise da sequência de aminoácidos em diversos casos. Ainda que a utilização da heparina tenha facilitado a purificação de FGF, a utilização de heparina em processos de purificação em larga escala não é desejável porque é despendiosa, é possível a contaminação do produto com heparina e a perda de rendimento devida à ligação irreversível com a heparina .

Os FGF básico e ácido são provavelmente derivados do mesmo gene ancestral e são 55% homólogos na sequência de aminoácidos tendo a mesma estrutura de introns/exons.

As experiências de manchas de Southern sugerem que existe apenas um gene para cada um dos FGF básico e ácido; as diferenças entre as moléculas isoladas de diferentes tecidos são provavelmente devidas a processos de post-

-translação. A escala de actividades biológicas das duas classes apresenta-se idêntica ainda que o bFGF seja cerca de dez vezes mais potente do que o aFGF na maior parte dos sistemas de bioensaio.

O FGF básico consiste em uma proteína de cadeia simples, não glicosilada, com um peso molecular de aproximadamente 16 500. O FGF básico contém quatro resíduos de cisteína mas desconhece-se o número de ligações de disulfureto se é que existe alguma. Um produto de tradução primária com 155 aminoácidos foi proposto para bFGF mas a maior parte da que foi encontrada no tecido pituitário tem 146 aminoácidos.

Foram isolados dos diferentes tecidos diversas formas de peso molecular diferindo no comprimento no N-terminal, todas apresentando-se como retentoras de actividade biológica.

O FGF básico é uma proteína extremamente básica com um ponto isoeléctrico de 9,6. O FGF básico liga-se avidamente à heparina eluindo de colunas de sefarose da heparina no cloreto de sódio a cerca de 1,6 M..A actividade biológica de bFGF é destruída pelo aquecimento a 70°C ou pelos detergentes. No genoma as sequências que codificam este produto de tradução são interrompidas por dois introns; a primeira imerge do codão 60 e a segunda separa os codões 94 e 95. A dimensão da região codificadora genómica completa não é conhecida mas possui pelo menos 34Kb de comprimento. O gene para bFGF está localizado no cromossoma 4.

Os dados da primeira sequência para bFGF foram publicados por Bohlen et al, "PNAS", 81, 1984; p. 5364-

4

-5368, que determinaram os 15 aminoácidos no N-terminal de material purificado proveniente de tecido de pituitária bovina. Subseqüentemente, Esch et al; "PNAS", 82, 1985 p. 6507-6511, . Referiu a sequência completa de bFGF de pituitária bovina e comparou-a, ao mesmo tempo, com a sequência do terminal amina de aFGF. O pedido de patente de invenção PCT WO 86/07595 descreve a produção de bFGF em E. Coli. Contudo, o rendimento referido do produto é extremamente baixo. A clonagem do gene para b-bFGF foi descrita em primeiro lugar por Abraham et al; "Science"; 233, p.545-548 e, posteriormente, os mesmos autores descrevem a sequência nucleotídica e a organização genômica de h-bFGF em ("EMBO Journal", 5, 1986 p. 2523-2528). Os bFGF humano e de bovino diferem apenas de dois aminoácidos.

Embora preparações de grande pureza de bFGF tenham sido recentemente tornado disponiveis para ensaios, muitos estudos "in vitro" têm sido publicados utilizando material com diversos níveis de pureza. Nestes estudos, o bFGF tem sido descrito como possuindo uma actividade mitogénica potente para uma grande variedade de células de origem mesodérmica podendo ser quimiotáctico para as células endoteliais e para fibroblastos. Além disso, o r-bFGF derivado de tecido e de ocorrência natural parece induzir à neo-vascularização na córnea do coelho e em ensaios sobre a membrana corioalantoideia do frango, portanto podendo apresentar-se utilizável para acelerar a cicatrização de feridas. Fourtanier et al, "J. Inv. Derm.", 87, 1986 p.76-80, referiu que a preparação derivada de retina bovina é capaz de estimular a neo-vascularização e a re-epitelização e promover a

4.

cicatrização de feridas numa experiência em vesículas de cobaia. Davidson et al; "J. Cell. Biol."; 100, 1985, p. 1219-1227, demonstraram que a cicatrização acelerada de feridas acompanhada por aumento de tecido granuloso e de acumulação de colagénio pode ser induzida pelo factor derivado de cartilagem bovina, em um sistema experimental de feridas no rato. Buntrock e colaboradores; "Exp. Path."; 21, p.46-53 e "Exp. Path." 21, 1982, p. 62-67, também referiram o aumento do tecido granuloso e neo-vascularização durante a cicatrização acelerada de feridas em ratos utilizando um extracto de tecido de cérebro bovino.

Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se a análogos de bFGF que são mais estáveis do que o bFGF de ocorrência natural e que facilitam a purificação de r-bFGF. Proporciona-se um análogo de bFGF que comporta uma sequência de aminoácidos que incorpora resíduos de cisteína em que, pelo menos um, de preferência dois dos referidos resíduos de cisteína, é/são substituído(s) por um resíduo de aminoácido diferente.

A presente invenção também se refere a um processo preferido para a produção de análogos de bFGF, o qual consiste em:

- 1) desenvolver em condições nutrientes apropriadas, células hospedeiras de E. Coli, transformadas com um vector plasmídico de ADN, em que esse vector comporta uma sequência de ADN codificadora para expressão no hospedeiro de E. Coli de

4

um análogo de bFGF comportando uma parte ou o total da conformação estrutural primária de bFGF e uma ou mais das propriedades biológicas do factor de crescimento de fibroblastos básicos humanos em que pelo menos um resíduo de cisteína é substituído por um resíduo de um aminoácido diferente (referido aqui como "análogos de bFGF"), uma sequência do promotor regulada e um gene de controlo do número de cópias induzível pela temperatura;

- 2) isolar os análogos de bFGF desejados, da expressão das sequências de ADN no referido vector; e
- 3) purificar os análogos de bFGF desejados.

A presente invenção também se refere a métodos de purificação de análogos de r-bFGF derivados de E. Coli, utilizando sistemas cromatográficos que não contenham heparina.

Também são proporcionadas as sequências codificadoras de ADN para todos ou para parte de análogos de rh-bFGF. Estas sequências podem incluir, preferivelmente:

- 1- A incorporação dos codões preferidos para a expressão por estirpes hospedeiras de E. Coli seleccionadas, ("codões de expressão de E. Coli").
- 2- A preparação de locais de clivagem por enzimas de endonuclease de restrição; e/ou
- 3- A preparação de sequências de ADN intermédias, terminais ou iniciais que facilitam a construção de vectores expressados facilmente.



As novas sequências de ADN da presente invenção incluem sequências utilizaveis na expressão segura em células hospedeiras de E. Coli de análogos de bFGF.

As sequências de ADN da presente invenção incluem especificamente:

- a) sequências de ADN representadas na fig. 2 em que, pelo menos um codão que codifica um resíduo de cisteína, é substituído por um codão que codifica um resíduo de aminoácido diferente, (referidas como "sequências análogas");
- b) uma sequência de ADN que hibridiza com uma das sequências análogas ou com os seus fragmentos;
- c) uma sequência de ADN que hibridiza com uma das sequências análogas mas sem desgenerescência do código genético.

Mais especificamente, entende-se na parte c) que são sequências de ADN preparadas que codificam análogos de bFGF as quais podem incorporar codões que facilitam a tradução do ADN mensageiro nos hospedeiros microbianos preferidos. Estas sequências preparadas podem ser facilmente construídas de acordo com os métodos de Alton et al, PCT-pedido de patente de invenção no WO 83/04053.

Descrevem-se a seguir os análogos de bFGF isolados e purificados que possuem uma ou mais das propriedades biológicas (p/ex: propriedades imunológicas e actividade biológica "in vitro") e propriedades físicas (por exemplo, peso molecular) de bFGF de ocorrência natural, incluindo as suas variantes alélicas.

Estes análogos de bFGF também podem ser caracte-



terizados por serem o produto de expressão em hospedeiras de E. Coli de sequências de ADN exógenas. Os análogos de bFGF da presente invenção, que são expressos por células hospedeiras de E. Coli podem incluir um resíduo do aminoácido metionina inicial, na posição 1 como se mostra no fig. 2. Alternativamente, um ou mais dos resíduos dos aminoácidos terminais podem ser retirados da sequência de ADN, mantendo a actividade biológica de bFGF de ocorrência natural como é sabido pelos técnicos desta matéria.

Também estão incluídos no âmbito da presente invenção diversos veículos de clonagem replicáveis, veículos de expressão e culturas de E. Coli transformadas, comportando todos a informação genética alterada necessária para efectuar a produção de análogos de bFGF derivados de E. Coli.

Pode utilizar-se a mutagénese de local dirigido para converter o gene para b-bFGF num codificador para rh-bFGF. Também se pode modificar o gene bovino e o gene humano por mutagénese de sítio-dirigido, para converter pelo menos um dos resíduos de cisteína.

Numerosos aspectos e vantagens da presente invenção serão evidentes para os técnicos após consideração da descrição detalhada que se segue e que proporciona a exemplificação da prática da presente invenção nos seus aspectos presentemente preferidos.

Breve descrição das figuras

A fig. 1 é a representação esquemática da reunião e clonagem do gene de bFGF.

4.

A fig. 2 representa sequências nucleotídicas e de aminoácidos de r-bFGFs. As caixas a cheio representam as alterações dos nucleotídeos e dos aminoácidos resultantes que são produzidas pela mutagénese de sítio-dirigido, a fim converter o gene bovino num codificador de rh-bFGF. As caixas a ponteadas representam as alterações feitas para converter o gene de bFGF em um codificador para análogos de bFGF da presente invenção.

A fig. 3 representa um gráfico da actividade mitogénica de r-bFGFs em células NIH3T3. O efeito mitogénico de rh-bFGF (.) e rb-bFGF (o) e bFGF humano recombinante (ser-70.80) (x) em células NIH3T3. A dose de r-bFGF está desenhada em função da percentagem de estimulação máxima da síntese de ADN avaliada por absorção, nessa dose, de, ^3H timidina.

A fig. 4 representa a fotografia de uma coloração com prata de uma electroforese sobre gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio ("SDS-PAGE") de r-bFGFs purificados;

A fig. 5 representa o perfil obtido por cromatografia líquida de alta resolução de rb-bFGF S-carboximetilado natural digerido com tripsina (topo do painel). As setas indicam os péptidos que exibem as diferenças principais no tempo de retenção após a S-carboximetilação.

A fig. 6 representa um espectro dicróico circular de rb-bFGF nas regiões de U.V. longíqua (esquerda) e próxima (direita).

A fig. 7 representa um gráfico da actividade mitogénica do análogo bFGF de Ser-26,70,88,93 em células

NIH3T3. A dose de r-bFGF está registada em função da percentagem de estimulação máxima da síntese de ADN, medida pela absorção de ^3H -timidina nessa dose.

A fig. 8 representa um diagrama de um estudo e observação "in vivo" de um ferimento numa orelha de rato do exemplo 16.

Descrição detalhada

Proporcionam-se novos análogos de bFGF de acordo com a presente invenção, os quais incorporam pelo menos um, de preferência dois, dos resíduos de cisteína que se encontram em bFGF natural substituídos por um resíduo de aminoácido diferente. Verificou-se que estes análogos exibem uma estabilidade surpreendente, acentuadamente aumentada em relação ao bFGF natural. Acredita-se que os análogos de bFGF mais estáveis da presente invenção podem também aumentar a eficácia de bFGF nos tratamentos de cicatrização de feridas e em cirurgia.

A presente invenção também proporciona genes manufacturados ou sintéticos capazes de síntese directa em hospedeiros microbianos seleccionados, (por exemplo, bactérias, leveduras e células de mamíferos em cultura), de análogos de bFGF.

Também são abrangidas pela presente invenção as composições farmacêuticas que incorporam quantidades eficazes de bFGF da presente invenção em conjunto com diluentes agentes adjuvantes e/ou veículos apropriados úteis na cicatrização de feridas e em aplicações cirúrgicas, incluindo, mas não limitando a cicatrização de feridas superficiais,

4.

cicatrização óssea, angiogenese (formação de vasos sanguíneos, especialmente importante para a cicatrização de feridas profundas), regeneração de nervos e formação e regeneração de órgãos.

Tal como aqui se utiliza, a designação "factor de crescimento do fibroblasto básico derivado de tecido" refere-se a factores de crescimento de fibroblastos básicos derivados de tumores, de células eucarióticas mantidas em cultura, tecidos normais e outros similares.

Tal como aqui se utiliza, o termo "manufacturado" aplicado a uma sequência de ADN ou a um gene designa um produto sintetizado quimicamente na sua totalidade, por reunião de bases nucleotídicas ou derivado da replicação biológica sintetizado quimicamente. Como tal, a designação é exclusiva de produtos sintetizados por métodos de ADN de clonagem genómica, os quais envolvem materiais iniciais originalmente de origem biológica.

Tal como aqui se utiliza, o termo "sintetizado" refere-se a mutagénese de sítio-dirigido ou outra alteração de um gene manufacturado previamente.

Como aqui se descreve, a designação "resíduos de cisteína que existem sob a forma de sulfidrilos livres" refere-se a resíduos de cisteína que não envolvem a formação de ligações de di-sulfureto.

O bFGF recombinante derivado de E. Coli foi produzido de acordo com o seguinte processo geral:

A sequência de aminoácidos de bFGF publicada por Esch et al; "PNAS", 82, 1985, p. 6507-6511, foi utilizada como base para a produção do gene de bFGF para expres-

são em E. Coli. A sequência nucleotídica para este gene manufacturado inclui codões utilizados muito frequentemente pela E. Coli e locais de restrição apropriados para serem utilizados em clonagem. Representativo de um gene manufacturado é o gene apresentado no quadro I.

O quadro I representa um gene manufacturado para b-bFGF, enquanto que o quadro II representa um gene sintético para h-bFGF.

A sequência nucleotídica do gene manufacturado para b-bFGF e a sequência de aminoácidos a partir da qual este é derivado estão representadas na fig. 2. As caixas a cheio indicam as alterações nucleotídicas e de aminoácidos resultantes que foram produzidas pela mutagênese de sítio-dirigido afim de se converter o gene bovino manufacturado em um gene sintético que codifica para h-bFGF. As caixas com linhas ponteadas indicam as alterações subsequentes realizadas para converter o gene sintético de h-bFGF em sequências nas quais um ou mais dos resíduos de cisteína estão substituídos por resíduos de serina. Aceita-se que a mutagênese de sítio-dirigido pode ser utilizada para gerar outros análogos de b-bFGF. Por outras palavras, podem utilizar-se outros aminoácidos para substituir os resíduos de cisteína. Geralmente o aminoácido escolhido como substituto do resíduo de cisteína é escolhido com base na sua capacidade para criar um análogo que retenha uma estrutura similar mas que impeça a formação de dímeros.

Exemplos destes aminoácidos incluem a serina, a alamina, o ácido aspártico e a asparagina. Outros aminoácidos que podem substituir a cisteína serão reconhecidos

4.

pelos técnicos nesta matéria.

Foram manufacturados oligonucleotidos que correspondem a ambas as cadeias do gene de b-FGF nas secções de sobreposição e reunião em duas secções maiores por hibridização e subsequente ligação.

As duas secções maiores foram clonadas depois por meio de um vector fágico apropriado (por exemplo, M13mpl8) para análise da sequência nucleotídica. Estes vectores fágicos são facilmente determinados pelos técnicos da matéria. Após verificação da sequência correcta, excisam-se ambas as secções por digestão com endonucleases de restrição, isoladas sobre gel e ligadas por meio de um vector de expressão apropriado. A expressão do gene de bFGF codificada no vector de expressão é regulada por uma sequência promotora regulada e os genes de controlo do número de cópias induzíveis pela temperatura localizados no vector de expressão.

O termo "promotores regulados" é utilizado para referir os promotores P_L , (por exemplo, promotores derivados do fago λ [iamede]) e, para abreviar, o promotor P_L . Os vectores de expressão que contêm estes promotores regulados e os genes de controlo do número de cópias induzíveis pela temperatura, estão descritos no pedido de patente de invenção europeia Nº 136,490. O desenvolvimento do vector de expressão que contêm o gene de bFGF numa estirpe de E. Coli hospedeira apropriada, produz o rb-bFGF. Quando se lisaram as células que continham o rb-bFGF e se submeteram a centrifugação a velocidade baixa, encontrou-se de cerca de 30% até cerca de 70% de rb-bFGF sob a forma solúvel na frac



ção sobrenadante. A purificação utilizando sistemas cromatográficos isentos de heparina, isto é, cromatografia de afinidade, forneceu um produto polipeptídico que se verificou ser pelo menos 95% puro, através de electroforese em gel de poliacrilamida e que, virtualmente, não continha endotoxinas ou contaminação por ADN.

Quadro I

Factor de crescimento de fibroblasto de bovino básico/gene
manufaturado

10	30	50
CTAGAAGGAGGAATAACATATGCCAGCTCTGCCAGAAGATGGTGGATCCGGTGCTTTCCC		
GATCTTCCTCCTTATTGTATACGGTCGAGACGGTCTTCTACCACCTAGGCCACGAAAGGG		
70	90	110
GCCAGGTCATTTCAAAGATCCGAAACGTCTGTACTGCAAAAACGGTGGTTTTTTCTCTGCG		
CGGTCCAGTAAAGTTTCTAGGCTTTGCAGACATGACGTTTTTGGCACCAAAAAAGGACGC		
130	150	170
TATCCATCCGGATGGTCGTGTTGATGGTGTACGTGAGAAATCTGATCCGCATATCAAAC		
ATAGGTAGGCCTACCAGCACAACCTACCACATGCACTCTTTAGACTAGGCGTATAGTTTGA		
190	210	230
GCAGCTGCAAGCTGAAGAGCGTGGTGTAGTTTCTATTAAAGGTGTATGTGCTAACCGGTA		
CGTCGACGTTTCGACTTCTCGCACCACATCAAAGATAATTTCCACATACACGATTGGCCAT		
250	270	290
CCTGGCTATGAAAGAAGACGGTCGTCTGCTGGCTTCTAAGTGTGTTACTGACGAATGTTT		
GGACCGATACTTTCTTCTGCCAGCAGACGACCGAAGATTCACACAATGACTGCTTACAAA		
310	330	350
CTTTTTCGAACGTCTGGAATCTAACAACCTACAACACTTACAGATCTCGTAAATACTCTTC		
GAAAAAGCTTGCAGACCTTAGATTGTTGATGTTGTGAATGTCTAGAGCATTTATGAGAAG		
370	390	410
CTGGTATGTAGCTCTGAAACGTACTGGTCAGTACAAACTGGGTCCGAAGACTGGTCCGGG		
GACCATACATCGAGACTTTGCATGACCAGTCATGTTTGACCCAGGCTTCTGACCAGGCCC		
430	450	470
TCAGAAAGCTATCCTGTTTCTGCCGATGTCTGCTAAATCTTAATAGCTCGAGAAGCTT		
AGTCTTTCGATAGGAACAAGACGGCTACAGACGATTTAGAATTATCGAGCTCTTCGAA		

4.

Quadro II

Factor de crescimento de fibroblasto básico humano/gene sintético

10	30	50
CTAGAAGGAGGAATAACATATGCCAGCTCTGCCAGAAGATGGTGGATCCGGTGCTTTCCC		
GATCTTCCTCCTTATTGTATACGGTCGAGACGGTCTTCTACCACCTAGGCCACGAAAGGG		
70	90	110
GCCAGGTCATTTCAAAGATCCGAAACGTCTGTACTGCAAAAACGGTGGTTTTTTCCTGCG		
CGGTCCAGTAAAGTTTCTAGGCTTTGCAGACATGACGTTTTTGGCACCAAAAAAGGACGC		
130	150	170
TATCCATCCGGATGGTCGTGTTGATGGTGTACGTGAGAAATCTGATCCGCATATCAAAC		
ATAGGTAGGCCTACCAGCACAACTACCACATGCACTCTTTAGACTAGGCGTATAGTTTGA		
190	210	230
GCAGCTGCAAGCTGAAGAGCGTGGTGTAGTTTCTATTAAAGGTGTATGTGCTAACCGGTA		
CGTCGACGTTTCGACTTCTCGCACCATCAAAGATAATTTCCACATACACGATTGGCCAT		
250	270	290
CCTGGCTATGAAAGAAGACGGTCGTCTGCTGGCTTCTAAGTGTGTTACTGACGAATGTTT		
GGACCGATACTTTCTTCTGCCAGCAGACGACCGAAGATTCACACAATGACTGCTTACAAA		
310	330	350
CTTTTTCGAACGTCTGGAATCTAACAACCTACAACACTTACAGATCTCGTAAATACACTTC		
GAAAAAGCTTGCAGACCTTAGATTGTTGATGTTGTGAATGTCTAGAGCATTTATGTGAAG		
370	390	410
CTGGTATGTAGCTCTGAAACGTACTGGTCAGTACAACTGGGTTCGAAGACTGGTCCGGG		
GACCATACATCGAGACTTTGCATGACCAGTCATGTTTGACCCAAGCTTCTGACCAGGCC		
430	450	470
TCAGAAAGCTATCCTGTTTCTGCCGATGTCTGCTAAATCTTAATAGCTCGAGAAGCTT		
AGTCTTTCGATAGGACAAAGACGGCTACAGACGATTTAGAATTATCGAGCTCTTCGAA		

4.

Utilizou-se a mutagénese de sítio-dirigido para converter o gene de bovino em um codificador para o bFGF humano. Utilizou-se o mesmo esquema de purificação para rb-bFGF que se utilizou para purificar o rb-bFGF.

Avaliou-se a actividade mitogénica de rb-bFGF, rh-bFGF e análogos de FGF, da presente invenção derivados de E. Coli, utilizando um ensaio mitogénico "in vitro" que se baseia no aumento da absorção de timidina rádio-marcada por células 3T3 de murganho que acompanham a síntese de ADN aumentada durante a divisão celular.

Utilizou-se a mutagénese de sítio-dirigido oligonucleotídica para modificar o gene de rh-bFGF de modo a que as sequências que codificam para uma parte ou para o total dos resíduos de cisteína codificarão então para resíduos de aminoácidos diferentes. Os análogos de bFGF da presente invenção demonstraram de um modo surpreendente possuir uma estabilidade acentuadamente superior á da molécula de bFGF ainda que não desprovida da actividade da bFGF.

Os exemplos que se seguem servem para uma melhor compreensão dos vários aspectos da presente invenção. A designação "D.O.", tal como é utilizada nestes exemplos refere-se a unidades de Densidade optica a 600 nm.

EXEMPLO 1

Preparação de um gene manufacturado de codificação de b-bFGF.

Este exemplo refere-se à preparação de um gene manufacturado que codifica b-bFGF em que, de preferência, são incluídos codões de expressão em E. Coli. O protocolo utilizado para preparar o gene manufacturado que codi-



fica o produto de b-bFGF está descrito de forma geral por Alton et al. na publicação PCT Nº WO 83/04053 que aqui está incorporada como referência. Os genes foram designados para reunião inicial dos oligonucleotidos componentes em duplexes múltiplos que por sua vez foram reunidos em duas secções discretas. Estas secções foram concebidas para rápida amplificação e, após a remoção do sistema de amplificação poderam ser sequencialmente reunidas ou através da ligação de fragmentos múltiplos num vector de expressão apropriado.

Reunião do sector I do factor de crescimento de fibroblastos.

Mediram-se 200 pm de cada um dos 16 oligómeros necessários à reunião da secção I, representada no quadro III, em tubos de eppendorf e secaram-se em vácuo. Prepararam-se 320 µl de uma mistura de quinase que continha 32 µl de uma solução tampão de ligação 10 x (50 M HEPES, ph 7,6), 0,7 µl de ATP (adenosina trifosfato) 10 mM 1 µl de 3×10^7 contagem/minuto/µl de ATP rádio-marcado e 266 µl de água.

Reuniram-se os reagentes num tubo de quinase (Boehringer Mannheim, Ingelheim, Alemanha Ocidental), que continha 20 µl de enzima quinase com uma concentração de 10 unidade/µl. Dividiu-se esta mistura de quinase em partes alíquotas por cada um dos tubos de 2 a 15 contendo, respectivamente, 2 a 15 oligonucleotidos. Os tubos que continham os oligonucleotidos 1 e 16 receberam apenas a solução tampão de ligação. Fez-se uma incubação dos tubos que continham os nucleotidos 2 a 15, à temperatura de 37°C durante 45 minutos, tempo ao fim do qual se retiraram alíquotas de, 1/4 de µl de cada tubo, e se colocaram sobre tiras de papel para

4.

cromatografia DE81 (Whatman, Maidstone, K.U.) utilizando como agente de eluição o formato de amônio 0,35M e analisaram-se num contador de cintilação de líquido. A análise de cintilação de líquido mostrou que mais de metade das contagens estavam na origem

Quadro III

OLIGOMEROS FGF, DE SECÇÃO I

- 1) 5' CTAGAAGGAGGAATAACATATGCCAGCTCT 3'
- 2) 5' GCCAGAAGATGGTGGATCCGGTGCTTTCCC 3'
- 3) 5' GCCAGGTCATTTCAAAGATCCGAAACGTCTG 3'
- 4) 5' TACTGCAAAAACGGTGGTTTTTTCCTGCGTA 3'
- 5) 5' TCCATCCGGATGGTCGTGTTGATGGTGTAC 3'
- 6) 5' GTGAGAAATCTGATCCGCATATCAAACGTGCA 3'
- 7) 5' GCTCAAGCTGAAGAGCGTGGTGTAGTTT 3'
- 8) 5' CTATTAAAGGTGTATGTGCTAACCGGTACCTG 3'
- 9) 5' CTGGCAGAGCTGGCATATGTTATTCCTCCTT 3'
- 10) 5' TGGCGGGAAAGCACCGGATCCACCATCTT 3'
- 11) 5' AGTACAGAGACGTTTCGGATCTTTGAAATGACC 3'
- 12) 5' ATGGATACGCAGGAAAAAACACCGTTTTTGC 3'
- 13) 5' TCACGTACACCATCAACACGACCATCCGG 3'
- 14) 5' CAGCTGCAGTTTGATATGCGGATCAGATTTC 3'
- 15) 5' ATAGAAACTACACCACGCTCTTCAGCTTG 3'
- 16) 5' AATTCAGGTACCGGTTAGCACATACACCTTTA 3'

4.

Daqui resultou a incubação adicional dos tubos durante mais 45 minutos a 37°C depois de se adicionar 2 µl de ATP 10 mM a cada um dos tubos que continham 2 a 15 oligonucleotidos.

Ao final deste tempo, todos os tubos foram submetidos a ebulição durante 10 minutos, depois foram centrifugados e reunidos em duplexes. Isto foi realizado mediante adição do conteúdo do tubo 1 (duplex Nº 1), do tubo 10 ao tubo 2 (duplex Nº 2), do tubo 11 ao tubo 3 (duplex Nº 3), do tubo 12 ao tubo 4 (duplex Nº 4), do tubo 13 ao tubo 5 (duplex Nº 5), do tubo 14 ao tubo 6 (duplex Nº 6), do tubo 15 ao tubo 7 (duplex Nº 7) e do tubo 16 ao tubo 8 (duplex Nº 8). Estas oito misturas de oligonucleotidos foram seguidamente submetidas a ebulição, arrefecidas lentamente até à temperatura ambiente para permitir a formação dos duplexes. Reuniram-se os duplexes de forma a combinar os duplexes Nºs 1 e 2 (tetrâmero 1 + 2), os duplexes Nºs 3 e 4 (formando o tetrâmero 3 + 4), os duplexes Nºs 5 e 6 (tetrâmero 5 + 6), e finalmente os duplexes Nºs 7 e 8 (tetrâmero 7 + 8). A cada um destes tubos, agora contendo tetrâmeros adicionou-se 2 µl de ATP 10 mM e 2 µl de ligase T4 ADN (Boehringer Mannheim).

Incubaram-se estas misturas de ligação à temperatura de 37°C durante 10 minutos depois durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Nesta altura reuniram-se as misturas tetrâméricas mais uma vez, de modo a que os tetrâmeros 1 + 2 e 3 + 4 se combinassem conjuntamente e os tetrâmeros 5 + 6 e 7 + 8 se combinassem de igual modo. A cada uma destas duas misturas de ligação resultantes adicionaram-se mais 2 µl de

ATP 10 mM e 2 µl de ligase de T4 ADN. As misturas foram incubadas durante 10 minutos à temperatura de 37°C e em seguida à temperatura ambiente durante 1 hora.

Finalmente a ligação total foi reunida, isto é, o conteúdo de ambos os tubos foi adicionado em conjunto e em seguida a 8 µl de ligase e a totalidade da mistura foi incubada durante 10 minutos à temperatura de 37°C e em seguida toda a noite à temperatura de 4°C.

A seguir à ligação durante a noite analisou-se uma alíquota de 10 µl sobre gel de poliacrilamida a 8% com ureia 7M. Pôde visualizar-se uma banda adjacente ao par de bases 242 do marcador HpaII, que indicava que a ligação estava completa. Preparou-se um gel de poliacrilamida a 8% contendo ureia 7M. A mistura de ligação foi precipitada com etanol. Secou-se e extraíu-se com 80 µl de formamida a 80%. Carregou-se metade desta mistura de ligação num gel preparativo adjacente a uma camada que continha HpaII preparada com marcadores PBR332. Deixou-se o corante marcador de xilenocianol alcançar a base do gel. Em seguida retirou-se o gel do aparelho de electroforese e colocou-se numa cassete de filme junto a uma peça de filme "Kodak" de raio-x. Visualizaram-se as bandas mediante a revelação do filme e retirou-se uma tira de gel exactamente acima do marcador HpaII 242 na camada adjacente.

Esta tira continha uma banda de 244 pares de bases como se esperava, para a secção I completamente ligada do factor do crescimento de fibroblasto. Fez-se a extrusão desta tira de gel com uma seringa para um tubo de eppendorf, cobriu-se com uma solução de eluição de gel de Maxam Gilbert

4.

e incubou-se durante a noite à temperatura de 37°C. Filtrou-se em seguida o conteúdo do tubo através de um filtro de fibra de vidro, colocado numa seringa e extraíu-se o sobrenadante três vezes com N-butanol e precipitou no seio de etanol. Extraíu-se em seguida o grânulo seco com 200 µl de uma solução 10 mM de Tris-HCl e ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA) 1 mM, e precipitou-se novamente no seio de etanol após a eliminação do resíduo de poliacrilamida que se centrifugou no fundo do tubo. A amostra precipitada no seio de etanol continha cerca de 37 mil contagem/minuto que correspondiam a cerca de 1,5 pM de duplex com base na radioactividade que correspondia aos oligoméros necessários a esta ligação. Dissolveram-se em seguida estes 1,5 pM em 20 µl de tampão de ligação contendo 3×10^7 contagens/minuto de ATP rádiomarcado. Retirou-se uma amostra alíquota de 1/4 de µl e colocou-se em uma tira de DE81. Em seguida adicionou-se 1 µl de quinase e incubou-se o tubo à temperatura de 37°C durante 45 minutos.



QUADRO IV

OLIGOMEROS DE FGF, SECÇÃO II

- 17) 5' AATTCGGTACCTGGCTATGAAAGAAGACGGTCGTCTGCTGG 3'
- 18) 5' CTTCTAAGTGTGTTACTGACGAATGTTTCTTTTTCGAACG 3'
- 19) 5' TCTGGAATCTAACAACACTACAACACTTACAGATCTCGTAAA 3'
- 20) 5' TACTCTTCCTGGTATGTAGCTCTGAAACGTACTGGTCAGT 3'
- 21) 5' ACAAACTGGGTCCGAAGACTGGTCCGGGTCAGAAAGCTATCC 3'
- 22) 5' TGTTTCTGCCGATGTCTGCTAAATCTTAATAGCTCGAGA 3'
- 23) 5' GAAGCCAGCAGACGACCGTCTTCTTTCATAGCCAGGTACCG 3'
- 24) 5' CAGACGTTCCAAAAAGAAACATTTCGTCAGTAACACACTTA 3'
- 25) 5' ATGATTTACGAGATCTGTAAGTGTGTAGTTGTTAGATTC 3'
- 26) 5' TTGTACTGACCAGTACGTTTCAGAGCTACATACCAGGAAG 3'
- 27) 5' AAACAGGATAGCTTTCTGACCCGGACCAGTCTTCGGACCCAGT 3'
- 28) 5' AGCTTCTCGAGCTATTAAGATTTAGCAGACATCGGCAG 3'

Nesta fase retirou-se 1/4 µl do tubo e colocou-se em uma segunda tira de DE81. Eluíram-se ambas as tiras com formato de amônio 0,35 M e em seguida cortaram-se em secções e contaram-se em um contador de cintilação de líquido. Ambas as tiras, anterior e posterior, demonstraram com evidência que as contagens foram incorporadas na origem, portanto a reacção de quinação realizou-se até estar completa com a adição de 1 µl de ATP 10 mm e incubação durante mais 30 minutos à temperatura de 37°C. Em seguida aqueceu-se a mistura de quinação à temperatura de ebulição durante 5 mi-



nutos e deixou-se arrefecer lentamente até à temperatura ambiente.

Reunião da secção II do factor de crescimento de fibroblasto.

A reunião da secção II do factor de crescimento de fibroblasto foi feita de um modo idêntico. Mediram-se 200 pM de cada um dos 12 oligonucleotidos representados no quadro IV em tubos de eppendorf e secaram-se no vácuo. Repetiu-se a secagem com 10 µl de etanol a 80%. Preparou-se uma mistura de quinase contendo 24 µl de 10 x tampão de ligação, 2 µl de ATP rádiomarcado ($1,5 \times 10^7$ contagens/minuto/µl), 0,5 µl de ATP 10 mM, 20 µl de quinase e 193 µl de água, obtendo-se o volume total de 240 µl na mistura de quinase. Adicionaram-se 20 µl desta mistura a cada um dos tubos contendo os oligonucleotidos de 18 a 27, respectivamente, para serem submetidos à acção da quinase. Aos tubos que continham os oligonucleotidos 17 e 28 apenas se adicionou tampão de ligação. Em seguida incubaram-se os tubos durante 45 minutos à temperatura de 37°C retirando-se então alíquotas de 1/4 de µl de cada tubo e se colocaram em tiras de DE81. Em seguida as tiras de DE81 foram eluídas com formato de amónio 0,35M e analisaram-se com um contador de cintilação de líquidos para determinar o número de contagens na origem. A análise mostrou o prosseguimento da reacção de fosforilação. Neste momento, adicionou-se 1 µl de ATP 10mM a cada tubo e incubaram-se estes durante mais 45 minutos à temperatura de 37°C.

Os tubos foram submetidos a ebulição durante 5 minutos e foram em seguida centrifugados e reunidos de mo-

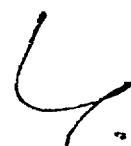
do a formar duplexes. Reuniu-se o oligonucleotido Nº 23 com o oligonuceotido Nº 17 (duplex 17), o Nº 24 com o Nº 18 (duplex 18), o Nº 25 com o Nº 19 (duplex 19), o Nº 26 com o Nº 20 (duplex 20), o Nº 27 com o Nº 21 (duplex 21) e o Nº 28 com o Nº 22 (duplex 22). Submeteve-se as misturas de duplex a ebulição e deixaram-se arrefecer lentamente até à temperatura ambiente por um período superior a 1 hora. Reuniram-se os duplexes para formarem tetrâmeros.

Reuniram-se duplexes Nºs 17 e 18 para formar o tetrâmero 17, os duplexes Nºs 19 e 20 para formar o tetrâmero 19, e os duplexes Nºs 21 e 22 para formar o tetrâmero 21. Estes foram circularizados à temperatura de 37°C durante 10 minutos. A cada mistura tetrâmérica adicionaram-se 2 µl de ATP 10 mM e 2 µl de ligase de T4 ADN .

Incubaram-se as três ligações durante a noite à temperatura de 4°C. Nesta altura retiraram-se alíquotas de 4 µl de cada um dos três tubos que continham os tetrâmeros e passaram-se no gel de poliacrilamida a 10% e eluiu-se com ureia 7M.

A autoradiografia do gel mostrou que a ligação se tinha processado. Reuniram-se os tetrâmeros 17 e 19 e adicionou-se 4 µl de ligase e depois 4 µl de ATP 10 mM.

As 8 partes de ligação foram em seguida incubadas à temperatura de 37°C durante 15 minutos e depois à temperatura de 4°C durante 6 horas antes de se adicionar o último tetrâmero à mistura de ligação. Então adicionou-se o tetrâmero 21 à mistura de ligação octamérica e incubou-se a totalidade da mistura de ligação à temperatura de 37°C durante 15 minutos. Adicionaram-se 5 µl de ligase e 5 µl de



ATP 10 mM e incubou-se a mistura resultante à temperatura de 37°C durante 15 minutos. Mais uma vez se adicionaram 5 µl de ligase e 5 µl de ATP 10 mM à mistura de ligação e incubou-se a totalidade da mistura de ligação durante a noite à temperatura de 4°C. Fez-se uma verificação de ligação completa em gel de poliacrilamida a 8% com incorporação de ureia 7M, que mostrou uma banda evidente com 242 pares de bases como se esperava. Extraíu-se a mistura de ligação com fenol, precipitou-se no seio de etanol antes de se carregar num gel preparativo carregou-se metade da mistura de ligação em gel com 7 mM ureia a 8% e visualizou-se o produto de 242 pares de bases por autoradiografia. Removeu-se e purificou-se o produto como se descreveu para a secção I para bFGF.

EXEMPLO 2

Clonagem e expressão de rb-bFGF

Sintetizou-se gene de b-bFGF em duas secções, como se descreveu no Exemplo 1. Clonou-se cada secção no M13mpl8 para verificação de sequência antes da reunião no vector de expressão pCEM1156. Na preparação da clonagem para a secção I, o M13mpl8 foi digerido com um excesso triplo de enzimas de restrição EcoRI e KbaI durante duas horas .

A reacção terminou por extracção com igual volume de fenol, seguida de extracção com clorofórmio e precipitação com 2,5 volumes de etanol. Lavou-se o grânulo de ADN com etanol, secou-se no vácuo e dissolveu-se em tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, a um pH 7,4. A ligação realizou-se por incubação de 0,06 pmole do vector M13mpl8 preparado como já

4.

descrito, com 0,3 pmole de FGF sintético-seção I em tris 50 mM, a um pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, ditiotretitol (DTT) 10 mM, espermidina 1mM ATP 1 mM 100µg/ml de albumina de soro bovina (ASB) e 1 unidade de T4 ligase, durante 4 horas à temperatura de 14°C.

Modificaram-se as células hospedeiras de E. Coli JM109 para se tornarem competentes, por centrifugação das células no seio de uma cultura em desenvolvimento exponencial, suspensão em CaCl₂ 50 mM arrefecido em gelo a uma concentração de 1,2 D.O./ml, durante 20 minutos, seguida de recentrifugação e re-suspensão das células na mesma solução com uma concentração de 12 D.O./ml.

Adicionaram-se as alíquotas da mistura de ligação (0,1-10 µl) a 200 µl de alíquotas das células hospedeiras competentes e deixou-se em repouso sobre gelo durante 40 minutos. Adicionou-se em seguida o conteúdo de cada tubo a 200 µl de E. Coli JM109 recente, 3 ml de agar de Lúria fundido a 0,7% contendo 10 µl de isopropil-β-D-tio-galactopiranosido (IPTG) 100 mM e 50 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (x - gal) a 2%. Colocou-se esta mistura numa placa de luria e incubou-se durante toda a noite à temperatura de 37°C.

Retiraram-se quatro das placas límpidas resultantes e incubaram-se em culturas de 10 ml utilizando como estirpe hospedeira JM109. Preparou-se o ADN fágico de cadeia simples a partir destas culturas e fez-se a sua sequência pelo método de didesoxi utilizando o iniciador universal M13. Um destes quatro ADN tinha a sequência desejada e foi recuperado para reunião do gene de rb-bFGF no vector de ex-

pressão.

A secção II do gene b-bFGF manufacturado foi clonada no M13mpl8 para sequenciação utilizando-se o mesmo método que se descreveu para a secção I. Neste caso o vector M13mpl8 foi dissolvido com EcoRI e com HindIII (3 vezes em excesso) afim de se adaptarem as extremidades viscosas da secção II. Para a ligação misturaram-se 0,025 pmole do vector M13mpl8 com 0,075 pmole da secção II de FGF sintético fosforilado e incubou-se durante 4 horas à temperatura de 14°C como havia sido feito anteriormente.

A transformação que utilizou o mesmo método de CaCl_2 resultou em placas límpidas como para a secção I mas, uma vez que um elevado substracto das placas límpidas estava presente nas placas de controlo, realizou-se uma selecção posterior por hibridização. Diversas placas desenvolveram-se utilizando o hospedeiro JM109 como foi descrito anteriormente e os sobrenadantes que continham o ADN fágico foram colocados em filtros de nitrocelulose.

Fez-se uma radiomarcacção dos oligonucleotidos N^os 18 e 24 utilizados na sintese da secção II com ^{32}p -ATP utilizando quinase polinucleotídica para servir de sonda nestes filtros. Seleccionaram-se dois clones avaliados como positivos e sequenciaram-se como anteriormente. Um destes clones apresentava a sequência esperada e foi utilizado para a reunião do gene no pCFM1156.

EXEMPLO 3

Reunião do gene de rb-bFGF no vector de expressão pCFM1156.

Prepararam-se clones M13 e ADN sob a forma



replicativa de dupla cadeia para as secções I e II. Desenvolveram-se 500 ml de cultura de cada fago no hospedeiro JM109 e recolheram-se as células por centrifugação. Em seguida as células foram resuspensas em sacarose a 15%, tris 0,05M, EDTA 0,05M e 1 mg/ml de lisozima e incubaram-se em gelo durante 25 minutos. Adicionou-se RNase a 0,1 mg/ml e continuou-se a incubação sobre gelo durante mais 10 minutos. Adicionou-se um volume igual de triton x-100 a 0,1%, tris 50 mM, EDTA 50 mM e continuou-se a incubação sobre gelo durante mais 10 minutos. Estes lisatos foram em seguida centrifugados durante 1 hora a 39.000G e guardou-se o sobrenadante transparente. Adicionou-se brometo de etídio a 1 mg/ml e cloreto de céssio para se obter uma densidade de 1,55 g/ml. Centrifugou-se esta solução durante 18 horas a 45.000R.p.M. em um rotor VTi-50 afim de se alcançar o equilíbrio. Visualizou-se a banda de ADN em super-hélice de cada tubo por U.V. e recolheu-se com uma seringa. O brometo de etídio foi facilmente eliminado por extracção com butanol e o cloreto de céssio foi retirado por diálise extensa tris 10 mM e EDTA 0,1 mM. Os stocks de ADN preparados por via foram utilizados para posterior formação de clones.

Ainda que se possam utilizar numerosos vectores para exprimir este ADN, o vector de expressão que possui um promotor regulado e um gene de controlo do número de cópias induzível pela temperatura é o preferido, permitindo maximizar o rendimento do produto.

O plasmídeo de expressão pCFM1156 utilizado neste exemplo pode ser facilmente construído a partir do plasmídeo pCFM836, construção esta que está descrita no pedido

4.

de patente de invenção europeia Nº 136.490, publicado. Conta-se primeiro o vector pCFM836 com NdeI e em seguida as extremidades são partidas com T4 polimerase de forma a que sejam destruídos ambos os sítios de NdeI. Em seguida dissolve-se o vector com ClaI e SacII para retirar o poli-adaptador existente antes da ligação com o poli-adaptador substituído como está representado no quadro V. Este poli-adaptador substituto pode ser construído de acordo com a metodologia de Alton et al, supra.

O controlo de expressão no plasmídeo de expressão pCFM1156 faz-se por meio de um promotor P_L lambda encurtado que está ele próprio sob o controlo de um gene repressor C_{I857} , como é proporcionado através da estirpe de E. Coli K12 Δ Htrp.

Dissolveu-se o vector de expressão pCFM1156 com um excesso duplo de XbaI e de HindIII na preparação da ligação com as secções I e II de FGF. Os stocks de ADN das secções I e II, preparados como foi descrito anteriormente, dissolveram-se com um excesso de duas vezes quer de XbaI quer de KpnI (secção I) ou KpnI e HindIII (secção II). Impregaram-se as três soluções resultantes da diluição num gel de agarose de baixo ponto de fusão, fusão a 1,2% preparado com tris-acetato 50 mM e submetidos a electroforese durante 3 horas a 60 volts. Corou-se o gel com 1 μ g/ml de uma solução de brometo de etídio e visualizaram-se as bandas por U.V..

A banda de vector linearizado e as bandas das secções I e II de FGF foram excisadas do gel com um escalpelo colocadas em tubos separados e fundidas à temperatura de



70°C durante 15 minutos . Adicionou-se 5 microlitros do gel fundido que continha o vector linearizado a 10 µl de cada uma das secções I e II contidas no gel fundido e equilibrou-se a mistura a 37°C. Misturou-se rápidamente o gel fundido com igual volume de 2x tampão de ligase arrefecido em gelo contendo ATP 2 mM e 0,5 unidades de T4 ligase e incubou-se durante toda a noite à temperatura de 14°C. Transformaram-se as alíquotas desta mistura de ligação em a estirpe hospedeira E. Coli FM6 competente congelada, utilizando o protocolo de transformação descrito por Hanahan; "J. Mol. Biol!" 166, 1983, p. 557-580, desenvolvidas durante 2,5 horas para permitir a expressão da resistência à canamicina e colocaram-se em placas de Lúria contendo 20 µg/ml de canamicina. Incubaram-se placas durante a noite à temperatura de 28°C. As colónias foram novamente colocadas em placas em filtros de nitrocelulose e reservou-se a placa principal. As colónias nos filtros desenvolveram-se até cerca de 1 mm de diâmetro à temperatura de 28°C e em seguida, colocaram-se durante a noite, à temperatura de 37°C para aumentar o número de cópias do plasmídeo. Os filtros foram sondados por hibridização com o oligonucleotido 18 radiomarcado (da síntese do gene) à temperatura de 65°C em 6x tampão de citrato e solução de cloreto de sódio padrão (SSC, NaCl 0,15 M, citrato de sódio 0,015 M).

Seleccionaram-se 4 dos 25 clones positivos obtidos e desenvolveram-se em culturas de 500 ml. Preparou-se o ADN de forma replicativa como foi já descrito para as secções I e II utilizado o processo de lisados purificados seguido de centrifugação em gradiente de densidade de equilí

4.

brio de cloreto de césio. Sequenciaram-se estes 4 clones directamente utilizando vectores de expressão de dupla cadeia como matriz para as reacções de sequenciação de didesoxi e verificou-se que os 4 clones tinham a sequência correcta. Um destes clones foi escolhido para ser utilizado na expressão de rb-bFGF e posteriormente referido como pCFM1156/bFGF. a sequência de ADN para o gene de rb-bFGF construída deste modo em um vector pCFM1156/bFGF encontra-se representado no quadro I

4.

Quadro V

1 ATCGATTTGATTCTAGAAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGGTACCAT
TAGCTAAACTAAGATCTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGCCATGGTA

1 Clal, 12 XbaI, 29 NdeI, 35 HincII, HpaI, 39 MluI,
47 EcoRII, 53 HgiCI KpnI, 57 NcoI StyI,

61 GGAAGCTTACTCGAGGATCCGCGGATAAATAAGTAACGATCC
CCTTCGAATGAGCTCCTAGGCGCCTATTTATTCATTGCTAGG

63 HindIII, 70 AvaI XhoI, 75 BamHI Xho2, 79 Sac2

4.

EXEMPLO 4

Expressão e purificação de rb-bFGF.

Expressão

Uma cultura de toda uma noite da estirpe de produção desenvolveu-se à temperatura de 28°C em caldo de Lúria (caldo de Luria: bactotripton 10 g/l; extracto de levedura 5 g/l; NaCl 5 g/l) contendo 20 µg/ml de canamicina que se utilizou para inoculação de um lote de fermentação de 8 l. O meio do lote de 8 l continha 40 g de extracto de levedura, 40 g de glicose, 10 g de cloreto de sódio e sais de tampão apropriados, solução de vitaminas e oligoelementos. Utilizou-se um protocolo de alimentação duplo. A carga inicial (1 l) continha 450 g de glicose mais os sais e vitaminas apropriados. Após o desenvolvimento para uma D.O. = 20 iniciou-se uma segunda carga com um débito de ordem dos 200 ml/hora e a temperatura foi alterada para 42°C. Esta solução de carga continha 200 g/l de bacto-triptona, 100 g/l de extracto de levedura e 100 g/l de glicose. O desenvolvimento foi prolongado durante 6 horas à temperatura de 42°C até ser alcançada uma concentração celular atingindo uma D.O. = 50 no momento na recolha.

Purificação

Desagregaram-se células de E. Coli em água por meio de um homogeneizador de Gaulin e centrifugaram-se a 4,2 k durante 40 minutos com uma centrifugadora J.6 B..

Quando se fez a análise por SDS-PAGE, apareceu quer no centrifugado quer no sobrenadante rb-bFGF, sendo



a proteína presente no sobre-nadante da ordem dos 60% a 70% . O centrifugado foi portanto retirado e purificou-se o sobre-nadante por cromatografia de permuta iônica. Após a correção do pH para 7,4 com tris-base, adicionou-se DTT 1mM ao sobrenadante e misturou-se com uma resina de carboximetil celulose-Sepharose® (CM-Sepharose®, Pharmacia, Uppsala, Suécia), equilibrada com 40 mM tris-HCl/1 mM DTT/pH 7,4. Em seguida lavou-se a resina com porções mesmo tampão e eluiu-se a coluna com gradiente de NaCl linear desde 0 a 0,7 M.

Por análise SDS-PAGE reuniu-se um único pico com cerca de 0,5 M. Titulou-se para um pH 8,2 com tris-base, diluiu-se três vezes com água arrefecida e colocou-se sobre uma coluna de CM-Sepharose em 40 mM tris-HCl/1 mM DTT/pH 8,2. Lavou-se a coluna com NaCl 0,15 M e eluiu-se com gradiente de NaCl linear de 0,15 M a 0,5 M. Reuniu-se entre dois pequenos picos o pico principal e encontrou-se aproximadamente 95% de pureza com uma pequena quantidade de dímero quando se analisou por SDS-PAGE não redutora.

Titulou-se imediatamente o conjunto para um pH de aproximadamente 5 com acetato de sódio 1M/pH 4 para impedir que o produto de rb-bFGF fosse oxidado e em seguida colocou-se em uma coluna de Sephadex G-75 e eluiu-se com citrato de sódio 20 mM/NaCl 0,1M/pH 5, fornecendo um único pico durante a eluição entre um patamar (que corresponde ao dímero) e um pequeno pico dos compostos menores tal como o DTT. Reuniram-se as frações do máximo e conservaram-se à temperatura de 4°C, -20°C ou liofilizaram-se. O rendimento nesta filtração em gel foi de cerca de 100%. Obteve-se aproximadamente 160 mg de rb-bFGF a partir de 560 g da pasta celular.

Quadro VI

Factor do crescimento de fibroblasto básico humano/sequência peptídica

1	10	20
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp		
	30	40
ProLysArgLeuTryCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg		
	50	60
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu		
	70	80
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp		
	90	100
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu		
	110	120
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys		
	130	140
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe		
146		
LeuProMetSerAlaLysSer		

EXEMPLO 5

Caracterização do rb-bFGF.

Examinou-se a actividade do rb-bFGF mediante a incorporação de ^3H -timidina em células 3T3 . Todas as preparações, conservadas à temperatura de 4°C , e -20°C e liofilizadas exibiram uma actividade dependente da dose, com a concentração de proteína compreendida entre 20 e 210 pg/ml para uma actividade semi-máxima dependente da estirpe particular de células 3T3 utilizadas no ensaio.

Características gerais do produto final

Relação 280/260	— $\sim 2,0$
ensaio de endotoxina LAL	— $< 0,6 \text{ UI/ml (0,623 FGFmg)}$
ADN	— $< 20 \text{ pg/ml (0,623 FGF mg)}$
coeficiente de extinção (278 nm)	— 1,3 para proteína a 0,1%
pureza	— $> 95\%$

Estabilidade

Quando se incubou uma preparação de rb-bFGF à temperatura de 4°C a diferentes valores de pH, o rb-bFGF exibiu a formação de polímeros compostos por mais de uma molécula de bFGF a um pH $\geq 6,0$ devido às ligações disulfureto inter-cadeia e à degradação a um pH $\leq 4,0$ devido à instabilidade ácido da ligação Asp-Pro.

Baseado nesta informação, escolheu-se um tampão de pH 5. Estes dados de estabilidade sugeriram que os grupos sulfidrílo livres presentes no produto final tendem

a formar, de preferência, inter-cadeias em vez de intra-cadeias, de ligações di-sulfureto. A preparação de rb-bFGF é aparentemente monomérica quando determinada por meio de filtração em gel de Sephadex G-75.

EXEMPLO 6

Caracterização estrutural de rb-bFGF

Examinou-se a proteína rb-bFGF purificada, preparada como se encontra descrito no Exemplo 4, para a análise conformacional, utilizando a titulação do sulfidrilo dicromismo circular (D.C.) e filtração por gel. Também se estudaram os resíduos de cisteína na molécula através do mapa peptídico e da análise da sequência.

Métodos

Obteve-se ureia ultra-pura da Scharz/Mann (Cleveland, Ohio) e ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) da Sigma Chemical Company (St Louis, Missouri). Purificou-se o b-bFGF recombinante a partir de células E.Coli como se descreveu no Exemplo 4.

Em 12 ml de rb-bFGF a 0,626 mg/ml em citrato de sódio 20 mM, NaCl 0,1 M, a um pH 5 adicionou-se 1,5 ml de ácido iodoacetoacético 0,5 M em tris-HCl 1 M, a um pH 8,2 (55 mM final) e em seguida acertou-se para um pH 8,2 com tris-base saturado. Deixou-se a mistura em repouso durante 12 horas à temperatura ambiente e em seguida foi dialisada contra citrato de sódio 20 mM arrefecido e NaCl 0,1 M, a um pH 5,0. Após diálise exaustiva, concentrou-se a solução de proteína e centrifugou-se para eliminar vestígios de precipitado. Realizou-se a titulação dos grupos sulfidrilo utili-

zando DTNB essencialmente de acordo com Habeeb, "A.F.S.A."; 25 Methods. Enzymol. p. 457-465, 1972.

A filtração por gel foi realizada em uma coluna de Sephadex[®] G-75 (2,5 cm x 10 cm, Pharmacia, Uppsala, Suécia) e usou-se como eluente citrato de sódio 20 mM, NaCl 0,1 M, a um pH 5,0 com um débito de 1 ml/minuto. Calibrou-se a coluna com mioglobina (17.000) e albumina de soro bovino (68.000).

Determinou-se a concentração proteica por espectrofotometria.

O espectro de absorção no U.V. foi determinado em um espectrofotômetro de diodo de Hewlett-Packard modelo 8451A.

Determinaram-se os espectros dicróicos circulares à temperatura ambiente em um espectropolarímetro Jasco modelo J.-500C, equipado com um computador OKi If 800 modelo 800. As medições realizaram-se à temperatura ambiente com cuvetes de 1 cm e de 0,02 cm no U.V. próximo e longínquo respectivamente. Os dados foram expressos sob a forma da elipticidade residual média $[\theta]$ calculada utilizando o peso residual médio de 112 para bFGF.

Realizaram-se dissoluções com tripsina durante 4 horas à temperatura de 37°C em carbonato de hidrogénio e amónio 0,1 M, a um pH 8,0, utilizando tripsina tratada com tosilfenilalanil-clorometil-cetona (Cooper Biomedical, Malvern, Pennsylvania). A concentração de rb-bFGF era de 0,5 mg/ml, com uma relação enzima substrato de 1:50.

Construiu-se o mapa peptídico por cromatografia líquida de fase inversa de alta resolução utilizando

uma coluna Vydac C4 (214TP54) (Vydac, Hesperia, California) com um débito de 0,8 ml/minuto.

O gradiente variou de 0% de tampão A (0,1% de ácido trifluoroacético [TFA]/água) a 50% de tampão B (0,1% TFA/90% acetonitrilo/água) com um gradiente linear de 90 minutos. Injectaram-se as amostras sob o controlo de um auto-analisador Wisp[®] (Waters Corporation, Milford, Massachusetts). Recolheram-se as fracções por detecção automática do máximo controlada a 220 nm.

Realizou-se a análise da sequência em instrumentos da Applied Biosystems (Foster City, CA) modelos 470A e 477A. No instrumento 470A utilizou-se um reagente modificado R2 (Lai; "Anal. Chim. Acta"; 163; 1984; p. 243-248).

Resultados

As titulações do sulfidrilo realizaram-se utilizando uma preparação de rb-bFGF purificado. Quando se titulou com DTNB uma amostra obtida por diálise de rb-bFGF versus tris-HCl 0,1 M, a um pH 8,0, contendo EDTA 1,5 mM, a mistura exibiu uma dispersão de luz que tornou as medições de absorção impossíveis. Por isso diluiu-se a amostra de rb-bFGF dialisada com quatro volumes de cloridrato de guanidínia 6M (GdnHCl) em tris-HCl 0,1 M, EDTA 1,5 mM, a um pH 8,0, imediatamente seguido de titulação com DTNB. A titulação desta amostra demonstrou a existência de aproximadamente 2,5 moles de sulfidrilo livre por molécula.

As experiências de titulação com DTNB foram também realizadas com o rb-bFGF reduzido. Assim, realizou-se primeiro o rb-bFGF em tris-HCl 0,1 M, EDTA 1,5 mM, a um



pH 8,0 com DTT 50 mM. Após 2 horas de incubação, o rb-bFGF reduzido precipitou com ácido trifluoroacético a 5% (TCA) e lavou-se o grânulo resultante três vezes com TCA a 5%. Lavou-se o grânulo final com uma pequena quantidade de água e solubilizou-se a proteína com GdnHCl 6M em tris-HCl 0,1 M, EDTA 1,5 mM, a um pH 8,0, seguido imediatamente de titulação com DTNB. Isto resultou na detecção de aproximadamente 4 moles de sulfidrilo livre por cada molécula de rb-bFGF reduzido. Este resultado associado com cerca de dois grupos de sulfidrilo livres detectáveis na amostra não reduzida sugeriu que a preparação de rb-bFGF tem dois grupos sulfidrilo livres e que as outras cisteínas formam uma ligação dissulfureto que pode ser rapidamente clivada sem desnaturantes.

As titulações de sulfidrilo também se realizaram com rb-bFGF S-carboximetilado (S-CM). A amostra de rb-bFGF S-CM foi dialisada vs. tris-HCl 40 mM, a um pH 7,5 e tratada com DTT 100 mM durante a noite. O rb-bFGF S-CM dialisado com TCA a 5% analisado para detecção dos grupos de sulfidrilo livres como já foi descrito. Os resultados mostram 2 moléculas de sulfidrilo livres por cada molécula de rb-bFGF S-CM indicando que este tem dois grupos sulfidrilo livres após redução. Isto sugere que o rb-bFGF tem dois grupos sulfidrilo livres que tinham sido carboximetilados.

Utilizou-se o desenho do mapa peptídico para investigar se as duas cisteínas estavam envolvidas em uma ligação dissulfureto e se ambas estavam num estado reduzido livre. A dissolução com tripsina foi utilizada para isolar as cisteínas dos três péptidos: 24-27 que continham cis-26; 68-73 que continham cis-70; e 88-93 que continham cis-88 e

4.

cis-93.

A assimilação com tripsina foi realizada sobre rb-bFGF natural não reduzido e sobre S-CM rb-bFGF não reduzido. A seguir à digestão os péptidos produzidos foram separados por HPLC de fase inversa e compararam-se os mapas peptídicos (fig. 5). A introdução do grupo acetato num péptido que continha cisteína previu-se que tornaria o péptido mais hidrofílico e que eluiria mais rapidamente num gradiente de HPLC de fase inversa.

Na fig. 5 observa-se que os dois picos de péptido estão alterados para tempos de eluição menores no S-CM rb-bFGF relativo ao rb-bFGF natural. Um pico alterou-se de 25 minutos para 16 minuto e o outro 57 minutos para 53 minutos. Estes picos foram recolhidos e identificados por análise de sequência. A sequência do péptido eluíu aos 25 minutos, foi determinada e verificou-se que correspondia ao péptido triptico 68 a 73. Este péptido continha cis-70. Uma vez que este péptido forneceu um único pico, presumiu-se ser uma das cisteínas que não estavam envolvidas na ligação de dissulfureto.

A sequência do péptido eluíu aos 53 minutos e forneceu duas sequências. Dado que um único pico nesta região alterada na carboximetilação e que o péptido contido nesta região originou duas sequências, considerou-se este como sendo o péptido que continha a ligação di-sulfureto. A comparação das duas sequências obtidas do pico aos 53 minutos com a sequência de FGF completa indicou que estas duas sequências constituintes correspondiam aos péptidos de 24 a 27 e de 88 a 98.



Existem três cisteínas nestes dois péptidos. A identificação da carboximetilcisteína feniltionidantoína no primeiro ciclo sequência indicou cis-28 como sendo a outra cisteína e sugeriu que existia uma ligação di-sulfureto entre a cisteína 26 e a cisteína 93.

O S-CM rb-bFGF foi analisado em células 3T3 tal como se encontra descrito no Exemplo 8.

Os resultados mostraram que o S-CM rb-bFGF exibe uma actividade comparável à da molécula natural demonstrando que os grupos sulfidrílo livres na molécula não são necessários à actividade mitogénica nas células 3T3.

Os espectros dicróicos circulares foram obtidos com rb-bFGF em citrato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,1 M, a um pH 5,0.

Os resultados encontram-se representados na fig. 6. O DC no U.V. próximo mostra elipticidades negativas intensas com uma quantidade de máximos. Estes máximos a 262 e 269 nm são devidos a resíduos de fenilalanina e o máximo a 275 nm provém provavelmente da absorção da tirosina (Strickland, 2d CRC Crit. Rev. Biochem. p. 113-175, 1974). Uma elipticidade negativa larga pode ser observada de 306 nm até 290 nm a qual se sobrepõe então ao DC aromático. Esta banda de DC é provavelmente devida a um dissulfureto que usualmente apresenta um pico a cerca de 240 a 250 nm. Assim o DC do U.V. próximo observado de rb-bFGF pode ser caracterizado como um largo DC de dissulfureto negativo e diversos sinais de DC aromático. Estes resultados indicam que os resíduos aromáticos estão nas proximidades assimétricas rígidas e que o rb-bFGF possui uma estrutura terciária. (Timasheff,

4.

Vol. II In the Enzymes, Boyer (ed.) p. 371-443, 1970).

O S-CM rb-bFGF foi também observado por DC. Os resultados mostraram que os espectros de U.V. próximo e U.V. afastado são idênticos aos da proteína natural indicando que a S-carboximetilação dos dois grupos sulfidrilo livres não afecta, aparentemente. As estruturas secundária e terciária da proteína. Este facto é consistente com a observação de que a S-carboximetilação não afecta a actividade da proteína.

O DC no U.V. distante, representado na fig. 6, exhibe um espectro típico para a estrutura não ordenada (Greenfield and Fasman, "Biochemistry" 8, 1969; p. 4108-4116). O espectro exhibe um pico negativo a 202 nm e um pico largo positivo a cerca de 225 nm. O pico a 202 nm e a maior parte das elipticidades não negativas entre 205 e 220 nm são características típicas de estruturas secundárias não ordenadas. O pico positivo a 225 nm é devido provavelmente à contribuição das β -rotações (Chang et al, "Anal. Biochem.", 91; 1978, p. 13-31). Portanto o polipéptido de rb-bFGF parece desordenado mas dobrado em uma estrutura terciária distinta com β -rotações.

A filtração no gel de rb-bFGF em citrato de sódio 20 mM, NaCl 0,1M, a um pH 5,0 mostrou que a proteína elui com o mesmo volume de eluição da mioglobina (17000).

Uma vez que o peso molecular de bFGF (16.000) é menor do que o da mioglobina o resultado da filtração no gel sugere uma conformação ligeiramente assimétrica da proteína.

4.

EXEMPLO 7

Bioensaio HUV-EC para rb-bFGF

Judith A. Berliner isolou pelo método de Gimbrone et al; Human Vascular Endothelial Cells in Culture; "J. Cell. Biol." 60, 1974, p. 673-684, células endoteliais da veia umbilical humana (EVUH), que foram utilizadas nesta experiência.

Mantiveram-se as células por sub-cultura em frascos de cultura cobertos com gelatina a 0,1% em tampão de cloreto de sódio tamponado com fosfato e 10 µg/ml de fibronectina (Boehringer Mannheim, Ingelheim, Alemanha Ocidental) em meio de soro bovino fetal menos, durante 30 minutos cada consecutivamente. As células foram libertadas com 0,0125% de tripsina-0,005% EDTA e passadas 1:2 ou 1:3 uma vez por semana. O meio de manutenção utilizado foi MCB105 (Irvine Scientific, Irvine, California) com penicilina G (10 unidades/ml) estreptomicina (1 µg/ml), soro bovino fetal (20% hyclone) L-glutamina (2 mM), piruvato de sódio (1 mM), heparina (4 µg/ml, 170 unidades/mg) e suplemento de desenvolvimento de célula endotelial (SDCE, 40 µg/ml Collaborative Research). As células desenvolveram-se numa incubadora com 2% de CO₂.

A seguinte experiência foi realizada para comparar a manutenção do crescimento e actividades mitogénicas destas três diferentes formas de FGF em células endoteliais HUV:

- 1) E. Coli proveniente de FGF básicos de bovino recombinante (rb-bFGF);

2) FGF ácido de bovino (b-aFGF, especialmente purificado proveniente de cérebro de bovino); e

3) FGF básico natural de bovino (bFGF purificado, proveniente de glândulas pituitárias de bovino, Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri).

Colocou-se numa placa uma centena de células por cavidade em oito cavidades centrais em placas de 24 cavidades. Adicionou-se um destes três factores de desenvolvimento de fibroblastos anteriormente já identificado, a cada cavidade, excepto às cavidades de controlo às quais não se adicionou qualquer factor de crescimento. As células foram alimentadas aos três e seis dias após o início da sementeira com o mesmo factor de crescimento. Dez dias após a sementeira analisaram-se as culturas por coloração com violeta de cristal.

Os resultados, representados no quadro VII, demonstraram que existiam 20% e 32% mais colónias nas oito cavidades que continham rb-bFGF do que nas cavidades que continham quer aFGF quer bFGF natural respectivamente. Também tem interesse o facto de que 75% do total das colónias que cresceram na cultura com rb-bFGF eram de 0,5 mm ou maiores, enquanto que apenas 55% e 51% das colónias desenvolvidas com aFGF e com n-bFGF respectivamente apresentavam aquele tamanho.

Quadro VII

<u>Factor de</u> <u>crescimento</u>	<u>Nº. de colónias/</u> <u>/8 cavidades</u>	<u>Nº. de colónias $\geq 0,5$mm/</u> <u>/8 cavidades</u>
rb-bFGF	351	265
aFGF	293	160
bFGF natural	265	134
Controlo	8	0

EXEMPLO 8

Bio-ensaio de rb-bFGF em células NIH 3T3

As células utilizadas para este ensaio foram as NIH 3T3 da ATCC. As células desenvolveram-se em um meio DME com penicilina G (10 µg/ml), estreptomicina (10 µg/ml) e com soro de vitela (10%).

As células foram passadas 1:40, duas vezes por semana. No 1º dia do ensaio juntou-se tripsina às culturas sub-confluentes dispersaram-se e colocou-se em placas de 24 cavidades com uma concentração de 2×10^4 células por ml, 1 ml por cavidade no meio de crescimento referido antes.

No 5º dia substituiu-se o meio por DME contendo penicilina, estreptomicina e 5% de plasma humano pobre em plaquetas (soro heparinizado límpido), 1 ml por cavidade. No 6º dia adicionaram-se as amostras de experiência e de controlo de FGF ao meio em volumes inferiores a 100 µl.

Dezoito horas depois, passaram-se as células durante 1 hora com 1 ml de DME contendo 5% de soro de vitelo e 2 µCi de ^3H -Me-timidina à temperatura de 37°C. Lavaram-

-se em seguida as células uma vez com 1 ml de tampão de cloreto de sódio tamponado com fosfato (PBS) e ácido tricloroacético a 5% ambos à temperatura de 4°C. Deixaram-se as placas a secar ao ar durante 30 minutos, após o que se adicionou a cada cavidade 1 ml de hidróxido de sódio 0,25 M. Após uma hora à temperatura ambiente, transferiu-se o conteúdo de cada cavidade para uma ampola de contagem separada contendo 10 ml de Aquasol[®] II (New England Nuclear, Boston, Massachusetts). As amostras foram contadas durante 1 minuto através de uma janela 0-397 de um contador de cintilação Beckman LS 7.500 (Beckman Instruments, Inc. Fullerton, California).

Os padrões de b-bFGF recombinante foram preparados a partir de um stock com uma concentração de 600 µg/ml em um tampão de citrato de sódio de pH 5.

A escala de padrões utilizada foi desde 5 pg até 1.000 pg por ml. O padrão de menor concentração que apresentou a absorção de ³H-timidina máxima era de 500 pg. Uma média entre 140 e 200 pg exibiu a incorporação semi-máxima de timidina marcada.

EXEMPLO 9

Construção do gene de rh-bFGF

A conversão do gene de bovino bFGF preparada de acordo com o Exemplo 1, para um gene que codifica para h-bFGF foi realizada por oligo-mutagénese de sítio dirigido.

O segmento a ser modificado foi primeiramente clonado no vector fágico M13mpl8 e transformado na E. Coli Jm101 para desenvolvimento e preparação de ADN fágico de ca-

4.

deia simples (Messing; "J. Vol." 9, "Nucl. Acid. Res."; 1981, p. 309-321).

Misturou-se aproximadamente 0,5µg da matriz de ADN com 5 pmoles de sequenciador de iniciação de M13 universal e 5 pmoles de cada iniciador mutagénico e aqueceu-se até à temperatura de 65°C durante 3 minutos e deixou-se arrefecer lentamente. Misturou-se depois a matriz-iniciadora circularizada com ATP, uma mistura de desoxinucleotido-trifosfato (dNTP), ADN polimerase I (ADN PolI) em fragmentos grandes (fragmento de Klenow) e ligase, seguido de incubação a 15°C durante 4 horas.

As alíquotas desta mistura reaccional foram transformadas nas células de E. Coli JM101 competentes e colocadas em placas de agar Lúria a 0,7%.

As placas que continham o fage mutante foram seleccionadas por hibridização de filtros de nitrocelulose com iniciador mutagénico marcado com p³². Preparou-se o ADN de cadeia simples a partir de placas de sondagem positiva e verificou-se a sua sequência utilizando o método de terminação de cadeia didesoxi. As alterações de aminoácido feitas e os iniciadores mutagénicos correspondentes utilizados foram:

pro-129 a ser-129) 5' GACCAGTCTTCGAACCCAGTTTGTA 3'

ser-113 a thr-113) 5' CATACCAGGAAGTGTATTTACGAGA 3'

Os iniciadores correspondiam à cadeia de sentido contrário à do gene de bFGF.

4.

EXEMPLO 10

Purificação de rh-bFGF

Desenvolveram-se células de E. Coli que continham os genes de h-bFGF sintéticos em pCFM1156, como se descreveu anteriormente no Exemplo 4. Após fragmentação das células e centrifugação a baixa velocidade, encontrou-se nas frações de sobrenadante e de centrifugado o rh-bFGF resultante (Quadro VI). A purificação do centrifugado requeria a solubilização por agentes desnaturantes seguida de reconversão para se obter o material activo. Estas fases podem ser evitadas através da purificação da fração sobrenadante como se descreve a seguir. Aplicou-se esta fração a uma coluna de CM-sefarose em tris-HCl 40 mM, pH 7,4 e eluiu-se com gradiente de cloreto de sódio linear. As frações que continham rh-bFGF foram em seguida ligadas à mesma resina, mas em tris-HCl 40 mM, pH 8,2 e outra vez eluídas com gradiente de NaCl linear. Nestas duas cromatografias incluiu-se DTT 1 mM para impedir a oxidação que de outra forma resultaria na formação de pontes dissulfureto intermoléculares. A proteína foi ainda purificada por filtração em gel utilizando uma coluna de Sephadex[®] G-75 (Pharmacia, Uppsala, Suécia) em citrato de sódio, 20mM, NaCl 0,1 M, pH 5,0. As tentativas iniciais para purificar rb-bFGF a partir de células de E. Coli mostraram que o dímero se formaria facilmente quando não se incluía DTT 1 mM durante o processo de purificação. A purificação de bFGF humano realizou-se essencialmente do mesmo modo, como se realizou para o material bovino, tal como foi indicado no Exemplo 4. Não se notou diferença alguma entre rh-bFGF

4.

em qualquer das fases de purificação. Quando examinado em SDS-PAGE, em condições redutoras o rb-bFGF forneceu uma banda principal de 16.500 daltons que correspondia ao peso molecular monomérico e bandas correspondentes a pesos moleculares mais elevados, os quais provavelmente representavam formas diméricas e tetraméricas (ver fig. 4). Quando se ensaiou em condições não redutoras, apresentou-se uma maior contaminação por bandas de peso molecular mais elevado. A análise de sequência de aminoácidos do rh-bFGF purificado, revelou que a metionina tinha sido separada da maior parte do material fornecendo 70% de prolina, 13% de alanina e apenas 17% de metionina no N-terminal.

Tal como o bFGF natural, o rh-bFGF exhibe uma acentuada afinidade para a heparina que eluía das colunas de sepharose com heparina no NaCl aproximadamente de 1,5 a 2,0 molar (dados não representados).

EXEMPLO 11

Caracterização do rh-bFGF

Examinou-se a actividade do rh-bFGF pela incorporação de ^3H -timidina em células 3T3, como se encontra descrito no Exemplo 8. Tal como se representa na fig. 3, o rh-bFGF mostrou uma potência essencialmente idêntica, neste ensaio, à do rb-bFGF, produzindo uma semi-estimulação máxima da síntese de ADN a uma dose de cerca de 150-200 pg/ml.

EXEMPLO 12

Bio-ensaio de HUV-EC para rh-bFGF

O ensaio de células EVUH está descrito no

Exemplo 7, com alterações menores no que respeita à colocação em placas e ao tempo de ensaio. A adição de rh-bFGF resultou em uma extensa proliferação celular em comparação com os controlos que não continham o factor de crescimento. Não se observaram quaisquer diferenças significativas entre o bFGF bovino recombinante e o bFGF humano.

Quadro VIII

<u>Factor de crescimento</u>	<u>Total de colónias</u>	<u>Colónias grandes</u>
rh-bFGF	76	22
rb-bFGF	68	19
controlo	23	0

Todos os factores do crescimento de fibroblastos foram adicionados com uma concentração de 10 ng/ml no momento em que se colocaram em placas e nos dias 3 e 6 após essa colocação. Coraram-se as células e contaram-se no 9º dia. Registaram-se as clónias maiores do que 0,5 mm de diâmetro como colónias grandes.

EXEMPLO 13

Preparação de análogos de rh-bFGF

A fim de melhorar a estabilidade e facilitar a purificação de rh-bFGF, utilizou-se a mutagénese de sítio-dirigido oligonucleotídica para modificar o gene de bFGF humano de forma a que as sequências que codificam para alguns ou todos os resíduos de cisteína codificassem em substituição para a serina. Reconheceu-se que o ~~gene de~~ bFGF de bo-

vino pode ser modificado de modo idêntico e que as sequências que codificam para um ou para todos os resíduos de cisteína podem codificar para outros aminoácidos tais como alanina, ácido aspártico e asparagina. Sintetisaram-se quatro oligonucleótidos sendo cada um deles designado como se mostra no quadro a seguir:

Quadro IX

Oligonucleótido	Sequência
102-21	5' ACCGTTTTTGGAGTACAGACG 3'
102-22	5' CCGGTTAGCAGATACACCTTT 3'
102-23	5' GTCAGTAACAGACTTAGAAGC 3'
102-24	5' GAAAAAGAAAGATTCGTCAGT 3'

Alteração do código

de CIS para SER na posição 26

de CIS para SER na posição 70

de CIS para SER na posição 83

de CIS para SER na posição 93

A primeira mutagênese utilizou os oligonucleótidos 102-22 e 102-23 para converter as cisteínas das posições 70 e 80 em serina. Subsequentemente construíram-se os genes em que todos os seis pares possíveis de cisteínas foram substituídos por serinas e uma em cada quatro cisteínas foi substituída por serinas. Os oligonucleótidos utilizados na construção deste genes mutantes estão indicados a seguir.

Quadro X

Análogo	oligonucleótidos utilizados para mutagênese
Serina 70,88	102-22, 102-23
Serina 26,93	102-21, 102-24
Serina 26,70	102-21, 102-22
Serina 26,88	102-21, 102-23
Serina 70,93	102-22, 102-24
Serina 88,93	102-23, 102-24
Serina 26,70,88,93	102-21, 102-22, 102-23, 102-24

As reacções de mutagênese foram todas realizadas de um modo essencialmente idêntico, diferindo apenas nos oligonucleótidos utilizados para a reacção e para a sondagem das placas resultantes por hibridização. Dez pmoles de cada iniciador universal M13 e dos iniciadores já referidos antes, foram fosforiladas por incubação com ATP 1 mM e 10 unidades de polinucleótido-quinase em 10 µl de tris 70 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, durante 30 minutos à temperatura de 37°C. Misturou-se cinco pmoles de cada oligonucleótido fosforilado com cerca de 0,5 µg de M13mpl3 de cadeia simples/rb-bFGF, aqueceu-se à temperatura de 60°C e deixou-se retornar a sua forma natural através de arrefecimento até à temperatura ambiente. A esta mistura de matriz/iniciador adicionou-se em seguida 1 µl de uma solução com 25 mM de cada: dATP, dCTP e TTP, 1 µl de ATP 100 mM, 2 unidades de T4 ligase e 8 unidades de fragmento grande de ADN PolII. Incubou-se esta mistura à temperatura de 14°C durante 4 horas trans

formaram-se as alíquotas da mistura de ligação em E. Coli JM101 tornadas competentes por meio de tratamento com CaCl_2 50 mM e colocaram-se as placas em agar de Lúria a 0,7% em placas em que previamente se verteu agar de Lúria a 1,5%. Retiraram-se por via de filtros de nitrocelulose das placas resultantes e os filtros foram sondados por hibridização com oligonucleótidos rádio marcados apropriados.

Em cada sonda utilizada obtiveram-se diversos positivos. Retomaram-se placas positivas e preparou-se um ADN de cadeia simples para utilizar como matriz na segunda parte da mutagênese. Quando se obteve a construção desejada, purificou-se o ADN de forma replicativa por lise celular e obtenção de banda em gradiente de densidade de cloreto de cézio. Transferiram-se em seguida os genes modificados para o vector plasmídico pCFM1156 para expressão em E. Coli. O gene modificado foi excisado do vector M13 por clivagem com XbaI/Hind III e purificado por electroforese em gel de agarose. Este fragmento purificado foi em seguida ligado em XbaI/Hind III e cortado com pCFM1156.

Transformaram-se as novas construções na estirpe de E. Coli FM5 para expressão.

Transferiram-se os análogos de serina 70,88 e de serina 26,93 para o vector de expressão.

O crescimento da estirpe de produção e purificação subsequente do análogo de serina 70,88 realizou-se tal como para o rb-bFGF e para rh-bFGF, tal como se encontra descrito no Exemplo 4, com a única excepção de ter sido omitido o DTT em todas as fases de purificação. Esta omissão de DTT foi possível porque os resíduos de cisteína responsá-

veis pela dimerização de bFGF durante a purificação tinham sido eliminados. Assim, o análogo de serina 70,88 representa um significativo melhoramento do r-bFGF com a sequência natural uma vez que este não contém impureza dimérica detectável e não tende, com o tempo, a formar dímeros porque é isento de grupos sulfidrilo livres. Além disso, uma vez que a necessidade de adicionar um agente de redução é eliminada, os problemas de formulação possíveis podem ser evitados.

O análogo de serina 26,93 não se comporta de forma idêntica à do bFGF recombinante de bovino ou humano e à das moléculas de serina 70,80; provavelmente porque não possui a estrutura da dissulfureto de bFGF natural. Durante a purificação uma fração significativa do análogo de serina 26,93 degrada-se. Tal degradação também ocorreu quando se fizeram tentativas para purificar o rb-bFGF na presença de ureia 7M a qual desnatura a estrutura terciária das moléculas. Ainda que o análogo de serina 26,93 não pareça possuir a mesma actividade biológica dos análogos de serina 70,88 quando purificados do sobre-nadante, como se encontra especificado nos Exemplos 4 e 11, os análogos inativos podem encontrar aplicação como antagonistas ou como moléculas bloqueadoras.

EXEMPLO 14

Purificação de um análogo de serina-26,70,88,93 a partir de corpos de inclusão

Descubriu-se de modo surpreendente que quando os análogos de serina 26,70,88,93 eram purificados a par-

tir de corpos de inclusão, preferentemente do que a partir de sobrenadantes, obtinha-se um análogo activo, apesar da alteração de sulfidrilos aparentemente não livres.

Utilizando uma oligo-mutagenese de sítio-dirigido, o gene sintético para h-bFGF era geralmente modificado, como se descreve no Exemplo 9, para substituir os quatro codões de cisteína com nucleótidos que codificam para resíduos de serina.

As proteínas correspondentes foram expressas em E. Coli e purificadas a partir de corpos de inclusão por solubilização em ureia seguidas de uma série de cromatografias em coluna e de uma fase de dobragem.

A proteína resultante, isenta de resíduos de cisteína, era incapaz de formar ligações dissulfureto intramoleculares ou intermoleculares. No entanto, verificou-se que esta proteína análoga exhibia actividade mitogénica sobre células NIH 3T3 não distinguíveis da exibida pela sequência natural.

Oligo mutagénese de sítio-dirigido

Construiu-se previamente um gene do análogo do bFGF em que os codões para as cisteínas 70 e 88 tinham sido convertidos em codões de serina, o qual se utilizou como matriz inicial para a mutagénese. Misturou-se aproximadamente 0,5 µg de ADN matriz com 5 pmoles de iniciador de sequência M13 universal e 5 pmoles de cada iniciador mutagénico, aqueceu-se à temperatura de 65°C durante 3 minutos e deixou-se arrefecer lentamente.

Em seguida misturou-se o iniciador-matriz

circularizado com ATP, uma mistura de dNTP, fragmento grande de ADN PolI e ligase, seguido de incubação a 15°C durante toda a noite. As alíquotas desta mistura reaccional foram transformadas em células JM101 e postas em placas de agar de Lúria a 0,7%. As placas que continham o fage mutante foram seleccionadas por hibridização em filtros de nitrocelulose de replicação contendo cada um um iniciador mutagénico marcado com p³². Preparou-se ADN de cadeia simples a partir das placas que foram positivas em ambas as sondagens de hibridização. A selecção da sequência desejada foi verificada utilizando-se o método de sequenciação de ADN de terminação de cadeia didesoxi.

As alterações de aminoácidos feitas e os iniciadores mutagénicos correspondentes utilizados foram:

de cis-26 a ser-26 5' ACCGTTTTTGGAGTACAGACG 3'

de cis-93 a ser-95 5' GAAAAAGAAAGATTCGTCAGT 3'

Ambos os iniciadores correspondiam à cadeia anti-sentido do gene de bFGF.

Expressão e Purificação

Desenvolveram-se células de E. Coli transportando o plasmídeo que continha o gene de bFGF mutante em 2 caldos de Lúria à temperatura de 30°C para aproximadamente 0,5 a 600; que depois se alterou para a temperatura de 42°C para induzir a expressão de bFGF.

Após o desenvolvimento durante a noite, recolheram-se as células por centrifugação e lisaram-se mediante três passagens através de uma French Press a 10.000 psi.

O material insolúvel que continha o bFGF capturado nos corpos de inclusão foi recolhido por centrifugação a baixa velocidade. Os corpos de inclusão foram solubilizados em ureia, submetidos a cromatografia de permuta catiónica e de coluna de sílica. O análogo parcialmente purificado foi recuperado por diluição e em seguida purificado até quase à homogeneidade por cromatografia em coluna de permuta catiónica.

Purificou-se o bFGF humano de sequência natural recombinante a partir da fracção solúvel de células de E. Coli lisadas por uma série de fases cromatográficas.

Ensaio de mitogénese em células NIH 3T3

A actividade biológica do bFGF análogo foi testada de acordo com a sua capacidade para estimular a reabsorção de ^3H -timidina em culturas confluentes de células NIH 3T3, tal como se encontra descrito no Exemplo 7. A fig. 7 mostra a dependência da actividade mitogénica da concentração para o análogo de serina 26,70,88,93 e para h-bFGF de sequência natural. Dentro do erro experimental, os dois perfis são indistintos com o efeito mitogénico semi-máximo observado a uma dose de cerca de 150 pg/ml. Estes resultados indicam que a conformação necessária para a actividade mitogénica mediada pelos receptores não é alterada pela substituição dos quatro resíduos de cisteína, pelo menos quando o análogo é purificado a partir de corpos de inclusão de preferência em vez do sobrenadante.



EXEMPLO 15

Bio-actividade de análogos de rh-bFGF

Caracterizou-se a actividade biológica de análogos de rh-bFGF como foi já descrito para a forma bovina nos Exemplos 7 e 8. A actividade semi-máxima dos análogos de rh-bFGF serina 70,88 no ensaio mitogénico sobre células NIH 3T3 (Exemplo 8) é idêntica à de rb-bFGF e de rh-bFGF, como se representa na fig. 3.

O análogo de serina 26,93 não mostrou actividade neste ensaio como se admitira já.

O análogo de serina 70,88 também foi testado sobre a sua capacidade como suporte de desenvolvimento de células EVUH, como se encontra descrito no Exemplo 7. O análogo rh-bFGF serina 70,88 foi tão eficaz quanto o rb-bFGF e o rh-bFGF na promoção do desenvolvimento de células EVUH em cultura

Quadro XI

<u>Factor do crescimento</u>	<u>Total de colónias</u>	<u>Colónias grandes</u>
Ser-70,88 rh-bFGF	84	24
rh-bFGF	76	22
rb-bFGF	68	19
controlo	23	0

EXEMPLO 16Estudo "in vivo" da eficácia do análogo de serina 70,88Preparação pré-operatória

Anestesiou-se coelhos brancos da Nova Zelândia, pesando aproximadamente 3Kg cada um, utilizando 5 mg/kg de Rompun[®] (Farbenfabriken, Bayer, Alemanha Ocidental) como sedativo, seguido de aproximadamente 50-60 mg/kg de cetamina, aplicado cerca de 10 minutos depois, ambos por via intramuscular mediu-se e registou-se o peso de cada um dos coelhos. Introduziu-se uma pequena porção de algodão ou de gase em ambas as orelhas de cada um dos coelhos após o que se raspou as superfícies interiores e as superfícies externas de ambas as orelhas, utilizando um tosquiador de animais com lâmina Nº 40. Em seguida aplicou-se um creme depilatório comercializado sob a marca Neet[®] nas superfícies interiores de cada orelha durante 10 minutos após o que se removeu o creme com uma gase seca. Limparam-se então as superfícies interiores das orelhas com gase embebida em solução de cloreto de sódio e em seguida com uma solução alcoólica a 70%. Branqueou-se a derme da superfície interior de uma das orelhas de cada coelho mediante infiltração de uma solução de xilocaína a 2% contendo 1:1000 de epinefrina, o que requer de 1,5 a 3 cm³ de volume total, utilizando uma agulha de calibre 30. Em seguida aplicou-se sobre a área infiltrada 3 ciclos de Betadine seguido de solução alcoólica a 70%.

Quando necessário, substituí-se nesta altura os tampões das orelhas por tampões secos.

Os coelhos foram então transferidos para uma

área cirúrgica estéril. Imobilizou-se a orelha branqueada em uma prancha de plexiglass ("ear board"-Washington University Medical Center, Division of Technical Services) que utiliza duas barras fixadoras, uma no topo e outra na base da orelha do animal, para se conseguir estabilizar a orelha do coelho sem comprometer o fluxo sanguíneo. Tapou-se o animal e pulverizou-se o campo cirúrgico, isto é, a superfície interior da orelha, com Betadine e deixou-se secar durante cerca de 3 a 5 minutos.

Ferimento

Utilizou-se uma técnica estéril para se proceder aos ferimentos. A superfície interior da orelha foi sulcada cuidadosamente com uma agulha de biópsia por punção de 6 mm e limpou-se o local da biópsia de todos os tecidos e fibras, incluindo a membrana periosteal, até ao nível da cartilagem, utilizando um forceps de micro-cirurgia, tesouras para tenotomia, um elevador periosteal de Lempert com 2 mm de lâmina e aplicadores de algodão estéril.

As biopsias em que a cartilagem completamente cortada através do punção não foram utilizadas nas experiências. Contudo, os cortes parciais da espessura da cartilagem foram considerados aceitáveis. A localização de cortes ou buracos naturais na cartilagem foi cuidadosamente anotada com referência de registo ao dia da colheita. O sangue foi retirado do local da biópsia com aplicadores de algodão estéril para evitar um excesso de sangue na ferida. Tendo a biópsia sido terminada, cobriu-se com uma pequena peça de gaze embebida em solução de cloreto de sódio.

Quatro biópsias viáveis foram colocadas em cada uma das orelhas feridas, duas de cada lado da linha média definida pela dobra da orelha quando se estabilizara na prancha. Em qualquer dos casos não se fizeram mais de cinco biópsias em cada orelha. As biópsias foram colocadas a um mínimo de 1 cm de distância.

Após se completar o processo para uma orelha, cobriu-se esta com uma gase embebida em uma solução de cloreto de sódio e em seguida cobriu-se em volta da gase para se reter a humidade até à aplicação de FGF. Em seguida branqueou-se a segunda orelha escarificou-se, imobilizou-se e fez-se a ferida de forma idêntica à utilizada para a primeira orelha. Retirou-se o sangue do local da biópsia de cada uma das segundas orelhas e quando se terminou cada uma das biópsias, colocou-se a peça com uma pequena peça de gase embebida em solução de cloreto de sódio. Após terminar o processo para a segunda orelha, esta foi também coberta com uma gase humedecida em solução de cloreto de sódio até à aplicação de FGF.

Quando algum dos coelhos mostrou sinais de estar recuperando da anestesia antes de se atingir este ponto do processo, foi reanestesiado com 25 mg/kg de cetamina, administrada por via intramuscular.

Aplicação das preparações de FGF

O FGF foi primeiramente aplicado na primeira orelha ferida, com a gase húmida da primeira orelha e as superfícies não feridas da orelha foram cuidadosamente limpas com gase. Todas as biópsias foram cuidadosamente limpas

de sangue e/ou de excesso de fluido com tamponetes de algodão esterilizado. As superfícies não feridas da orelha foram pintadas com um composto de tintura de benzoim, evitando cuidadosamente atingir as biópsias, e deixando-as secar ao ar durante 3 a 5 minutos.

Aplicaram-se 5 μ g de rb-bFGF ou de ser-70,88 rh-bFGF em Zyderm[®] (Collagen Corporation) a cada uma das biópsias utilizando uma agulha de calibre 26 montada permanentemente numa seringa de 0,5 cm³ ou de 1 cm³ (Becton-Dickinson) ou numa micropipeta. A biópsia estava em condições de acomodar um máximo de 0,025 cm³ da preparação viscosa de bFGF-Zyderm[®]. Após a aplicação de FGF a uma biópsia, esta foi imediatamente coberta por uma gase oclusiva Tegaderm[®] (3M Corporation, Minneapolis, Minnesota), tendo o cuidado de não se deixar formar bolhas de ar ou rugas em torno do local da biópsia. A Tegaderm[®] fora previamente cortada ficando com um tamanho aproximado de 2 cm². Repetiu-se este processo para cada uma das biópsias na orelha. Qualquer biópsia falhada foi também coberta com Tegaderm[®] a fim de minimizar os riscos de infecção. Após se terminar o processo com a primeira orelha, foi retirada a gase húmida da outra orelha e o processo foi repetido tendo o cuidado de assegurar uma limpeza completa de todas as biópsias, de qualquer sangue ou/e excesso de líquido com tamponetes de algodão estéril.

Deixou-se os coelhos recuperarem da anestesia sob observação dos investigadores que realizaram a intervenção cirúrgica. Após a recuperação, colocou-se em volta do pescoço de cada um dos coelhos um colar de plástico com cerca de 15 a 25 cm de largura para impedir que o coelho

provocasse qualquer ruptura nas feridas ou nas compressas.

Os coelhos foram reconduzidos às gaiolas de isolamento onde se mantiveram até à recolha.

As feridas dos coelhos que conseguiram remover os seus colares e qualquer ferida da qual o Tegaderm[®] tenha sido alvo de ruptura de qualquer modo antes da data da colheita, foram re-examinados logo que foi detectado o problema e inutilizado para análise se as feridas se apresentavam danificadas.

Colheita

No sétimo dia depois da intervenção cirúrgica, anestesiaram-se os coelhos da mesma forma que se descreveu para a preparação da operação.

Cada coelho foi pesado e registado o respectivo peso e a descrição qualitativa da condição das feridas, notando-se especialmente a presença ou ausência da Tegaderm[®] e de qualquer excesso de fluído sob a compressa. Os coelhos foram sacrificados por meio de uma embolia provocada com 50 cc/kg de ar administrada por injeção intra-cardíaca; foram amputadas ambas as orelhas utilizando-se um bisturi cirúrgico N^o 15.

Cada biópsia com aproximadamente 5 mm de tecido circundante em qualquer dos lados e o Tegaderm[®] ainda intacto foi retirada da orelha e o local da biópsia foi medido afim de se cortar exactamente na linha média tomando como referência as notas registadas no dia da intervenção cirúrgica para impedir a bissecção através de buracos ou cortes naturais da cartilagem.

A biópsia foi cuidadosamente bissectada com uma lâmina de fio simples aplicando-se um único movimento descendente para evitar a ruptura da orientação da ferida. As biópsias bissectadas foram imediatamente colocadas em cassetes rotuladas com o número de identificação do coelho e colocadas em um fixador adequado para processamento histológico e análise quantitativa subsequente.

Análise histológica quantitativa

As secções cortadas, orientadas cuidadosamente através das feridas bissectadas foram, embebidas, sectionadas e coradas utilizando-se uma mistura de Hematoxilina e Eosina ou Trichomo. Evitou-se ao mínimo o corte grosseiro da secção afim de se obter uma secção através do verdadeiro centro da ferida. As medições feitas incluíam o espaço de re-epitelialização (EG) através da ferida, a altura máxima (MH) do tecido de granulação da ferida nas extremidades (a média de ambos os lados) e o espaço de tecido de granulação (GTG) através da ferida, como está representado na fig. 8. As medidas foram realizadas às cegas em lâminas pré-codificados por dois observadores independentes utilizando-se um micrómetro de lentes calibradas e convertendo para milímetros (mm).

Calculou-se a média das determinações de ambos os observadores após o que o código foi aberto e os dados analisados estatisticamente. Se a diferença entre as medições dos dois observadores era superior a 10%, re-examinava-se a lâmina.

Os dados resultantes estão representados

no Quadro XII.

<u>Quadro XII</u>		
rb-bFGF		
	<u>Controlo</u>	<u>rb-bFGF</u>
Nº. de feridas	41	22
Frequência de re-epitelia- lização total	24%	50%
GTG	4,68 $\pm$ 0,12	4,66 $\pm$ 0,13
MH do tecido de granu- lação novo (mm)	0,76 $\pm$ 0,03	0,79 $\pm$ 0,02

Análogo de SER-70, 88 rh-bFGF

		SER(70,88)
	<u>Controlo</u>	<u>rh-bFGF</u>
Nº de feridas	126	13
Frequência de re-epitelia- lização total	22%	69%
GTG	4,41 $\pm$ 0,09	3,85 $\pm$ 0,14
MH do tecido de granu- lação novo (mm)	0,60 $\pm$ 0,01	0,74 $\pm$ 0,04

Os dados apresentados constituem a média $\pm$ o erro padrão.

Ambas as preparações de rb-bFGF e de SER-70,88 rh-bFGF em Zyderm[®] exibiram um significativo efeito positivo na re-epitelialização ainda que o efeito com SER-

-70,88 rh-bFGF fosse ligeiramente superior. Contudo, a formulação de tecido de granulação novo foi significativamente afectada por SER-70,88 rh-bFGF, enquanto que o rb-bFGF se apresentou como não produzindo qualquer efeito.

Uma explicação possível para esta diferença reside na estabilidade reforçada do análogo SER-70,88 rh-bFGF com o material de sequência natural. Uma vez que o FGF é sómente aplicado uma vez neste estudo, isto é, no momento do ferimento, a estabilidade em colagene Zyderm[®] pode ser crítica para a produção de um efeito positivo na formação de tecido de granulação.

Outras aplicações para cicatrização de feridas e para cirurgia utilizando análogos de bFGF da presente invenção serão evidentes para os técnicos nesta matéria.

Numerosas modificações e variações na prática da invenção também se tornarão evidentes para os técnicos, após a consideração dos Exemplos elucidativos anteriores. Consequentemente, a presente invenção deve ser considerada como limitada apenas pela extensão reflectida pelas reivindicações anexas.

Reivindicações

1.- Processo para a produção de um análogo do factor de crescimento de fibroblastos básico, o qual difere do factor de crescimento de fibroblastos básico de ocorrência natural em termos da identidade e/ou localização, por um ou mais restos de aminoácidos e em que um pelo menos dos restos de cisteína do referido factor de crescimento de fibroblastos básico de ocorrência natural está substituído por um resto de um aminoácido diferente, caracterizado pelo facto de se transformar ou transfectar uma célula hospedeira por meio de uma sequência de DNA exógeno que codifica para os análogos do factor de crescimento de fibroblastos básico.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o referido aminoácido diferente ser escolhido no

grupo constituído por serina, alanina, ácido aspártico e asparagina.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de o referido aminoácido diferente ser serina.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de pelo menos um dos referidos restos de cisteína substituídos ser um resto de cisteína que existe sob a forma de sulfidrilo livre.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de dois dos restos de cisteína referidos serem substituídos por um resto de um aminoácido diferente.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de dois dos referidos restos de cisteína substituídos serem resíduos de cisteína que existem sob a forma de sulfidrilo livre.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o análogo do factor de crescimento de fibroblastos básico possuir a sequência de aminoácidos indicada a seguir:

...

```

      1          10          20
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp
      30          40
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg
      50          60
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu
      70          80
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp
      90          100
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu
     110          120
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys
     130          140
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe
          146
LeuProMetSerAlaLysSer

```

ou as suas variantes alélicas e de pelo menos um dos restos de cisteína nas posições 26, 70, 88 e 93 ser substituído por um resto de um aminoácido diferente.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de pelo menos um dos restos de aminoácido terminal ser eliminado enquanto o análogo referido reter de um modo substancial a actividade biológica do factor de crescimento de fibroblastos básico de ocorrência natural.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de se escolher o referido aminoácido diferente no grupo constituído por serina, alanina, ácido aspártico e asparagina.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de o referido aminoácido diferente ser a serina.

zado pelo facto de o referido aminoácido diferente ser a serina.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de se escolher pelo menos um dos referidos restos de cisteína substituídos no grupo constituído por cisteínas nas posições 70 e 88 dos aminoácidos.

12.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de se substituírem dois dos referidos restos de cisteína por um resíduo de aminoácido diferente.

13.- Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de os referidos aminoácidos substituídos serem cisteínas nas posições 70 e 88 dos aminoácidos.

14.- Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de os referidos restos de cisteína substituídos serem cisteínas nas posições 26 e 93 dos aminoácidos.

15.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de os referidos resíduos de cisteína substituídos consistirem em cisteínas nas posições 26, 70, 88 e 93 dos aminoácidos.

16.- Método para a produção de um análogo do factor de crescimento de fibroblastos básico purificado e isolado, caracterizado pelo facto:

de se transfectar ou transformar células hospedeiras com uma sequência de DNA que codifica a expressão procariótica ou eucariótica de um análogo de um factor de crescimento de fibroblasa



tos básico de acordo com a reivindicação 7;

de se cultivar as células hospedeiras transfectadas ou transformadas de modo a permitir que as células hospedeiras exprimam um análogo do factor de crescimento de fibroblastos básico; e

de se isolar o referido análogo do factor de crescimento de fibroblastos básico.

17.- Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo facto de a referida sequência de DNA ser modificada a partir do gene do factor de crescimento de fibroblastos básico.

18.- Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo facto de se modificar o referido gene do factor de crescimento de fibroblastos básico humano por mutagénese de sítio-dirigida oligonucleotídica.

19.- Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo facto de o referido factor de crescimento de fibroblastos básico humano ser modificado a partir de um gene de factor de crescimento de fibroblastos básico bovino.

20.- Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo facto de se modificar o referido gene de factor de crescimento de fibroblastos bovino por meio de mutagénese de sítio-dirigida oligonucleotídica.

21.- Processo para a preparação de composições farma-

blastos básico obtido pelo processo de acordo com a reivindicação 1, como ingrediente activo, com um ou mais agentes adjuvantes aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico.

22.- Célula hospedeira procariótica ou eucariótica transformada ou transfectada com uma sequência de DNA de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo facto de ser capaz de exprimir um análogo do factor de crescimento de fibroblastos básico obtido pelo processo de acordo com a reivindicação 7.

23.- Método para a produção de um análogo do factor de crescimento de fibroblastos básico isolado e purificado, caracterizado pelo facto:

de se transfectarem ou transformarem células hospedeiras com uma sequência de DNA de acordo com a reivindicação 16;

de se cultivarem as células hospedeiras transfectadas ou transformadas para permitirem a expressão de um análogo do factor de crescimento de fibroblastos básico; e

de se isolar o referido análogo do factor de crescimento de fibroblastos básico.

24.- Método para a purificação de um análogo de factor de crescimento de fibroblastos básico recombinante de acordo com

25.- Método para a purificação de um análogo do factor de crescimento de fibroblastos básico recombinantes de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto:

de se submeterem a uma cromatografia não heparínica os corpos de inclusão solubilizados,

— after harvest!

R E S U M O

"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ANÁLOGOS DO FACTOR
DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS"

Descrevem-se análogos do factor de crescimento de fibroblastos básico recombinantes, que possuem parte ou a totalidade da conformação estrutural principal e uma ou mais das propriedades biológicas do factor de crescimento de fibroblastos básico de um mamífero (por exemplo um ser humano), em que pelo menos um dos restos de cisteína do factor de crescimento de fibroblastos básico de ocorrência natural é substituído por um resto de um aminoácido diferente.

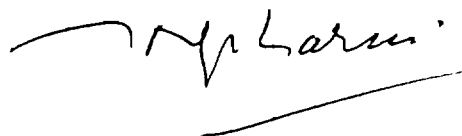
Também se descreve um processo para a produção destes análogos em que uma célula hospedeira é transformada ou transfectada por meio de uma sequência de DNA exógeno que codifica para os análogos do factor de crescimento de fibroblastos básico.

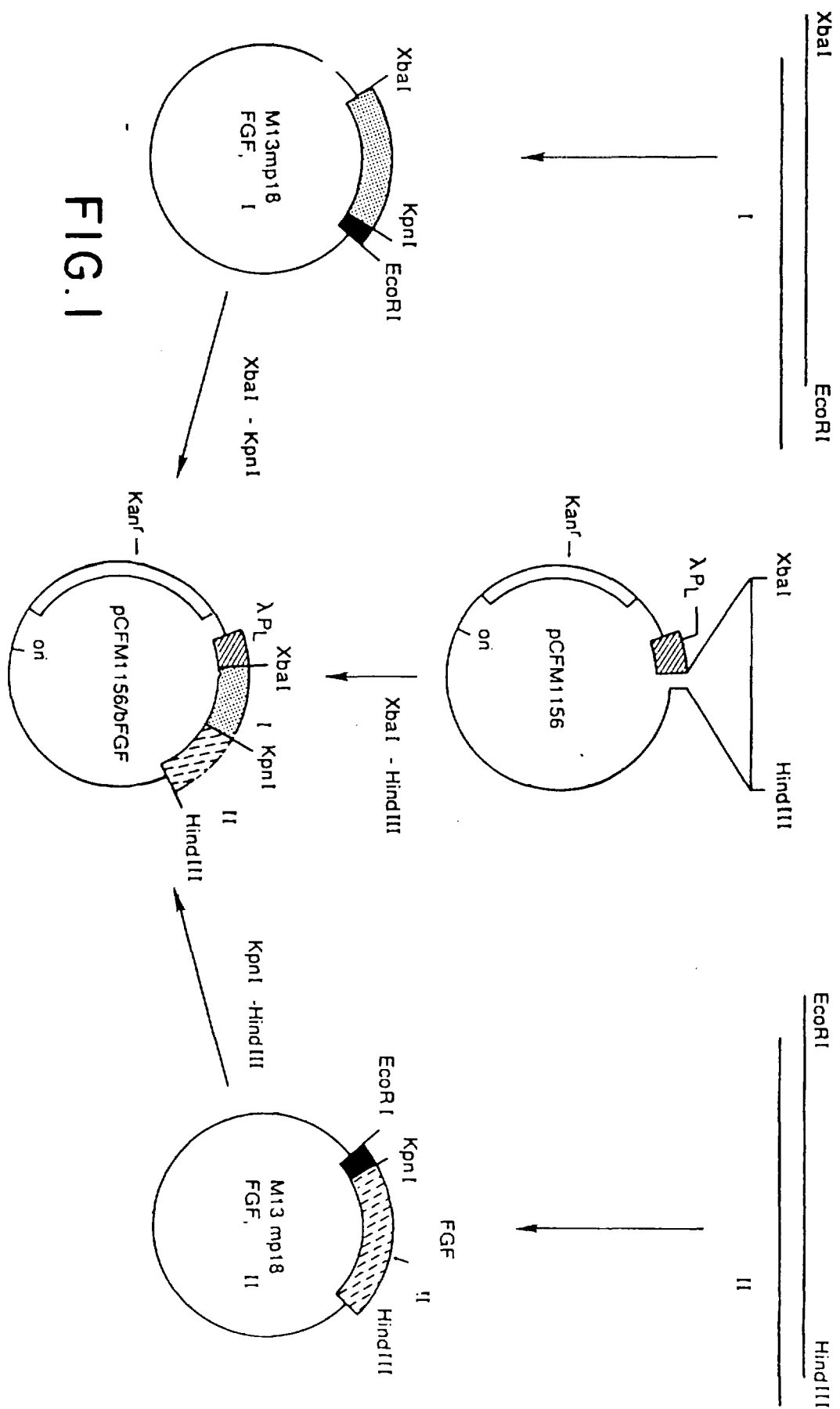
São ainda descritos métodos para a purificação destes análogos assim como as suas aplicações in vivo.

Os análogos do factor de crescimento de fibroblastos básico biologicamente activos são mais estáveis e facilitam a puri-

ficação do factor de crescimento de fibroblastos básico.

Lisboa, 30 de Março de 1989
O Agente Oficial da Propriedade Industrial





7

Met Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gln
TCTAGAAGCAGGAAATAACAT ATG CCA GCT CTG CCA GAA GAT GGT GGA

10 Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu
TCC GGT GGT GCT TTC CCG CCA GGT CAT TTC AAA GAT CCG AAA CGT CTG

30 Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly
TAC TGC AAA AAC GGT GGT TTT TTC CTG CGT ATC CAT CCG GAT GGT
Ser C

40 Arg Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu
CGT GGT GAT GAT GGT GTA CGT GAG AAA TCT GAT CCG CAT ATC AAA CTG

60 Gln Leu Gln ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val
CAG CTG CAA GCT GAA GAG CGT GGT GTA GTT TCT ATT AAA GGT GTA

70 Cys Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu
TCT GCT AAC CGG TAC CTG GCT ATG AAA GAA GAC GGT CGT CTG CTG
Ser C

90 Ala Ser Lys Cys Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu
GCT TCT AAC TGT TGT ACT GAC GAA TCT TTC TTT TTC GAA CGT CTG
Ser C Ser C

100 Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Ser
GAA TCT AAC AAC TAC AAC ACT TAC AGA TCT CGT AAA TAC TCT TCC
Thr A Ser TCT TCT

120 Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Pro
TGG TAT GTA GCT CTG AAA CGT ACT GGT CAG TAC AAA CTG GCT TCT

Pro Gly
TCC
Ser

130 Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser
AAG ACT GGT CCG GGT CAG AAA GCT ATC CTG TTT CTG CCG ATG TCT

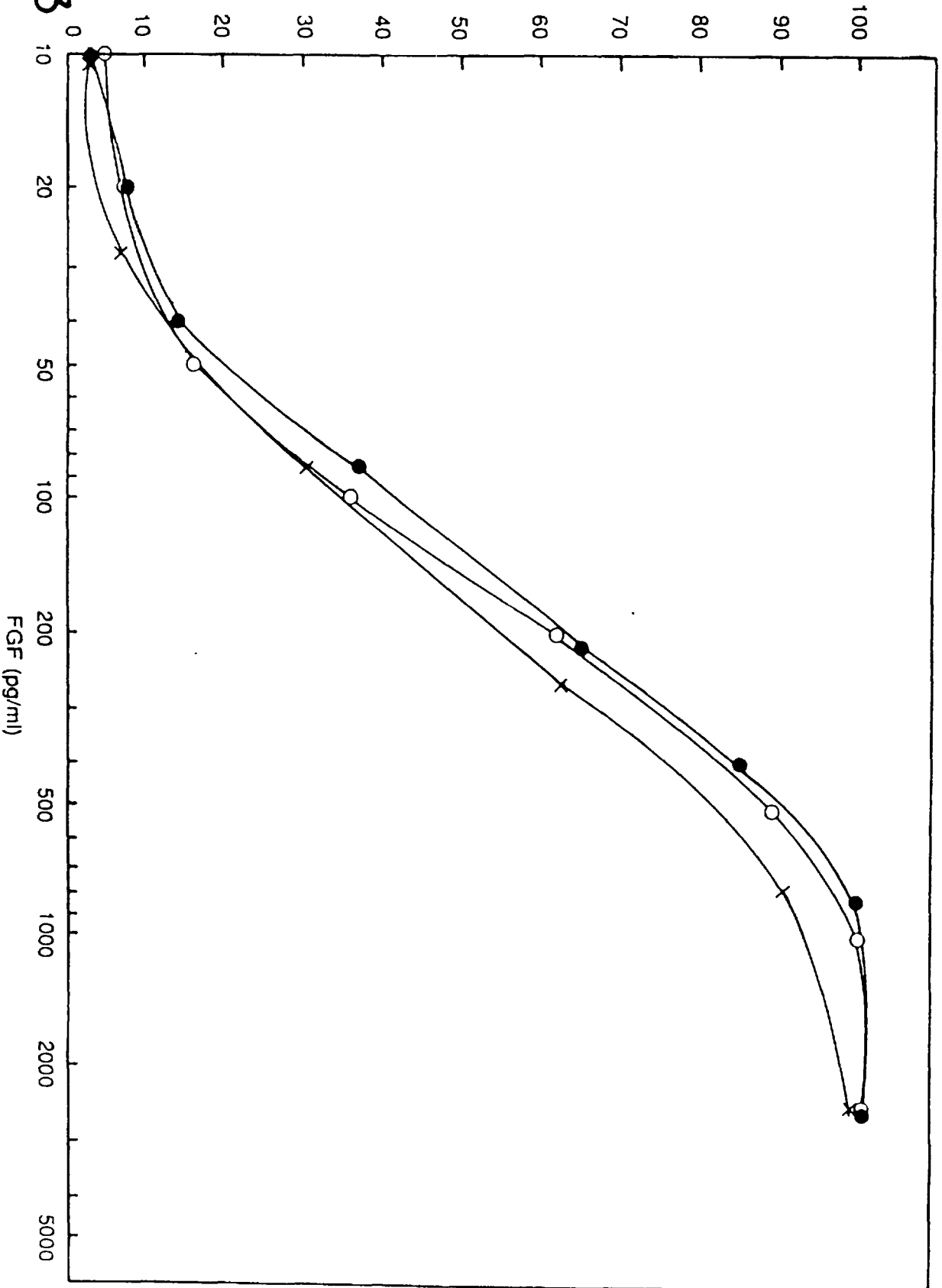
147 Ala Lys Ser End

CTCAGAGAGCTT Hind III

FIG. 2

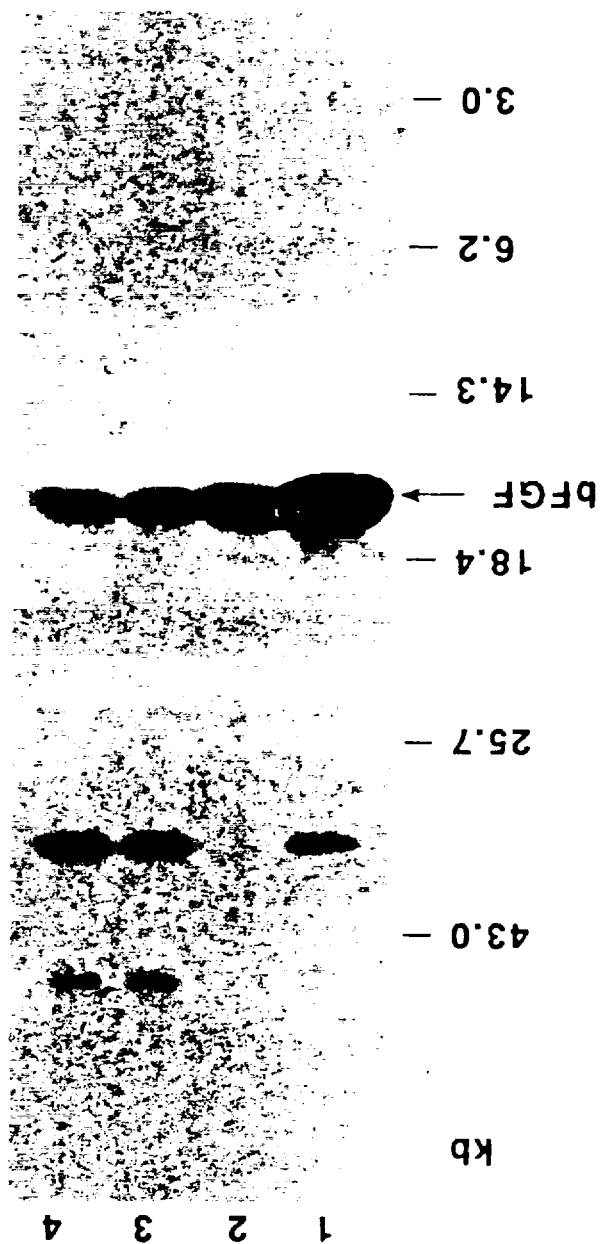
4

FIG. 3

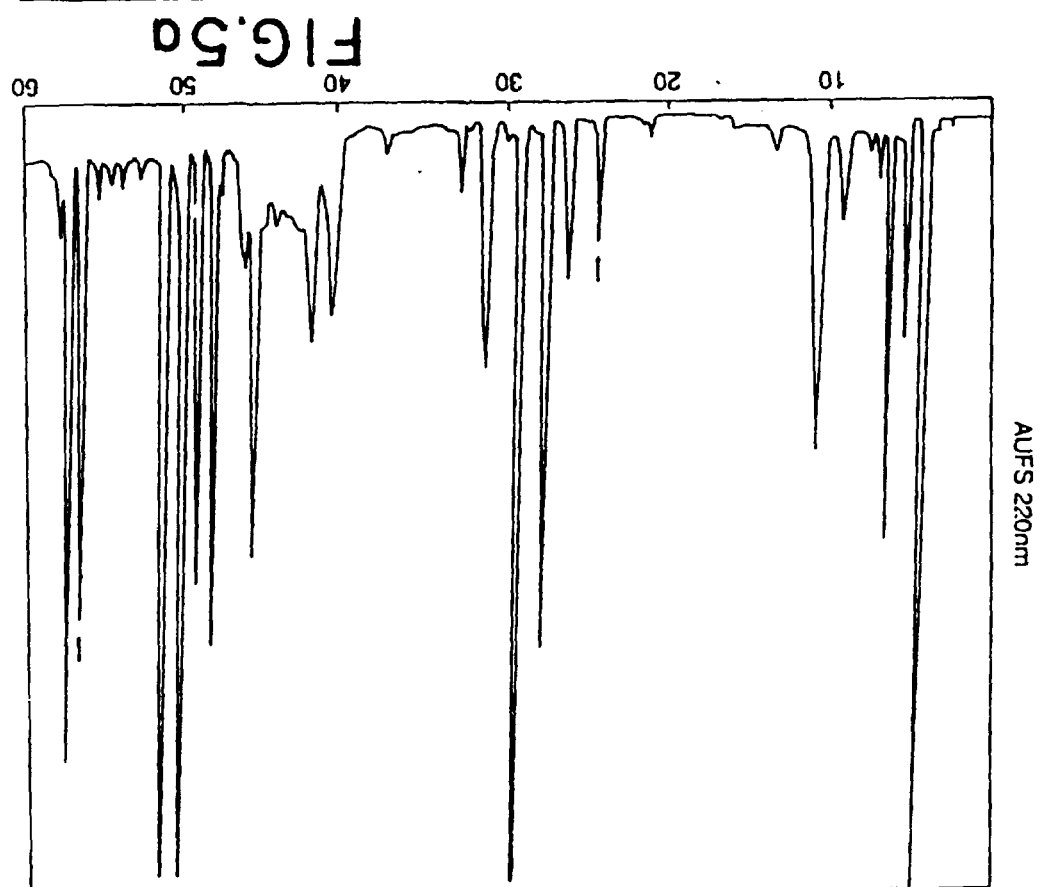
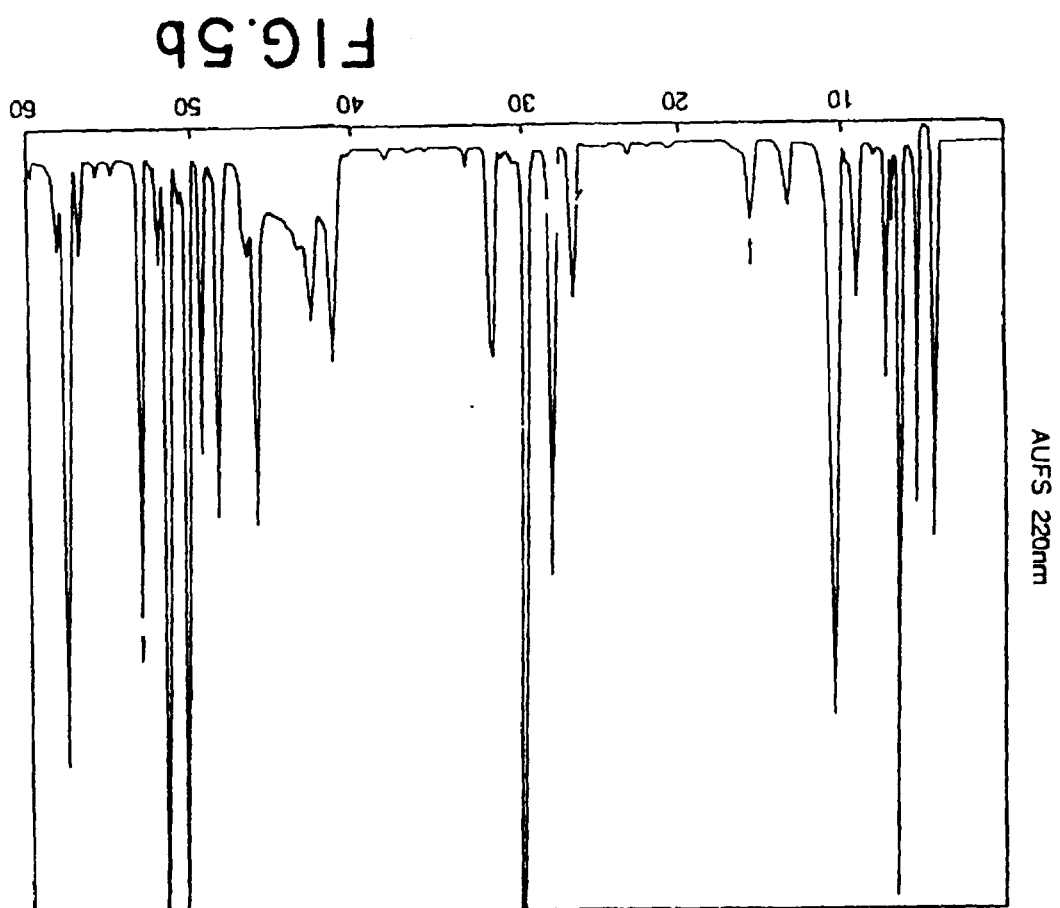


5

FIG. 4



4



4

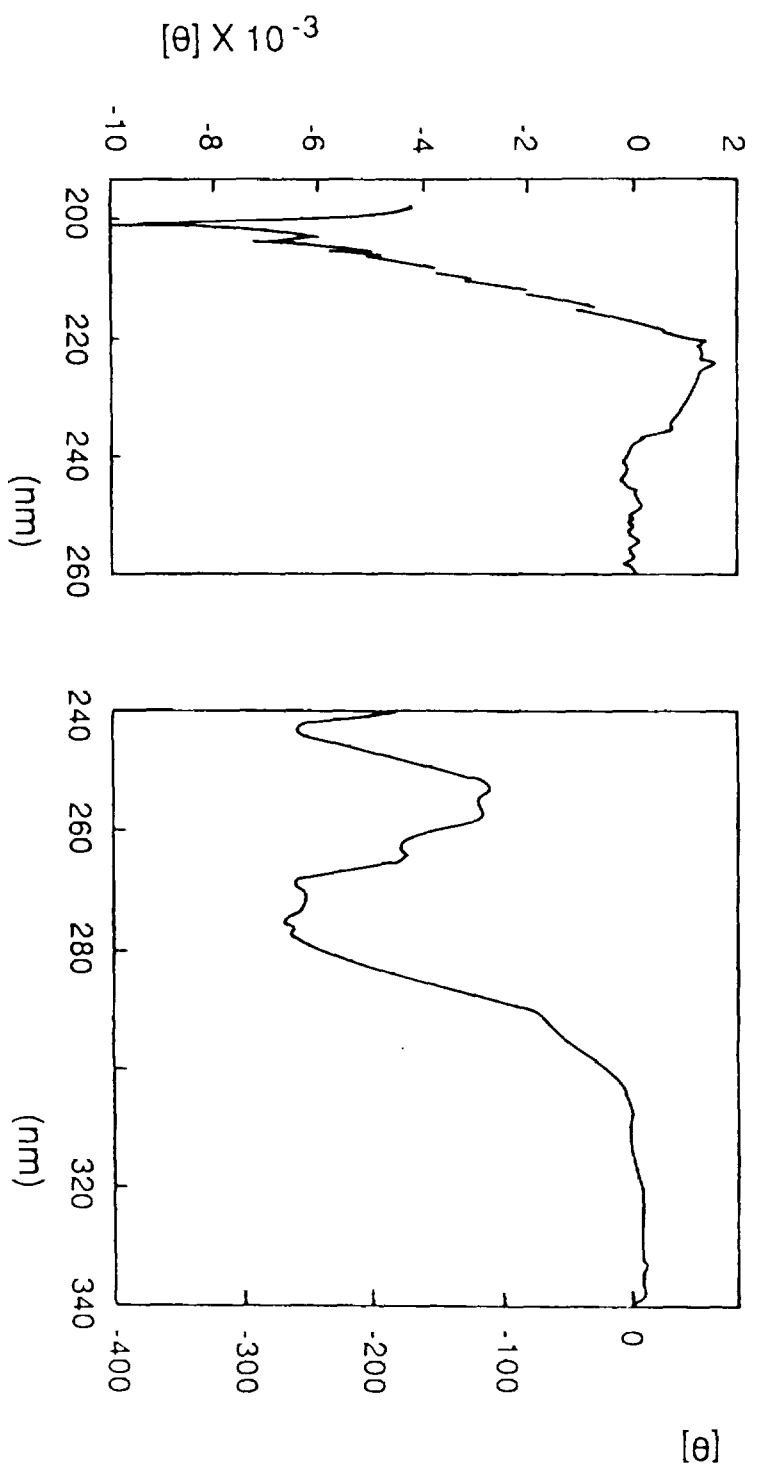
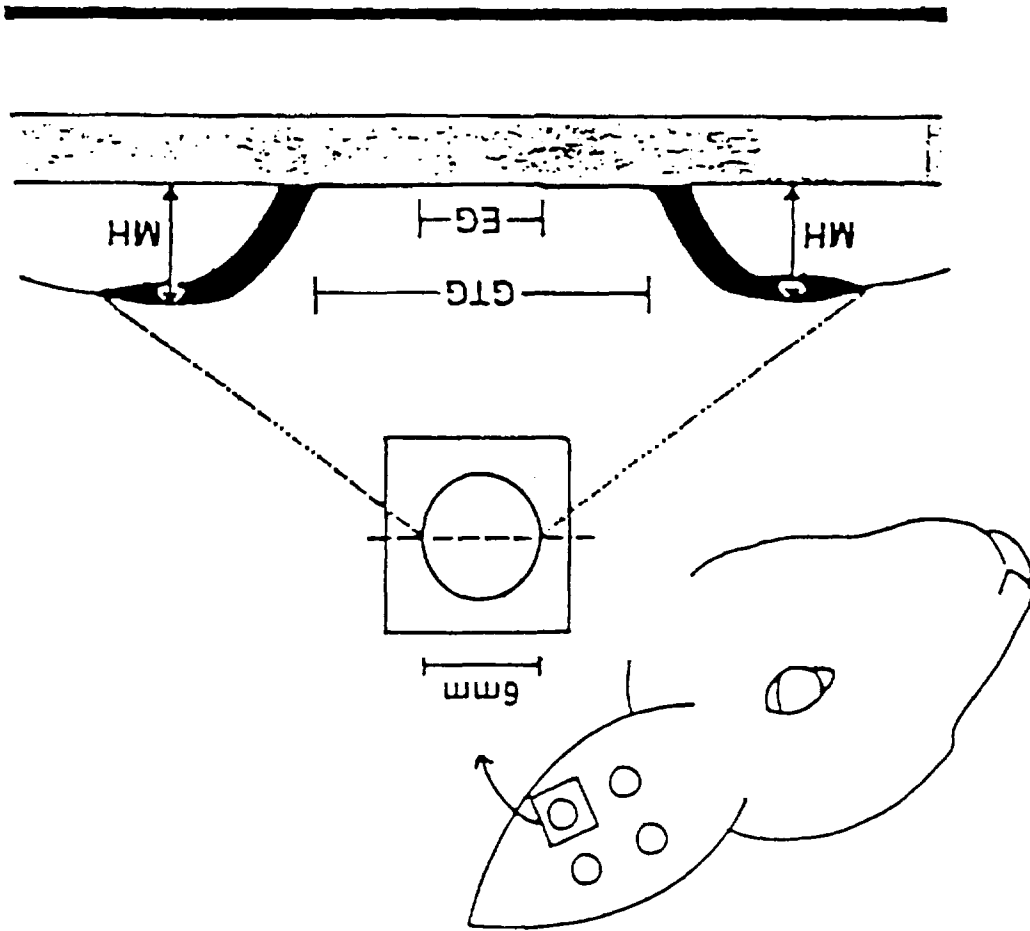


FIG. 6

5

FIG. 8

MH -
GTG -
EG -



4.

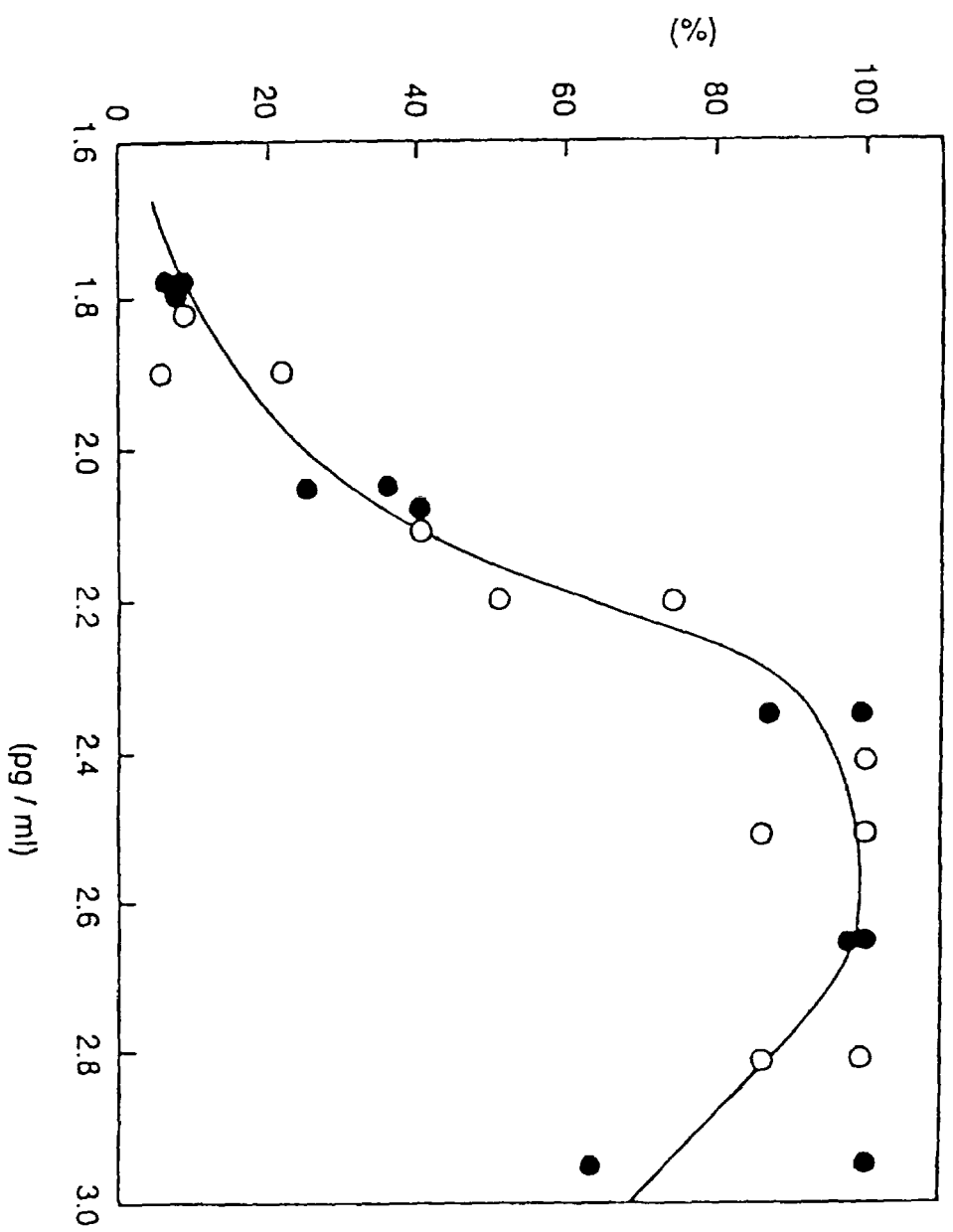


FIG. 7

5