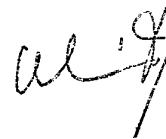


Patente Nº 835229



## - R E S U M O -

1

5 "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE VARIANTES DA ALFA-ANTITRIPSINA HUMANA GLICOSILADA E VECTORES VIRAIS DE EXPRESSÃO DA ALFA<sub>1</sub>-AT"

10

O presente invento diz respeito a um vector viral de expressão da alfa<sub>1</sub>-AT ou ao processo de preparação de uma variante da alfa<sub>1</sub>-AT escolhida entre [AA<sup>357</sup>] alfa<sub>1</sub>-AT, [AA<sup>358</sup>] alfa<sub>1</sub>-AT, [AA<sup>357</sup>, AA<sup>358</sup>] alfa<sub>1</sub>-AT e das variantes correspondentes da forma truncada [delta 1 → 5] alfa-AT assim como

15 [delta 1 → 5] alfa<sub>1</sub>-AT.

20

O vector viral é constituído por um vírus híbrido da vacina que compreende uma sequência de ADN que codifica para a referida variante da alfa<sub>1</sub>-AT inserida numa parte não essencial do genoma do vírus e sob o controlo de uma sequência de expressão eficaz na vacina.

25

30

35

1 Descrição do objecto do invento  
que

5 TRANSGENE S.A., Société Anonyme,  
francesa, industrial, com sede  
em 16 rue Henri Regnault 92400  
COURBEVOIE, França, pretende obter  
em Portugal para, "PROCESSO PARA A  
10 PREPARA O DE VARIANTES DA ALFA-AN-  
TITRIPSINA HUMANA GLICOSILADA E VEC-  
TORES VIRAIS DE EXPRESSÃO DA ALFA<sub>1</sub>-  
-AT"

15 A alfa<sub>1</sub>-antitripsina (alfa<sub>1</sub>-AT)   o inibidor de protea-  
se mais abundante no plasma.

20 A inibi o desta protease serina desempenha um papel  
importante no controlo da elastase neutrófila humana e do  
factor XIa. O centro reagente da alfa<sub>1</sub>-AT   formado pelos  
dois resíduos amino-ácidos denominados P<sub>1</sub> e P'<sub>1</sub>. A natureza  
do resíduo P<sub>1</sub> determina a especificidade da inibi o pela  
alfa<sub>1</sub>-AT e a substitui o da metionina P<sub>1</sub> natural pela argi-  
nina (alfa<sub>1</sub>-AT Met<sup>358</sup>   Arg<sup>358</sup>) produz um inibidor que tem  
25 uma afinidade muito aumentada para a trombina com uma dimi-  
nui o concomitante da afinidade para a elastase neutrófila  
humana.

30 O variante alfa<sub>1</sub>-AT (Met<sup>358</sup>   Arg<sup>358</sup>)   também ca-  
paz de inibir eficazmente enzimas de fase de contacto da  
proteólise do plasma, isto em contraste com a proteína nati-  
va. A inibi o da calicreína e do factor XIa   aumentada en-  
tre 20 000 e 70 000 vezes, respectivamente, pela presença  
da arginina na posi o 358. O factor XII actividade (XIIif)  
  também inibido de maneira eficaz, e a alfa<sub>1</sub>-AT nativa não  
35 tem nenhuma actividade em rela o a esta protease. Como as  
proteases do sistema de fase de contacto são activadas nas

1 doenças como os choques sépticos, os ataques de angio-edema hereditário e as síndromas de detresse respiratória dos adultos, a administração da alfa<sub>1</sub>-AT (Met<sup>358</sup> → Arg<sup>358</sup>), pode ser muito eficaz no controlo destas doenças.

5 A alfa<sub>1</sub>-AT que se encontra no plasma é glicolisada. É desejável, portanto, que a alfa<sub>1</sub>-AT (Met<sup>358</sup> → Arg<sup>358</sup>) produzida para a utilização in vivo seja também modificada desta maneira.

10 Análogamente, visto que a requerente demonstrou que há interesse em utilizar outras variantes da alfa<sub>1</sub>-AT, tem também interesse poder preparar estas variantes sob forma glicolisada.

Trata-se em particular dos variantes truncados:

15 (delta Glu<sup>1</sup> → Gli<sup>5</sup>) alfa<sub>1</sub>-AT que serão designados por

20 [delta 1 → 5] alfa<sub>1</sub>-AT assim como dos variantes de alfa<sub>1</sub>-AT ou de alfa<sub>1</sub>-AT transformados na posição 357 e/ou 358 designados por [AA<sup>357</sup>] alfa<sub>1</sub>-AT [AA<sup>358</sup>] alfa<sub>1</sub>-AT ou [AA<sup>357</sup> AA<sup>358</sup>] alfa<sub>1</sub>-AT.

Em particular, além dos variantes Arg<sup>358</sup>, têm interesse os variantes seguintes, conforme é demonstrado na patente WO 86 00337:

25 (Gli<sup>358</sup>), (Ala<sup>358</sup>), (Ile<sup>358</sup>), (Val<sup>358</sup>), (Leu<sup>358</sup>) e (Phe<sup>358</sup>)

que também podem ser truncados. Além disso, o variante [Lis<sup>358</sup>] alfa<sub>1</sub>-AT apresenta um determinado interesse como inibidor específico da plasmina.

30 Finalmente, os variantes na posição 357 como Ala<sup>357</sup>, também têm interesse, em particular o variante [Ala<sup>357</sup>, Arg<sup>358</sup>] que têm propriedades melhoradas em comparação com o variante Arg<sup>358</sup> descrito anteriormente.

35 Estes variantes são preparados, de acordo com o presente invento, por meio de cultura de células eucariotas, em

1 particular células de mamíferos que compreendem um bloco de expressão do gene correspondente ao variante desejado.

Em particular, este bloco de expressão está situado sobre vector viral, particularmente um poxivírus como a vacina. Trata-se de um vector viral de expressão de um variante da  $\alpha_1$ -AT, escolhido de entre:  $[\text{AA}^{357}] \alpha_1$ -AT,  $[\text{AA}^{358}] \alpha_1$ -AT  $[\text{AA}^{357}, \text{AA}^{358}] \alpha_1$ -AT e os variantes correspondentes que têm a forma truncada  $[\text{delta } 1 \longrightarrow 5] \alpha_1$ -AT assim como  $[\text{delta } 1 \longrightarrow 5] \alpha_1$ -AT, caracterizado por ser constituído por um vírus híbrido da vacina que compreende uma sequência de ADN que codifica para o referido variante da  $\alpha_1$ -AT, inserido numa parte não essencial do genoma do vírus e sob o controlo de uma sequência de expressão eficaz na vacina.

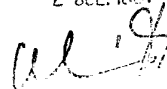
15 Este tipo de construção já foi descrito pela requerente, designadamente nas patentes WO 85/04810 e WO 85/05376. A expressão e modificação pós-traducional correcta de diferentes proteínas estranhas, nas células de mamíferos, utilizando o vírus da vacina, foram descritos diversas vezes.

20 Para se conseguir isto, o gene correspondente ao variante derivado da  $\alpha_1$ -AT é inserido preferivelmente numa parte do genoma não essencial do vírus da vacina e de maneira ainda mais preferível num gene marcador como o gene TK.

25 A inserção neste gene suprime a sua expressão e as células transfectadas pelo vírus correspondente podem ser seleccionadas, conforme será descrito mais adiante.

O bloco de expressão compreenderá, preferivelmente, uma sequência que promove a expressão do gene em questão nas células, depois de transfecção, e em particular, o gene que codifica para o variante da  $\alpha_1$ -AT ficará na dependência de um promotor da vacina como o promotor do gene 7,5K que será designado por P 7,5K.

35 Células de mamíferos, em particular células BHK infectadas pelo vector vírus híbrido atrás descrito, produzirão variantes de  $\alpha_1$ -AT, se forem cultivadas em meios de



1 cultura apropriados.

Os vectores em questão são, de maneira geral, obtidos por meio de co-transfecção de um vírus vacina selvagem e de um plasmídeo que tem os elementos atrás indicados, e o vírus híbrido é constituído in vivo, por recombinação. Esta tecnologia está descrita nas patentes citadas anteriormente.

O presente invento diz também respeito às variantes da  $\alpha_1$ -AT, glicosilada assim obtida, podendo estes produtos ser separados do meio de cultura por meio de processos conhecidos na tecnologia das proteínas.

Trata-se, em particular, dos variantes

[AA<sup>357</sup>]  $\alpha_1$ -AT

[AA<sup>358</sup>]  $\alpha_1$ -AT

15 [AA<sup>357</sup> AA<sup>358</sup>]  $\alpha_1$ -AT

e dos variantes [delta 1  $\rightarrow$  5]  $\alpha_1$ -AT correspondente assim como dos variantes [delta 1  $\rightarrow$  5]  $\alpha_1$ -AT, variantes que são glicosilados e não têm resíduo Met na extremidade 3'.

Entre estes variantes, é necessário citar os variantes:

[Ala<sup>357</sup> Arg<sup>358</sup>]  $\alpha_1$ -AT glicosilado

[delta 1 5] [Arg<sup>358</sup>]  $\alpha_1$ -AT glicosilado

[delta 1 5] [Ala<sup>357</sup> Arg<sup>358</sup>]  $\alpha_1$ -AT glicosilado e

25 [Arg<sup>358</sup>]  $\alpha_1$ -AT glicosilado.

Estes variantes da  $\alpha_1$ -AT serão úteis como medicamentos, em particular para a substituição da  $\alpha_1$ -AT obtida por meio de extracção a partir do plasma, e alguns deles como inibidores da calidreína.

Os exemplos que se seguem destinam-se mais particularmente a evidenciar as construções utilizáveis no âmbito do presente invento.

35 EXEMPLO 1:

1 CONSTRUÇÃO DO ADN DO pTG1952

O plasmídeo pTG1952 tem a estrutura seguinte:

5 Na extremidade 5' do cADN da alfa<sub>1</sub>-AT encontra-se a  
sequência sinal (ss), uma sequência que é responsável pela  
exportação da proteína para o exterior da célula. Durante a  
maturação da proteína, esta sequência é clivada para produzir  
a proteína nativa. Esta construção contém também o codão ar-  
ginina no amino-ácido 358. A clivagem deste plasmídeo por  
10 BglII produz um fragmento de 1,3 Kb que contém o conjunto do  
cADN da alfa<sub>1</sub>-AT e a sequência sinal.

EXEMPLO 2:

15 PREPARAÇÃO DO pTG1954 ( figura 1)

O plasmídeo pTG186 contém o gene que codifica para a  
proteína da timidina quinase do vírus da vacina. Um fragmento  
de ADN de pequena dimensão que contém o promotor 7,5 K do ví-  
20 rus da vacina (VP) e um "polylinker" que tem diferentes lo-  
cais de restrição, entre os quais BamHI, foram colocados no  
gene da timidina quinase conforme é indicado adiante.

O fragmento 1,3 Kb BglII de pTG1952 é inserido no  
local BamHI do pTG186 para produzir o plasmídeo pTG1954.

25 A orientação do fragmento BglII inserido é estudado  
utilizando o local BamHI no cADN da alfa<sub>1</sub>-AT e permite que o  
terminal amino-ácido desta sequência de cADN esteja próximo  
do promotor viral VP.

30 EXEMPLO 3:

TRANSFECCÃO DO pTG1954 NO VÍRUS DA VACINA

35 Efectuaram-se a produção e selecção dos vírus de va-  
cina recombinantes TK<sup>-</sup> utilizando o pTG1954 por meio das téc-

1 nicas conhecidas que estão descritas, em particular, nas pa-  
tentes PCT FR 85/00096 e WO 85/05376. Escolhem-se 8 placas e  
utilizam-se para infectar mono-camadas de células BHK em cul-  
tura de tecidos orgânicos.

5 O ADN é preparado a partir das células infectadas com  
recombinantes do vírus da vacina TK<sup>-</sup> por meio de técnicas co-  
nhecidas. Depois de restrição com HindIII, o ADN é submetido  
à electoforese sobre um gel de agarose a 0,8%. O ADN é trans-  
ferido sobre nitrocelulose e o gene da alfa<sub>1</sub>-AT é detectado  
10 com nucleótidos específicos fosforilados no <sup>32</sup>P.

Os 8 vírus recombinantes TK<sup>-</sup> mostraram ter integrado o  
cADN da alfa<sub>1</sub>-AT no gene TK. Escolhe-se um destes para estudo  
mais amplo.

15 EXEMPLO 4:

EXPERIÊNCIA DE UM MEIO DEPOIS DE INFECÇÃO DAS CÉLULAS BHK COM  
UM RECOMBINANTE VACINA QUE CONTÉM pTG1954

20 Inibição da trombina

Depois de incubação a 37°C durante 24 horas, o meio é  
centrifugado para eliminar as células e os detritos celulares  
e experimentam-se alíquotas quanto à sua capacidade para ini-  
bir a trombina.

25 A experiência efectua-se em tinas de 1 ml numa solução  
que contém 150 mM NaCl, 100 mM Tris pH 8,0 e 0,1% de PEG (tam-  
pão TB). A trombina (240 mU) é incubada num tampão TB com di-  
ferentes quantidades de meio, durante 20 minutos à temperatu-  
ra ambiente. A quantidade de actividade trombínica que resta,  
30 é medida por meio da utilização de 100 µl de substrato (Cro-  
mozima TH Boehringser Mannheim; 100 nanomoles) e medindo a mo-  
dificação da densidade óptica a 410 nanómetros, após 4 minu-  
tos. A curva obtida a partir de uma experiência típica está  
indicada na figura 2A. Obtêm-se 50% de inibição com esta quan-  
35 tidade de trombina (240 mU) com 150 µl de meio. A curva 0—0  
representa o vírus recombinante e X—X o vírus selvagem.



### Inibição da calicreína

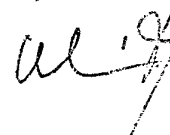
Efectua-se a inibição da calicreína de maneira análoga. A calicreína (4 mU) é incubada com diferentes quantidades de meio, durante 30 minutos, à temperatura ambiente, em tinhas que contêm 90  $\mu$ l de tampão calicreína (0,1 M fosfato de sódio (pH 6,5); 0,15 M NaCl). As experiências da actividade residual de calicreína efectuam-se por meio da adição de substrato (225 nanomoles) e as modificações na densidade óptica a 410 nanómetros são medidas após 4 minutos. A curva obtida a partir de uma experiência típica está representada na figura 2B. Obtêm-se 50% de inibição com esta quantidade de calicreína (4 mU) neste caso, com 120  $\mu$ l de meio.

#### EXEMPLO 5:

#### IMUNOPRECIPITAÇÃO DE ALFA<sub>1</sub>-AT (ARGININA VARIANTE) MARCADA NO <sup>35</sup>S PRODUZIDO POR CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Infectam-se mono-camadas de células BHK com 0,2 pfu de vírus vacina recombinante e em seguida incubam-se durante 6 horas a 37°C em 1 ml de meio que contém 100  $\mu$ Ci de metionina S<sup>35</sup>. Efectua-se um controlo com um vírus vacina selvagem. O meio é colhido como precedentemente e submetido a um desafio com anticorpos anti-alfa<sub>1</sub> antitripsina como segue. A 1 ml de meio junta-se tampão RIPA (1MKCl), 2% Triton X-100, 100 mM Tris pH 8,0) e 5  $\mu$ l de anticorpos alfa-antitripsina (Dako Immunoglobulins, Dinamarca) e deixa-se repousar a mistura durante 2 horas a 25°C.

Adicionam-se então 50  $\mu$ l de tampão RIPA contendo 8 mg de proteína A sefarose previamente equilibrada e deixa-se a mistura incubar durante 1 hora a 25°C, possivelmente com agitação. A sefarose proteína A é então colhida por meio de centrifugação e o depósito é lavado 5 vezes com 0,5 M KCl, 10 nM Tris-HCl pH 8,8 0,5% Triton X-100 e 2 vezes com 2 x 10 mM



1 Tris KCl pH 8,8. Os depósitos são dissolvidos em 100 µl de  
tampão Laemmli e colocam-se 20 µl num gel de poliacrilamida  
a 10% que é depois autoradiografado após fluorografia.

5 Segundo um perfil de gel típico (Figura 3) e em compa-  
ração com uma imunoprecipitação que utiliza a antitripsina-  
-alfa<sub>1</sub> marcada metionina, obtida a partir de um extracto bac-  
teriano, pode observar-se que se precipitou especificamente  
uma proteína a partir do meio de células infectadas com os  
10 vírus vacina recombinantes. Esta proteína não está presente  
nos extractos celulares a partir de vírus da vacina selvagem.  
No entanto, esta proteína, reconhecida pelos anticorpos anti-  
-alfa<sub>1</sub>-AT, é maior que a encontrada nos extractos celulares  
bacterianos, o que constitui uma indicação de que a alfa<sub>1</sub>-AT  
15 variante arginina produzida nas células de mamíferos foi gli-  
cosilada.

#### EXEMPLO 6:

20 Utilizando em vez do plasmídeo pTG1952, os plasmídeos  
descritos na patente WO 86 00337, obtêm-se os variantes cor-  
respondentes glicosilados.

Por exemplo, o pTG1981 que é idêntico ao pTG1954, ape-  
nas com a diferença de o gene introduzido em [Ala<sup>358</sup> - Arg  
25 <sup>358</sup>] alfa<sub>1</sub>-AT ter sido construído da mesma maneira.

Os resultados dos ensaios de inibição da trombina e da  
30 calicreína para o sobrenadante, foram representados na figu-  
ra 4. Conforme foi observado para a [Ala<sup>357</sup> - Arg<sup>358</sup>] alfa<sub>1</sub>-  
-AT produzida pelo E. Coli, o produto segregado a partir de  
células BHK é activado sobre calicreína, mas tem pouca ou  
nenhuma actividade inibidora relativamente à trombina.

O depósito do primeiro pedido para o invento acima des-  
crito foi efectuado em França, em 2 de Julho de 1986, sob o  
n.º. 86 09608.



1 acordo com uma das reivindicações 6 e 7 num meio apropriado e  
se recuperar a variante da alfa<sub>1</sub>-AT obtida.

9ª. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracte-  
rizado por se preparar as variantes da alfa<sub>1</sub>-AT

5

[ AA<sup>357</sup> ] alfa<sub>1</sub>-AT

[ AA<sup>358</sup> ] alfa<sub>1</sub>-AT

[ AA<sup>357</sup> AA<sup>358</sup> ] alfa<sub>1</sub>-AT

10 e as variantes de [ delta 1 → 5 ] alfa<sub>1</sub>-AT correspondentes  
na forma glicosilada.

10ª. - Processo de acordo com a reivindicação 9, ca-  
racterizado por as variantes serem

15

[ Ala<sup>357</sup> Arg<sup>358</sup> ] alfa<sub>1</sub>-AT glicosilada

[ delta 1 → 5 ] [ Arg<sup>358</sup> ] alfa<sub>1</sub>-AT  
glicosilada

20

[ delta 1 → 5 ] [ Ala<sup>357</sup> Arg<sup>358</sup> ] alfa<sub>1</sub>-  
-AT glicosilada,

+ [ Arg<sup>358</sup> ] - alfa<sub>1</sub>-AT glicosilada.

25

Lisboa, -2-~~2~~ JUL. 1987

Por TRANSGENE S.A., Société Anonyme

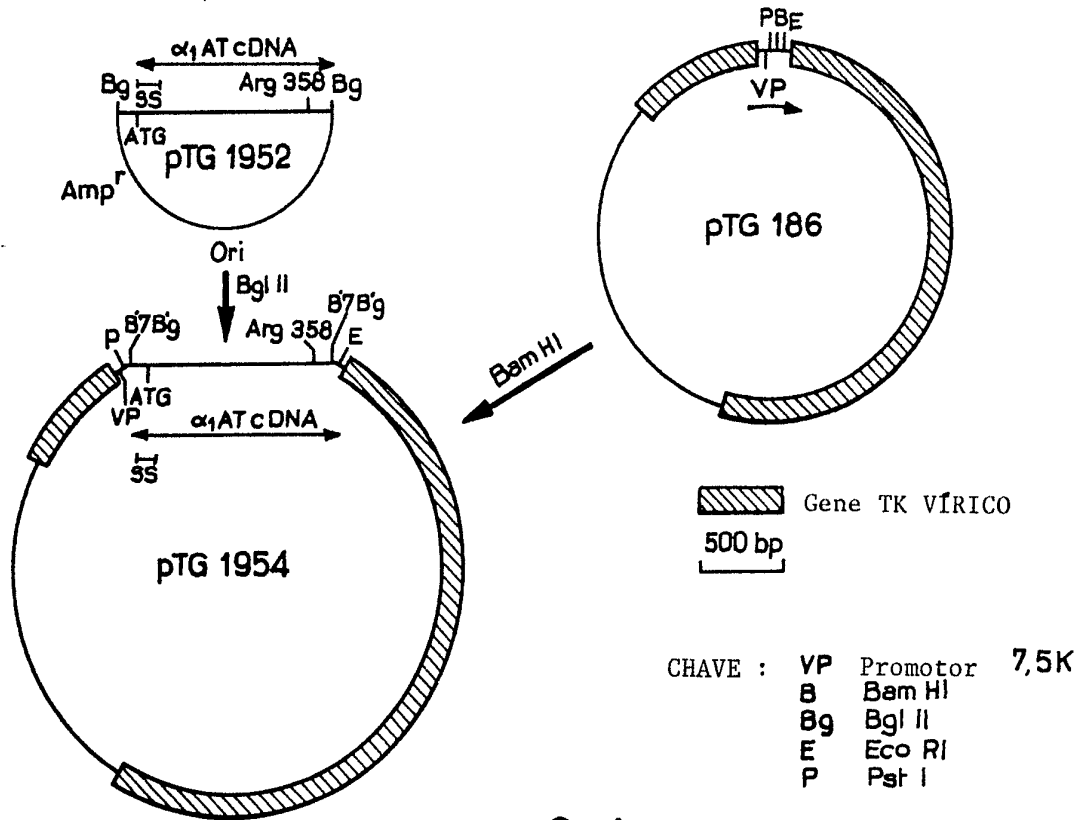
O AGENTE OFICIAL

30

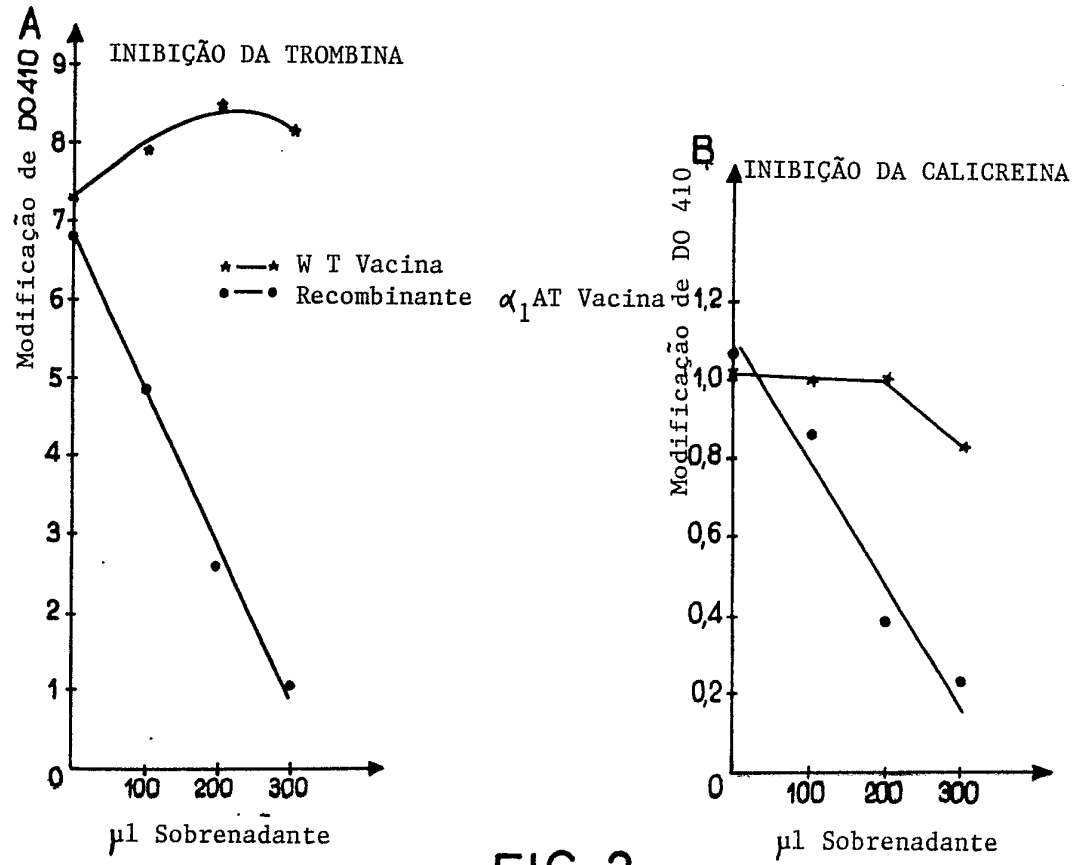


35

*Handwritten signature*

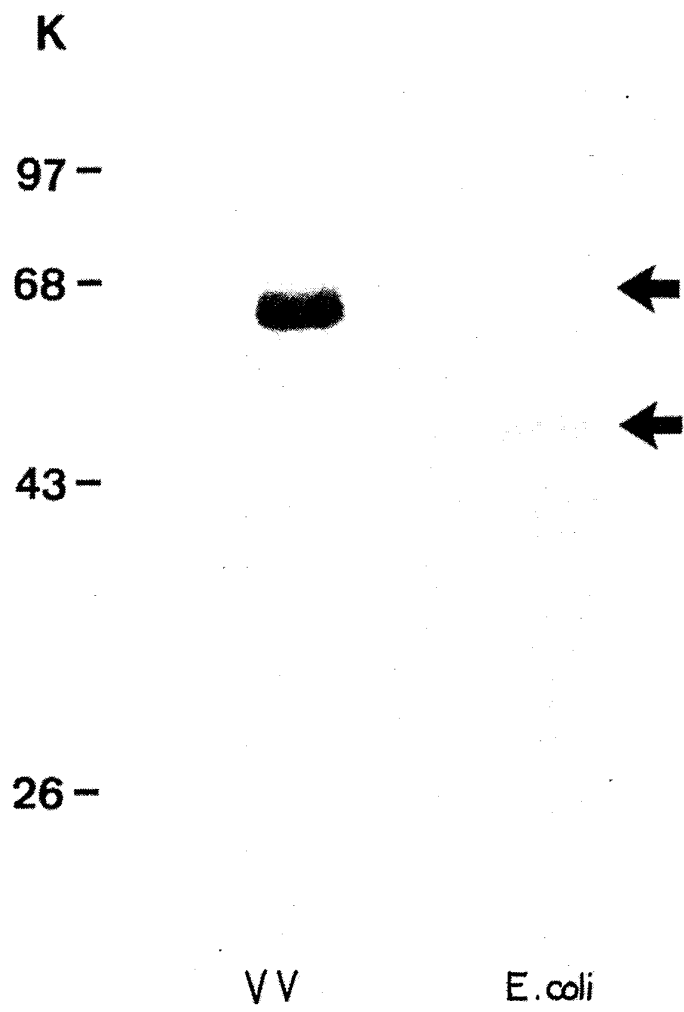


**FIG\_1**



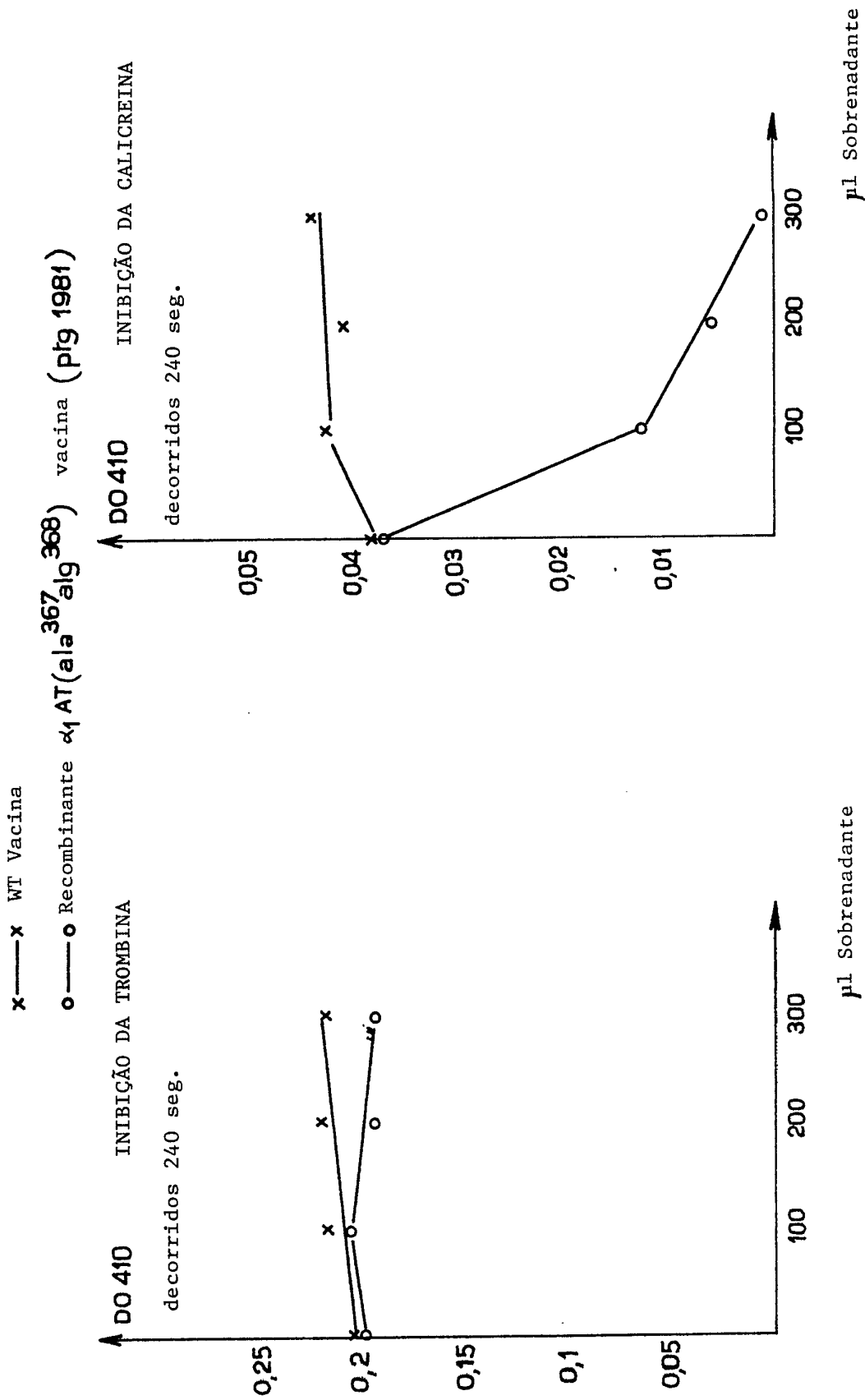
**FIG\_2**

6507  
-2 JUL 1997  
*al*



FIG\_3

*alif*



**FIG-4**