



(19) INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PORTUGAL

(11) Número de Publicação: PT 93441 B

**(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)**

**C12N015/87 A**                           **A61K047/48 B**

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) <i>Data de depósito:</i>	1990.03.15	(73) <i>Titular(es):</i>
(30) <i>Prioridade:</i>	1989.03.16 AT 610/89	BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH.
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i>	1990.11.07	POSTFACH 200 D-6507 INGELHEIM AM RHEIN DE
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i>	10/96 1996.10.15	(72) <i>Inventor(es):</i>
		HARTMUT BEUG AT MAX L. BIRNSTIEL AT MATTHEW COTTON AT ERNST WAGNER AT
		(74) <i>Mandatário(s):</i>
		JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT

**(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVOS CONJUNTOS PROTEÍNA-POLICATIÃO E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM**

**(57) Resumo:**

## **CONJUGADOS; PROTEINA-POLICATIÃO; POLIPEPTÍDEOS-QUIMÉRICOS; COMPLEXOS SOLÚVEIS**

[Fig.]

MEMÓRIA DESCRIPTIVA

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 93 441

NO<sup>M</sup> : BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, alemã,  
com sede em D-6507 Ingelheim am Rhein, República  
Federal da Alemanha

EPIGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVOS CONJUGADOS  
PROTEINA-POLICATIÃO E DE COMPOSIÇÕES FARMACEU-  
TICAS QUE OS CONTÊM"

INVENTORES: Dr. Hartmut Beug, Prof. Dr. Max L. Birnstiel,  
Dr. Matthew Cotten e Dr. Ernest Wagner, resi-  
dentes na Austria.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo  
42 da Convenção da União de Paris de 20 de Março de 1883.  
Austria - 16 de Março de 1989, sob o número A 610/89.

Descrição da patente de invenção de BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, alemã, industrial e comercial, com sede em D-6507 Ingelheim am Rhein, República Federal Alemã, (inventores: Dr. Hartmut Beug, Prof. Dr. Max. L. Birnstiel, Dr. Matthew Cotten e Dr. Ernest Wagner, residentes na Austria), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVOS CONJUGADOS PROTEINA-POLICATIÃO E DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE OS CONTÊM"

Descrição

A invenção refere-se ao transporte de substâncias afins de policatiões, especialmente de ácidos nucleicos, para o interior das células, transporte esse que decorre por meio de endocitose mediada por receptores.

Verificou-se que os ARNs e os ADNs anti-sentido (antisense) são agentes activos para a inibição selectiva de determinadas sequências génicas em sistemas isentos de células bem como no interior das células vivas. O modo de acção baseia-se no reconhecimento específico de uma cadeia de ácido nucleico complementar e na acumulação deste, prejudicando deste modo a transcrição, a tradução e o

processo de cisão. Este mecanismo de acção possibilita basicamente a utilização de oligonucleótidos anti-sentido que bloqueiam in vivo a expressão de determinadas genes (como sejam oncogenes desregulados ou genes virais) para fins terapêuticos. Já tinha sido demonstrado que é possível importar para o interior das células oligonucleótidos anti-sentido curtos e que a actividade inibitória destes pode ser aí exercida (Zamecnik et al., 1986), mesmo que a respectiva concentração intracelular seja reduzida, entre outras razões por causa da absorção limitada através da membrana celular em virtude da forte carga negativa dos ácidos nucleicos.

Um outro modo de inibição selectiva de genes baseia-se na utilização de ribozimas, que são moléculas de ARN que reconhecem determinadas sequências de ARN, se ligam a estas sequências e podem provocar a sua cisão. Também neste caso subsiste a necessidade de garantir uma concentração tão alta quanto possível de ribozimas activas nas células, sendo o transporte para o interior das células um factor limitante para esse fim.

A fim de contrariar a acção deste factor limitante foram já propostas várias soluções.

Uma destas soluções consiste em modificações directas dos ácidos nucleicos, por exemplo por substituição dos grupos fosfodiéster carregados por grupos metilfosfonato não carregados (Smith et al., 1986), por compostos de sililo (Cotmier et al., 1988) ou por fosfotionatos (Stern et al., 1988). Uma outra possibilidade de modificação directa consiste na utilização de análogos de nucleósidos (Morvan et al., 1988, Praseuth et al., 1988).

Se bem que algumas destas propostas possam contribuir basicamente de modo prometedor para a solução do problema, também apresentam diferentes inconveni-

entes, por exemplo uma ligação reduzida à molécula visada bem como um grau mais reduzido da própria actividade inibitória. Um inconveniente importante na utilização *in vivo* de oligonucleótidos modificáveis é constituido pela possível toxicidade destes compostos.

Uma solução alternativa para a modificação directa dos oligonucleótidos é constituída por deixar o oligonucleótilo propriamente dito sem alteração e ligá-lo a um grupo que lhe confira as propriedades pretendidas, por exemplo com moléculas que facilitem o transporte para o interior das células. Uma destas propostas de solução no quadro destes princípios consiste em conjugar o oligonucleótilo com compostos policatiónicos (Lemaitre et al., 1987).

Para a transformação genética de células de mamífero *in vitro* são conhecidas diferentes técnicas cujas possibilidades de utilização *in vivo* no entanto é reduzida (podendo ser referidas as técnicas de introdução de ADN por meio de vírus e os métodos de lipossomas, electroporação, microinjecção, fusão celular, DEAE-dextrano ou fosfato de cálcio-precipitação).

Já foram empreendidas investigações a fim de desenvolver um sistema solúvel utilizável *in vivo* que transporte o ADN dirigido para o interior das células por meio de endocitose mediada por receptores (G. Y. Wu, C.H. Wu, 1987). Este sistema foi desenvolvido para hepatócitos e baseia-se essencialmente nos seguintes factos:

1. Sobre a superfície dos hepatócitos existem receptores que se ligam a determinadas glicoproteínas e as transportam para o interior das células.
2. O ADN pode ser ligado por meio de fortes campos electrostáticos recíprocos com formação de comple-

xes de compostos policationicos, por exemplo polilisina.

O sistema baseia-se no principio de acoplar a polilisina a uma glicoproteína tal que corresponde ao receptor e em seguida formar um complexo solúvel glicoproteína/polilisina/ADN que seja transportado para as células que apresentam receptores de glicoproteínas e após a absorção do complexo pelas células possibilite a expressão da sequência de ADN.

O objectivo da presente invenção consiste em proporciona um sistema de transporte de alta actividade com um campo de utilização mais alargado ao contrário do sistema conhecido referido que, por causa do carácter específico do receptor sobre um único tipo de células, só pode ser utilizado neste tipo.

Este objectivo é alcançado de acordo com o processo da presente invenção por meio da ligação do policatión à transferrina.

As transferrinas são uma classe de glicoproteínas modificadas que possuem a capacidade de se ligarem a metais com uma especificidade in vivo para o ferro. Foram identificadas diferentes transferrinas de mamíferos, sendo a transferrina do plasma a responsável pelo fornecimento de ferro aos tecidos corporais principais. O órgão mais importante para a produção de transferrina é o fígado.

A transferrina apresenta um peso molecular de cerca de 80000, correspondendo cerca de 6 % deste peso aos resíduos de açúcar. Uma molécula de transferrina pode ligar duas moléculas de ferro, podendo a ligação ter lugar na presença de iões de carbonato ou de bicarbonato.

O receptor de transferrina, de que existem possivelmente formas com pequenas diferenças - como

por exemplo nos grupos de hidratos de carbono, é uma glicoproteína de transmembrana com um peso molecular de cerca de 180000, podendo uma molécula de receptor ligar-se a uma ou possivelmente a duas moléculas de transferrina.

O receptor de transferrina possui a valores de pH fisiológicos de 7,4 uma afinidade muito elevada para o complexo  $Fe_2$ -transferrina, uma afinidade mais reduzida para o complexo Fe-transferrina e praticamente nenhuma afinidade para a aprotransferrina, embora esta forme a pH  $\approx 5$  um complexo muito aceitável com o receptor.

Os receptores de transferrina foram detectados em número especialmente elevado em precursores de eritrócitos, na placenta e no fígado e ainda em número mensurável em muitos outros tecidos do corpo. É de especial interesse a observação de que o receptor em células em crescimento é altamente regulado. Também se observou que o número de receptores em tecidos neoplásticos *in vivo* se encontra consideravelmente aumentado em comparação com lesões benignas, o que indica uma necessidade de ferro mais elevada. O mecanismo de absorção do complexo transferrina-ferro pelos receptores e o seu círculo intracelular encontram-se bem esclarecidos.

Não existe ainda uma compreensão completa de como decorre exactamente a absorção da molécula de ferro por meio da transferrina, embora predomine a opinião de que a absorção é feita principalmente por via intracelular. Num processo dependente de energia e da temperatura os complexos Fe-transferrinas ou  $FE_2$ -transferrina são ligados na membrana celular nos receptores. Em seguida o complexo é englobado numa vesícula, chamada endossoma ou receptossoma. Esta vesícula reune-se a outra vesícula que apresenta um valor de pH  $< 5,5$ ; a acidez resultante provoca a libertação do ferro da transferrina. O complexo apotransferrina-receptor é em seguida transportado novamente em sen-

tido contrário através da membrana celular, onde o valor de pH neutro provoca a separação entre a apotransferrina e o receptor no meio circundante. Existem indicações de que a reciclagem, cujo funcionamento se baseia nas diferentes afinidades do receptor para a apotransferrina e para a ferro-transferrina, segundo o valor do pH é ácido ou neutro, é levado a efeito em vesículas do aparelho de Golgi.

Não se encontra ainda esclarecido ao nível molecular como se desencadeia o ciclo da transferrina; simplesmente no que diz respeito a alguns aspectos existem indicações, por exemplo sobre o possível papel da fosforilação (Huebers et al., 1987).

Com o auxílio da presente invenção consegue-se pela primeira vez utilizar este sistema de transporte activo a fim de fornecer às células ácidos nucleicos que de outro modo encontrariam resistência que dificultaria a sua absorção pela célula.

Deste modo é um objectivo da presente invenção a preparação de novos conjugados proteína-polímero que possuem a capacidade de formar complexos com substâncias que apresentam afinidade para com polímeros, especialmente ácidos nucleicos ou análogos de ácidos nucleicos, sendo estes complexos absorvidos pelas células por meio de endocitose mediada por receptores, de tal modo que a fração proteica do conjugado é constituida por transferrina.

Surpreendentemente verificou-se que com a ajuda dos conjugados da presente invenção é possível efectuar de modo eficaz o transporte de ácidos nucleicos para o interior das células conservando a sua actividade inibitória.

Por "transferrina" entende-se no quadro da presente invenção tanto as transferrinas naturais como as transferrinas modificadas que se ligam aos receptores e

são transportados para o interior das células (estas modificações podem por exemplo ser constituidas por uma alteração de ácidos aminados ou por um encurtamento da molécula na fracção determinante para a ligação ao receptor).

A proporção molar transferrina:policatião é de preferência de 10:1 a 1:4, sendo de tomar em consideração que se podem formar agregados. Esta proporção pode no entanto ser tomada em relação a limites mais amplos, desde que seja satisfeita a condição de que tem lugar a complexão do(s) ácido(s) nucleico(s) e se garanta que o complexo formado pelo receptor de transferrina se liga e é fornecido à célula, o que pode ser verificado por meio de experiências simples praticáveis conforme os casos.

A proporção escolhida em cada caso depende principalmente da dimensão da molécula de policatião bem como do número e da distribuição dos agrupamentos carregados positivamente, dos critérios, da dimensão, da estrutura bem como das eventuais modificações existentes que forem introduzidas no(s) ácido(s) nucleico(s) a transportar. Os policatiões podem ser iguais ou diferentes.

Os policatiões usados podem ser seleccionados de entre os seguintes compostos:

- a) Protaminas: Neste caso trata-se de proteínas de pequena dimensão (P.M. até cerca de 8000) e fortemente básicos cujos resíduos de ácidos aminados de carga positiva (principalmente arginina) se encontram habitualmente em grupos e neutralizam a carga negativa dos ácidos nucleicos em virtude do seu carácter poliacidônico (Warrant et al., 1978). As proteínas utilizáveis no quadro da presente invenção podem ser de origem natural ou ter sido preparadas por via recombinante, podendo neste caso ser preparadas várias cópias ou introduzidas modificações

no que respeita à dimensão da molécula e à sequência de ácidos aminados. Os compostos correspondentes podem também ser sintetizados por via química. Na síntese de uma protamina não natural é possível por exemplo proceder de tal modo que se substituam os resíduos de ácidos aminados que nas funções da protamina natural são indesejáveis para a função de transporte (por exemplo condensação de ADN) por outros ácidos aminados apropriados e/ou é possível colocar numa extremidade um ácido aminado (por exemplo cisteína) que possibilite a conjugação dirigida com a transferrina.

- b) Histonas: Estas são pequenas proteínas que se ligam a ADN existentes na cromatografia com uma alta fracção de ácidos aminados carregados (lisina e arginina) que possuem a capacidade, independentemente da sequência de nucleótidos, de se ligarem a ADN e de provocar o respectivo enrolamento em nucleossomas. sendo especialmente apropriado as histonas H3 e H4 ricas em arginina (Felsenfeld, 1978). Com respeito à preparação e às modificações é válido basicamente o que foi dito sobre as protaminas.
- c) Polipeptideos sintéticos, como polipeptideos homólogos (polilisina e poliarginina) ou polipeptídeos heterólogos (formados por dois ou mais ácidos aminados substituídos com cargas positivas).
- d) Catiões não peptídicos como polietileniminas.

A dimensão dos policatiões é de preferência escolhida de tal modo que a soma das cargas positivas é de cerca de 20 a 500, sendo determinada de acordo com os ácidos nucleicos a transportar.

Os conjugados transferrina-policatião de acordo com a presente invenção podem ser preparados por

via química ou, no caso do polipeptídeo ser um polipeptídeo, por via recombinante. O acoplamento por via química pode ser levado a efeito de um modo conhecido apropriado para o acoplamento de peptídeo, sendo se necessário os componentes isolados feitos reagir com substâncias promotoras de ligação antes da reacção de acoplamento (esta medida é necessária se no início não estiver disponível qualquer grupo funcional, por exemplo um grupo mercapto ou álcool. As substâncias promotoras de ligação podem ser compostos bifuncionais que são em primeiro lugar feitos reagir com grupos funcionais dos componentes isolados, sendo deste modo levado a efeito o acoplamento dos componentes modificados um a um.

De acordo com as propriedades dos conjugados, especialmente no que se refere à respectiva estabilidade, o acoplamento pode ser levado a efeito por meio de

- a) Pontes de dissulfureto, as quais em condições reduutoras podem ser novamente cindidas (por exemplo usando piridilditiopropionato de succinimidilo (Jung et al., 1981)).
- b) Compostos suficientemente estáveis sob condições biológicas (por exemplo tioéteres por reacção de ligantes de maleimido com grupos sulfidrilo do ligante ligado ao segundo componente).
- c) Pontes lábeis sob condições biológicas, por exemplo ligações de éster, ou ligações de acetal ou de cetal instáveis sob condições fracamente ácidas.

A preparação dos conjugados da presente invenção por via recombinante apresenta a vantagem de ser possível obter compostos homogéneos bem definidos, enquanto que no acoplamento químico resultam misturas de

conjugados que tem de ser separados.

A preparação por via recombinante dos conjugados da presente invenção pode ser levada a efeito por meio de métodos conhecidos para a preparação de polipeptídeos químicos. Nesta preparação é possível variar os polipeptídeos policartionicos no que se refere à respectiva dimensão e à sequência de ácidos aminados. A preparação por tecnologia genética apresenta também a vantagem de que é possível deste modo por exemplo modificar a fracção de transferrina do conjugado, sendo possível deste modo por exemplo por meio de mutações apropriadas aumentar a facilidade de ligação ao receptor ou encurtar a molécula na fracção de transferrina no sector responsável pela ligação ao receptor. É especialmente conveniente para a preparação por via recombinante dos conjugados da presente invenção a utilização de um vector que contenha a sequência que codifica para a fracção de transferrina bem como um poliadaptador, em que se encorpora a sequência que codifica para a polipeptídeo policationico necessário em cada caso. Deste modo é possível obter um conjunto de plasmídeos de expressão a partir dos quais em caso de necessidade se provoca a expressão dos conjugados da presente invenção que contém a sequência pretendida.

No que se refere aos ácidos nucleicos a transportar para o interior das células pode tratar-se de ADN ou de ARNs, não existindo qualquer limitação com respeito à sequência nucleotídica. Os ácidos nucleicos podem ser modificados desde que a modificação não prejudique o carácter polianiónico dos ácidos nucleicos; entre essas modificações contam-se por exemplo a substituição dos grupos diésteres fosfóricos por fosfotiaoato ou a utilização de análogos de nucleósidos.

Os ácidos nucleicos a considerar no quadro da presente invenção são principalmente os que podem

ser transportados para o interior da célula com o fim de inibir sequências específicas de genes. Neste número contam-se oligonucleótidos anti-sentido e ribozimas, eventualmente em conjunto com um ácido nucleico de transporte.

Com respeito à dimensão dos ácidos nucleicos, a presente invenção possibilita igualmente a utilização de uma ampla gama. No que se refere ao limite inferior não existe qualquer limitação dependendo do sistema de transporte da presente invenção; uma eventual limitação inferior resulta de razões específicas do modo de utilização, porque por exemplo os oligonucleótidos anti-sentido abaixo de 10 nucleótidos raramente podem ser considerados para utilização por causa da sua reduzida especificidade. Com o auxílio dos conjugados da presente invenção é possível também fornecer plasmídeos às células, sendo especialmente importantes os plasmídeos de pequena dimensão que podem ser utilizados na sua função de transportadores de ácidos nucleicos (possivelmente vectores retrovirais até um máximo de 5000 pb). É também possível fornecer às células simultaneamente diferentes ácidos nucleicos com o auxílio dos conjugados da presente invenção.

Uma outra vantagem da presente invenção reside na circunstância de que existem polimorfismos entre a transferrina e o receptor que podem ser aproveitados para o transporte dirigido a um objectivo de ácidos nucleicos inibidores para determinadas células.

No quadro da presente invenção foi possível demonstrar que os conjugados transferrina-policatião são absorvidos e são internalizados de forma eficaz pelas células vivas. Os conjugados e os complexos da presente invenção não são prejudiciais para o crescimento celular. Este facto possibilita uma administração repetida e em consequência uma expressão constante elevada do gene introduzido na célula.

Para além disso foi possível demonstrar que os conjugados policatíao-transferrina podem substituir o complexo transferrina-ferro nativo de modo funcional. Confirmou-se com o auxílio do gene de luciferase como componente de ADN que os complexos transferrina-policatíao//ADN são absorvidos pelas células através do receptor de transferrina. Demonstrou-se que a transferrina nativa desloca eficazmente o complexo transferrina-policatíao//ADN, o que foi medido por meio da redução de actividade de luciferase na célula.

Por meio das investigações levadas a efeito no quadro da presente invenção foi também possível demonstrar que é possível introduzir em células de galinha transformadas por erbB um gene de ARNt-ribozima (a ribozima foi dirigida contra uma sequência V-erbB) com o auxílio de um conjugado da presente invenção (polilisina-transferrina) e enfraquecer a actividade de transformação do oncogene. Este resultado é significativo uma vez que nestas investigações apenas se usou uma quantidade reduzida de gene de ribozima.

A proporção ácido nucleico : conjugado pode variar num domínio amplo, não devendo ser necessário neutralizar sem limite a carga total dos ácidos nucleicos. Esta proporção deve ser ajustada em cada caso de acordo com critérios de dimensão e estrutura dos ácidos nucleicos a transportar, dimensão do policatíao, número e distribuição das suas cargas de modo a que exista uma proporção entre a transportabilidade e a actividade biológica dos ácidos nucleicos favorável para cada utilização. Esta proporção pode ser em primeiro lugar ajustada apenas aproximadamente, como seja por meio de retardamento da velocidade de migração do ADN num gel (por exemplo por meio do desvio de mobilidade (mobility shift) num gel de agarose) ou por meio de centrifugação de gradiente de densidade. Após obtenção desta proporção preliminar que pode vantajose ser, com

respeito à actividade máxima utilizável nas células, levar a efeito ensaios de transporte de ácidos nucleicos com o complexo marcado com radioisótopos, e eventualmente reduzir a fracção do conjugado de tal modo que as cargas negativas restantes não sejam impeditivas do transporte dos ácidos nucleicos para o interior das células.

A preparação dos complexos transferrina-policatão/ácido nucleico, que é igualmente um objectivo da presente invenção, pode ser efectuada mediante a utilização de métodos conhecidos para a complexação de compostos poliénicos. Uma possibilidade de evitar a agregação ou a precipitação descontrolada consiste em misturar em primeiro lugar os dois componentes numa concentração elevada de cloreto de sódio (cerca de 1 molar) e em seguida ajustar a concentração de sal até um nível fisiológico por meio de diálise ou de diluição. Na reacção de formação de complexos são usadas de preferência elevadas concentrações de ADN e de conjugado (superiores a 100 µg/ml) a fim de evitar uma precipitação dos complexos.

A fracção de ácido nucleico do complexo transferrina-policatão-ácido nucleico da presente invenção é de preferência um ADN anti-sentido, um ARN anti-sentido ou uma ribozima ou o gene que codifica para uma ribozima. Na utilização de ribozimas e de ARNs antisentido é especialmente vantajoso utilizar os genes que codificam para os ARNs que inibem esta função do ARN, de preferência em conjunto com um gene de transporte. Por meio da introdução do gene nas células garante-se uma amplificação em alto grau do ARN, em comparação com a importação simples do ARN na célula, e deste modo um abastecimento suficiente para a inibição pretendida da reacção biológica. São genes de transporte especialmente apropriados as unidades de transcrição necessárias para a transcrição por meio da polimerase III, por exemplo ARNt-genes, é possível introduzir nestas unidades por exemplo genes de ribozimas de tal modo que na transcrição a fracção de ribo-

zima é um produto transcrito compacto de polimerase III. Com o auxílio do sistema de transporte de acordo com a presente invenção é possível reforçar a actividade destas unidades genéticas garantindo uma concentração de partida mais elevada do gene nas células.

E ainda um objectivo da presente invenção um processo para a introdução de ácido(s) nucleico(s) em células humanas ou animais, sendo de preferência formado um complexo solúvel em condições fisiológicas.

E ainda um outro objectivo da presente invenção um processo para a preparação de composições farmacêuticas por incorporação como ingrediente activo de um ácido nucleico que inibe de modo específico um gene, complexado com um conjugado transferrina-policatídeo, por exemplo sob uma forma liefilizada. Estas composições farmacêuticas podem ser usadas a fim de inibir com oligonucleótides anti-sentido, análogos de oligonucleótidos anti-sentido ou ribozimas ou os ADNs que as codificam, eventualmente em conjunto com um ácido nucleico de transporte, no organismo humano ou de animais, vírus patogénicos, como o HIV ou retrovírus parentados, oncogenes ou outros genes fundamentais que controlam o crescimento e/ou a diferenciação das células, por exemplo o gene c-fos ou o gene c-myc.

Um outro domínio de utilização é o combate a doenças pela inibição da produção de produtos gênicos indesejados, por exemplo da proteína principal das placas ("major plaque protein") que ocorre na doença de Alzheimer ou de proteína ocasionalmente ocasionadas por doenças auto-imunes.

A presente invenção é ilustrada por meio dos exemplos que se seguem.

•  
•  
•

Exemplo 1

**Preparação de conjugados transferrina-polilisina 90**

O acoplamento foi efectuado de modo análogo ao método conhecido da literatura (Jung et al., (1981)) por introdução de pontes de disulfureto após modificação com pirididitiopropionato de succinimidilo.

- a) **Transferrina modificada por 3-(2-piridiltio)-propionato:**

Trataram-se 6 ml de uma solução filtrada através de gel de Sephadex G-25 de 120 mg (1.5  $\mu$ mol) de transferrina (de clara de ovo de galinha), Sigma, Conalbumina Tipo I, isenta de ferro) em 3 ml de tampão de fosfato de sódio 0.1 M (pH 7,8) com agitação vigorosa com 200 ul de uma solução etanólica 15 mM de 3-(2-piridilditio)-propionato de succinimidilo (3  $\mu$ M, SPD, Pharmacia) e deixou-se reagir durante 1 hora à temperatura ambiente e com agitação ocasional. Eliminaram-se os produtos reacionais e os resíduos da reacção de baixo peso molecular através de uma coluna de gel (Sephadex G-25, 14 x 180 mm, tampão de fosfato de sódio 0,1 M pH 7.8) e obtiveram-se 7 ml das fracções do produto; o conteúdo de resíduos de piridilditiopropionato ligados a transferrina numa aliquota após redução com ditiotreitol por determinação fotométrica da quantidade de piridina-2-tiona libertada era de cerca de 2,6  $\mu$ mol.

De modo análogo modificaram-se transferrina humana (Sigma, isenta de ferro).

- b) **Polilisina 90 (pL 90) modificada por mercaptopropionato:**

Filtrou-se uma solução de 18 mg (cerca de 1.0  $\mu$ mol) de bromidrato de poli(L)lisina (Sigma, marcada por isoftiocianato de fluoresceina (=FITC), peso molecular cerca de 18000 / correspondente a um grau de polimerização médio de cerca de 90) através de Sephadex G-25 (a marcação fluorescente foi realizada em tampão de bicarbonato de sódio a pH 9 durante 3 h). Diluiu-se a solução de polilisina com água até 7 ml, tratou-se com boa agitação com 270  $\mu$ l de uma solução etanólica de 15 mM de SPDP e deixou-se reagir durante 1 h ao abrigo da luz à temperatura ambiente e com agitação ocasional. Após adição de 0,5 ml de tampão de acetato de sódio 1 M (pH 5,0) filtrou-se através de Sephadex G-25 para eliminação das substâncias de baixo peso molecular (Eluente: tampão de acetato de sódio 20 mM de pH 5,0). Concentrou-se à secura sob vácuo o produto da filtração (coloração por ninidrina, fluorescência), ajustou-se com tampão a cerca de pH 7, adicionou-se uma solução de 23 mg (150  $\mu$ mol) de ditiotreitol em 200  $\mu$ l de água e deixou-se em repouso durante 1 h à temperatura ambiente sob atmosfera de argon e ao abrigo da luz. Separou-se o excesso de redutor por uma nova filtração em gel (Sephadex G-25, coluna de 14 x 130 mm, tampão de acetato de sódio 10 mM de pH 5,0) e obtiveram-se 3,5 ml de solução contendo o produto polilisina marcada por fluorescência com um conteúdo de 3,8  $\mu$ mol de grupos mercapto (determinação fotométrica por meio de reagente de Ellman, ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzólico)).

c) Conjugado transferrina - polilisina:

Purgou-se com argon a solução obtida em a) de transferrina modificada (7 ml em tampão de fosfato de sódio 0,1 M de pH 7,8, cerca de 1  $\mu$ mol de transferrina com cerca de 2,6  $\mu$ mol de resíduo de piridil-

ditiopropionato): adicionaram-se 2,0 ml de solução obtida em b) de polilisina modificada por mercapto (em tampão de acetato de sódio 10 mM de pH 5,0, que corresponde a cerca de 0,6 umol de polilisina com cerca de 2,2 umol de grupos mercapto), purgou-se com árgon, agitou-se e deixou-se reagir durante 18 horas à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Diluiu-se a mistura reacional com água até 14 ml e submeteu-se a cromatografia de permuta iônica (Coluna Pharmacia Mono S HR 10/10, eluição por gradiente, tampão A : HEPES 50 mM pH 7,9, tampão B ; A + cloreto de sódio 3 M, 0,5 ml/min, Fig. 1). A transferrina não conjugada foi eluída no início e as fracções contendo o produto foram obtidas a cerca de 0,66 a 1,5 M em cloreto de sódio.

Obtiveram-se nas fracções reunidas conjugadas que apresentam uma proporção transferrina-polilisina de 1,3:1.

Os produtos conjugados (coloração por minidrina, determinação da absorção da proteína em UV a 280 nm e da fluorescência da polilisina marcada por FITC a 495 nm) foram reunidos em 6 fracções com um conteúdo de 10 mg de transferrina cada.

Dialisaram-se em primeiro lugar as fracções contra uma solução de citrato de ferro (III) 100 mM (ajustado com hidrogenocarbonato de sódio a pH 7,8) e em seguida duas vezes contra tampão HEPES 1 mM (pH 7,5).

Por electroforese em gel de dodecilsulfato de sódio (10% de SDS, 8 % de poliacrilamida, ver Figura 2) verificou-se com pré-tratamento com 2-mercaptopetanol um conteúdo aproximadamente igual a transferrina (Fig. 2A), enquanto que nas amostras não reduzidas

não era visível qualquer banda de transferrina livre, mas apenas uma pequena quantidade de conjugados de migração rápida (Fig. 2B, T= transferrina não tratada; 1 a 6 = fracções de conjugados 1 a 6).

### Exemplo 2

Preparação de conjugados transferrina-polilisina 270 e transferrina-polilisina 450 (pL270 e pL450)

- a) Preparação de transferrina modificada foi efectuada de modo análogo ao do Exemplo 1 a)
- b) Preparação de polilisina modificada 270 e polilisina modificada 450

Ajustou-se a pH 8,5 por adição de tampão de carbonato de sódio uma solução filtrada por gel de 0,33 umol de polilisina 270 (com um grau de polimerização médio de 270 resíduos de lisina, com ou sem marcação por fluorescência; correspondente a 19 mg do bromidrato) em 1,2 ml de tampão de acetato de sódio 75 mM. Adicionaram-se 182 ul de uma solução etanolica de 15 mM de SPDP (1,9 umol) com agitação forte. Uma hora mais tarde adicionaram-se 200 ul de acetato de sódio 1 M a pH 5; após filtração por gel com acetato de sódio 20 mM obteve-se uma solução que continha 0,27 umol de polilisina 270 com 1,3 umol de grupos mercapto (4,8 ligantes por cadeia de polilisina).

De modo análogo modificaram-se 0,20 umol de polilisina 450 (com um grau médio de polimerização de 450 de resíduos de lisina) com 2,25 umol de SPDP, tendo obtido um produto de 0,19 umol de polilisina 450 com 2,1 umol de grupos mercapto (11 ligantes por cadeia de polilisina). De modo análogo ao do Exemplo 1 b) reduziram-se os grupos ditiopiridina

com ditiotreitol a fim de obter os componentes de sulfiridrilo livres.

c) Preparação de conjugados transferrina-polilisina

Preparam-se conjugados de transferina-polilisina 270 por mistura de 1,0  $\mu\text{mol}$  de transferrina modificada em tampão de fosfato 100 mM de pH 7,8 com 0,14  $\mu\text{mol}$  de polilisina 270 modificada (em tampão de acetato de sódio 20 mM) ao abrigo do oxigénio numa atmosfera de argón. Após 18 h à temperatura ambiente diluiu-se a mistura reaccional com água até um volume de 10 ml e por meio de cromatografia de permuta catiónica (coluna Pharmacia Mono 8 HR 10/10; eluição por gradiente, tampão A ; HEPES 50 mM pH 7,9 ; tampão B : A + cloreto de sódio 3 M; Absorção de UV a 280 nm e determinação da fluorescência, excitação a 480 nm, emissão a 530 nm), Nesta operação eluiu-se em primeiro lugar o excesso de transferrina não acoplada; as fracções contendo o produto foram eluídas entre 30 % e 50 % do gradiente de B e foram reunidas em 3 fracções de conjugado (proporção molar entre a transferrina e a polilisina: Conjunto A : 5,5 a 1 ; conjunto B : 3,4 a 1 : conjunto C : 1,8 a 1). Os conjugados foram obtidos num rendimento médio de 0,23  $\mu\text{mol}$  de transferrina com 0,075  $\mu\text{mol}$  de polilisina 270.

De modo análogo foram preparados conjugados de transferrina-polilisina 450 partindo de 1,2  $\mu\text{mol}$  de transferrina modificada de acordo com o Exemplo 1 a) (em HEPES 20 mM pH 7,9 contendo cloreto de cálcio 80 mM) e 71 nmol is polilisina 450 modificada por mercapto de acordo com o Exemplo 2 b) em tampão de acetato.

Efectuou-se a purificação da mistura reaccional por meio de cromatografia de permação em gel (coluna de

Pharmacia Superose 12, cloreto de guanidina 1 M a pH 7,3) e obteve-se após diálise (HEPES 20 mM pH 7,3, contendo cloreto de sódio 100 mM) um conjugado transferrina-polilisina, contendo 0,40 µmol de transferrina com 38 nmol de polilisina 450.

A incorporação de ferro foi efectuada por adição à amostra 6 de 12 µl de tampão de citrato de ferro 100 mM (contendo carbonato de sódio, ajustado a pH 7,8) por mg de fração de transferrina.

### Exemplo 3

#### a) Preparação de conjugados transferrina~~e~~protamina

A preparação de transferrina modificada foi efectuada de modo análogo ao do Exemplo 1 a)

#### b) Preparação de protamina modificada por 3-mercaptopropionato

A uma solução de 20 mg (3 µmol) de trifluoroacetato de protamina (preparada por cromatografia de permuta iônica de sulfato de protamina de salmão (= Salmin, Sigma) em 2 ml de DMSO e 0,4 ml de isopropanol, contendo 2,6 µl (15 µmol) de etildiisopropilamina, adicionou-se em várias porções no decurso de uma hora uma solução de 30 µmol de SPDP em 250 µl de isopropanol e 250 µl de DMSO. Após 3,5 h à temperatura ambiente evaporou-se a solução à secura sob alto vácuo e retomou-se em ácido acético a 0,5 % com um conteúdo de 10% de metanol. Por filtração em gel (Sephadex G10; ácido acético a 0,5 % com 10 % de metanol) obteve-se após lyophilização 16 mg (2,5 µmol) de acetato de protamina modificada com 2,5 µmol de ligante de ditiopiridina. Por redução de 1,75 µmol de protamina (contendo 1,75 µmol de adaptador) com

16 mg de ditiotreitol em tampão de bicarbonato de sódio de pH 7,5 durante 1 h sob argón seguida de ajuste do pH a 5,2 com tampão de acetato de sódio de pH 5,2 obteve-se uma solução de protamina modificada com 1,6 µmol de adaptador de mercaptopropionato.

c) Preparação de conjugados transferrina-protamina

Por reacção da solução de protamina obtida de acordo com b) (1,6 µmol de ligante) com 1,34 µmol de transferrina (modificada com 3,1 µmol de ligante de ditiopiridina) seguida de purificação por cromatografia de permuta catiónica, conforme descrito para os conjugados transferrina-polilisina, obtiveram-se quatro fracções A a D eluídas sucessivamente de produto, contendo 90, 320, 240 e 120 nmol respectivamente de transferrina modificada com quantidades crescentes de protamina (determinadas por meio de electroforese em gel de SDS; 10 % de SDS, 8 % de poliacrilamida, coloração por azul de Coomassie). Na Figura 3 apresenta-se o resultado da electroforese em gel de SDS. As fracções de conjugados Tfprot A a D apresentam bandas de migração lenta (a), enquanto que nas amostras reduzidas por  $\beta$ -mercaptoetanol (b) apenas era visível a banda de transferrina. Efectuou-se a diálise e a incorporação de ferro como para os conjugados transferrina-polilisina TfpL270 e TfpL450 descritos no Exemplo 2.

Exemplo 4

Preparação de complexos de conjugados transferrina-policatião com ADN

Prepararam-se os complexos por mistura de soluções diluídas de ADN (30 µg/ml ou menos) com os conjugados transferrina-policatião. A fim de evitar uma pre-

cipitação de complexos de ADN, usou-se tampão isento de fosfato (os fosfatos reduzem a solubilidade dos conjugados). A ligação do ADN aos conjugados de policatião em condições iónicas fisiológicas foi confirmado por meio de um ensaio de desvio de mobilidade em gel (gel mobility shift assay) usando ADN lambda marcado na extremidade 3' por  $^{32}P$ , cortado com EcoR I/Hind III (Fig. 4). A cada amostra com 1  $\mu$ l (35 ng) de ADN adicionaram-se 3  $\mu$ l de um tampão HEPES 100 mM de pH 7,9 contendo cloreto de sódio 1 M e misturaram-se as amostras com quantidades crescentes (10 ng a 1000 ng) de conjugados de transferrina em 11  $\mu$ l de solução aquosa, o que deu origem a uma concentração final de cloreto de sódio de 200 mM. Efectuou-se electroforese sobre um gel de agarose a 1 % com tampão de desenvolvimento 1 x TAE a 50 Volt (45 mA) durante 2,5 h; secou-se o gel e visualizou-se por auto-radiografia durante 2 horas a -80°C usando uma película XAR (Kodak).

#### Exemplo 5

#### Transporte de conjugados transferrina-polilisina em células vivas

A fim de verificar se os conjugados transferrina-polilisina descritos no Exemplo 1 são absorvidos eficazmente pelas células vivas, usaram-se conjugados marcados por FITC. É sabido (Schmidt et al., 1986) que a transferrina marcada por FITC após algumas horas de incubação com eritroblastos, cuja transferrina foi previamente removida, é detectável em vesículas no interior das células (observação ao microscópio de fluorescência).

No presente exemplo incubaram-se eritroblastos (transformados por meio de um retrovírus com o receptor de EGF, Khazaie et al., 1988) durante 18 horas em meio de diferenciação isento de transferrina (composição em Zenke et al., 1988) a 37°C (concentração celular

1,5 x 10<sup>6</sup>/ml). Após adição dos diferentes conjugados de transferrina-polilisina (ou, para branco de comparação, dum a quantidade igual de água bidestilada) incubaram-se as células a 37°C na presença de 10 ng/ml de EBF (a fim de conservar o estado de transformação). Após 24 a 48 horas tomaram-se cerca de 5 x 10<sup>5</sup> células, lavaram-se uma vez com solução salina fisiológica tamponizada por fosfato (PBS; pH 7,2), fixou-se com um volume de 50 vezes de uma mistura de 3,7 % de formaldeído e 0,02 % de glutaraldeído em PBS (10 min, 40°C), lavou-se uma vez em PBS, incorporou-se em elvanol e observou-se no microscópio de fluorescência (Zeiss Axiophot, banda estreita de FITC e excitação com TRITC). Simultaneamente determinaram-se em outras alíquotas os diferentes parâmetros da taxa de crescimento das células. Para este fim tomaram-se 100 ul da suspensão celular e determina-se a incorporação de <sup>3</sup>H-timidina (8 uCi/ml, 2 horas), conforme descrito em Leutz et al., 1984. A partir da Figura 5 verificou-se que os eritroblastos incubados com transferrina polilisina apresentam após 24 horas 2 a 10 vesículas de forte fluorescência que não são detectáveis nas amostras de comparação. O Quadro A mostra que com exceção da Fracção 6 todos os conjugados foram assimilados por praticamente todas as células.

A Figura 5 mostra a assimilação de fluorescência por eritroblastos de galinha que foram incubados durante 24 horas sem (A) ou com conjugados de transferrina-polilisina marcados com FITC (B, C). Por estimilação com luz azul (B), para a detecção de FITC) são visíveis nitidamente várias vesículas fluorescentes em cada célula. A especificidade desta fluorescência foi demonstrada pelo facto de que a excitação com luz verde (C: com a qual se pode observar uma fluorescência inespecífica das células como em A) não se verifica (C).

O facto de que as células em todas as amostras crescem com igual velocidade (como se verifica por

medida da incorporação de timidina tritiada ( $^3\text{H TdR}$ ), Quadro A), demonstra que as células não foram prejudicadas pelas construções de polilisina e que deste modo é de excluir uma assimilação inespecífica (por exemplo através das membranas tornadas permeáveis).

#### Exemplo 6

O objectivo das experiências realizadas neste exemplo era demonstrar que os conjugados de transferrina-polilisina usados são utilizados por todas as células como a transferrina nativa, isto é, realizam o ciclo normal da transferrina com eficácia semelhante. São especialmente adequados para sistema de ensaio para este fim eritroblastos cuja maturação em eritrócitos normais foi induzida pela acção de "desligar" o oncogene transformador (Beug et al., 1982). A partir da literatura concluiu-se que estas células necessitam de uma alta concentração do complexo transferrina-ferro para a maturação normal (100 a 200 ug/ml, concentrações 3 vezes mais reduzidas inibem a maturação das células e provocam após vários dias a morte das células (Kowenz et al., 1986)). Foi também possível mostrar (Schmidt et al., 1986) que a reciclagem, isto é, a reutilização de receptores de transferrina e em consequência um decurso do ciclo de transferrina com velocidade óptima, é indispensável para uma diferenciação normal in vitro.

Induziu-se a diferenciação de eritroblastos (transformados pelo retrovírus do receptor de EGF) por privação de EGF e adição de uma quantidade óptima de eritropoietina de galinha parcialmente purificada (Kowenz et al., 1986, isenta de transferrina). A incubação foi levada a efeito a uma concentração celular de  $1 \times 10^6/\text{ml}$  em meio de diferenciação isento de transferrina a  $42^\circ\text{C}$  e com 5% de  $\text{CO}_2$ . No início da incubação adicionou-se complexo transferrina-ferro nativo (Sigma, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) ou os conju-

gados de transferrina-polilisina saturada com ferro (concentração igualmente 100 ug/ml). O crescimento e o esquado de maturação das células foram analisadas do modo que se segue após 24 e 48 h.

1. Determinação do número de células (num Coulter Counter, Modelo ZM, Beug et al., 1984)
2. Medição da distribuição de dimensões das células (num Coulter Channelyzer Mod. 256) e
3. Determinação fotométrica do conteúdo em hemoglobina das células (Kowenz et al., 1986).

Para além disso centrifugaram-se alíquotas da mistura após 72 horas num citocentrífuga (Shandon) e efectuou-se uma determinação histoquímica da hemoglobina (coloração com benzidina neutra mais corante rápido Diff-Quik para células sanguíneas, Beug et al., 1982). Os resultados apresentados no Quadro B mostram claramente que a maturação das células cuja diferenciação foi induzida na presença das fracções 1 a 5 do conjugado de polilisina-transferrina ocorre tão eficazmente e com a mesma velocidade que a das células que foram incubadas com transferrina nativa-ferro. As células nas amostras de comparação isentas de transferrina mostram pelo contrário um crescimento celular fortemente retardado e acumulam hemoglobina apenas em quantidades reduzidas. A investigação do fenótipo celular em preparados corados com citospina indicou que as células incubadas com os conjugados de transferrina-polilisina apresentam uma maturação para reticulócitos tardios (late reticulocytes, Beug et al., 1982) do mesmo modo que as tratadas com transferrina nativa, enquanto que as células incubadas sem transferrina apresentam uma mistura de células desintegradas e células semelhantes e eritroblastos não amadurecidos (Schmidt et al., 1986. Apenas as células tratadas com a fracção 6 de transferrina-polilisina apresentam um conteúdo em hemoglobina mais reduzido e uma maior percen-

tagem de células não amadurecidas (Quadro B). Este facto indica que a fracção 6 que contém uma quantidade especialmente elevada de polilisina conjugada funciona menos bem no ciclo da transferrina. Simultaneamente este resultado demonstra a sensibilidade do método de ensaio.

#### Exemplo 7

De modo análogo ao do Exemplo 6 ensaiou-se a capacidade de diferentes conjugados de transferrina-polilisina e conjugados transferrina-protamina na substituição funcional do complexo nativo transferrina-ferro na maturação de eritroblastos de galinha para eritrócitos.

Já foi anteriormente demonstrado que os eritroblastos de galinha em diferenciação terminal apresentam um ciclo de transferrina de funcionamento óptimo; isto é sem transferrina ou quando a reciclagem do receptor de transferrina é inibida as células morrem (Kowenz et al., 1986; Schmidt et al., 1986). Uma vez que normalmente a eritropoietina de galinha parcialmente purificada utilizada ainda contém transferrina, substituiu-se a EPO por um factor de crescimento eritróide parcialmente purificado isento de transferrina, a fim de possibilitar a diferenciação eritróide (factor REV; Kowenz et al., 1986; Beug et al., 1982); Usaram-se como células visadas eritroblastos que foram cultivados com um receptor do factor de crescimento epidérmico humano (EGFR) e transformados em conjunto com um retrovírus que continha um oncogene v-myb sensível à temperatura em meio CFU-E (Radke et al., 1982) na presença de 20 ng/ml de EGF. Estas células são estimuladas a uma multiplicação anormal por meio de EGF, a eliminação do factor de crescimento EGF com adição simultânea de factor REV provoca a integração das células na diferenciação normal. Após duas lavagens em meio isento de transferrina as células são inoculadas em meio isento de transferrina e adicionam-se diferentes quantidades de transferrina saturada com ferro ou de conjugados

transferrina-policatião (antes ou após a respectiva complexação com ADN plasmídico). Após 1, 2 ou 3 dias de incubação a 42°C verificou-se o estado de diferenciação das células por citocentrifugação e coloração histoquímica ou por determinação quantitativa da hemoglobina.

O resultado deste ensaio é apresentado na Figura 6 e no Quadro C.

Depositaram-se as células ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) em meio de diferenciação isento de conalbumina (Zenke et al., 1988) completado por meio de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de insulina e factor REV em concentração óptima (Kowenz et al. 1986); diluição: 1 : 5000), uma vez sem aditivo (triângulos), uma vez com conalbumina saturada de ferro (círculos) e uma vez com conjugados Tfpl 270 saturados de ferro (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  cada; quadrados) em placas de 14 mm. Após incubação durante 24 a 48 horas determinou-se fotometricamente o conteúdo de hemoglobina em alíquotas de 100  $\mu\text{l}$ . A área tracejada indica o conteúdo em hemoglobina na ausência de transferrina de células em cultura (média de 4 determinações; Fig. 6A).

A fim de analisar a diferenciação eritroide em função da concentração de transferência ou de transferrina-polilisina, depositaram-se as células, como descrito anteriormente, em meio que continha as quantidades referidas de conalbumina saturada de ferro (círculos vazios), Tfpl 90 (quadrados vazios) ou Tfpl 270 (quadrados a cheio) e após 2 dias determinou-se fotometricamente o conteúdo em hemoglobina (Fig. 6B).

#### Quadro C:

A diferenciação eritroide foi seguida por determinação fotométrica da hemoglobina (ver Fig. 6), por contagem num contador Coulter ou por citocentrifugação seguida de coloração por benzidina neutra (para determinação

de hemoglobina) e corante histológico (Diff Quik; Beug et al., 1982b). A concentração final da transferrina e de conjugados de transferrina era no ensaio 1 de 60 µg/ml; no ensaio 2 e 3 de 100 µg/ml. A concentração de ADN no ensaio 2 era de 10 µg/ml. Determinou-se a fracção de células desintegrantes, de células maduras (LR: reticulatócitos tardios; E: erotrócitos) e de células não amadurecidas (Ebl) de acordo com os métodos descritos por Beug et al., 1982b e Schmidt et al., 1986. Os resultados obtidos mostram que dois conjugados de transferrina-polilisina (TfpL 90 ou TfpL 270) bem como o conjugado transferrina-promamina são capazes de substituir funcionalmente a transferrina nativa, garantindo um rápido transporte de ferro para os glóbulos vermelhos diferenciados, como uma actividade específica 1,5 a 2 vezes mais baixa (ver Fig. 6). A complexação de ADN com transferrina-polilisina 270 e transferrina-proteína não modificou essencialmente a actividade biológica dos conjugados. Num ensaio de comparação verificou-se que com adição de polilisina ou de protamina, misturadas com uma quantidade apropriada de citrato de ferro em vez dos conjugados de transferrina as células não foram capazes de alcançar a diferenciação a morreram, de modo análogo às células nas amostras de comparação que foram incubadas sem transferrina.

Em conjunto os ensaios de acordo com os Exemplos 6 e 7 mostraram que os dois tipos de conjugados de policatião-transferrina transportam ferro apenas ligeiramente menos eficientemente do que a transferrina natural.

#### Exemplo 8

Os conjugados polilisina-transferrina possibilitam a absorção de ADN em eritroblastos de galinha.

No exemplo que se segue pretendia-se investigar se o ADN numa dimensão que corresponde à de ADNt-

-ribozimas (ver Fig. 7) que pode ser transportado eficazmente para o interior das células. No presente exemplo utilizou-se ADN com uma inserção da sequência

CGTTAACAAAGCTAACGTTGAGGGGCATGATATCGGGCC  
CCGGGCAATTGTCGATTGCAACTCCCCGTACTATAGC

com um peso molecular de cerca de 300 000, marcado na extremidade com  $^{32}P$  ATP gama (Maniatis). Misturaram-se cerca de 0,3  $\mu$ g deste ADN, dissolvido em 20  $\mu$ l de tampão TE, com 10  $\mu$ g de transferrina nativa ou com 10  $\mu$ g da fração 3 do conjugado de transferrina-polilisina, ambos dissolvidos em 50  $\mu$ l de água bidestilada com 400  $\mu$ g/ml de albumina de soro de bovino (Beug. H., et al., 1982) ou com 50  $\mu$ l deste solvente sem transferrina. Adicionou-se cada uma das misturas ADN-proteína a 2 ml de meio de diferenciação isento de transferrina,  $4 \times 10^6$  eritroblastos de galinha (que tinham sido transformados com um retrovírus receptor de EGF e pré-incubados durante 18 h em meio isento de transferrina na presença de EGF (Khazaie K., et al., 1988)) e incubaram-se as misturas durante 8 horas a 37°C e com 5 % de CO<sub>2</sub>. Em seguida separaram-se as células por centrifugação, tomou-se o sobrenadante e lavaram-se as células 3 vezes em meio isento de transferrina. Retomaram-se o sedimento celular e o meio de cultura em SDS a 1 % 1 mg/ml de proteinase K, NaCl 300 mM, tris 20 mM de pH 8,0, EDTA 10 mM (tampão PK/SDS), incubaram-se durante 30 minutos a 37°C, extraíu-se com fenol/clorofórmio e isolou-se o ADN por precipitação com etanol. Separou-se o ADN isolado com uma radioactividade total de 2000 cpm num gel de acrilamida não desnaturante a 3,5 % (TBE, Maniatis) e detectou-se o ADN por auto-radiografia. Verificou-se que nas amostras celulares tratadas com transferrina-polilisina tinha sido obtido cerca de 5 a 10 vezes mais ADN das células do que nas amostras de comparação com transferrina nativa.

Exemplo 9

Os conjugados polilisina-transferrina possibilitam a integração e a expressão de ADN plasmídico em eritroblastos de galinha

Nestas experiências utilizou-se ADN plasmídico que continha o gene de luciferase de *Photinus pyralis* como gene de relatório (reporter), a fim de investigar a transferência e a expressão de genes. Para este fim preparou-se o ADN do plasmídeo pRSVluc (De Wet, J. R., et al., 1987) usando o método normal de lise por Triton X (Maniatis), seguido de centrifugação por gradiente de equilíbrio CsCl/EtBr, descoloração com butanol-1 e diálise contra tris-HCl 10 mM de pH 7,5 e EDTA 1 mM. Numa reacção de formação de complexos típica adicionaram-se 10 µg de conjugado de transferrina-polilisina ou de transferrina-protamina a 3 µg de ADN do plasmídeo pRSVluc em 250 µl de NaCl 0,3 M, com agitação cuidadosa e lenta. (Verificou-se que mantendo estes condições é possível usar até 100 µg de conjugado transferrina-policatião e 30 µg de ADN plasmídico num volume final de 500 µl, sem que os complexos conjugado/ADN precipitem). Após 30 min à temperatura ambiente adicionaram-se os complexos directamente a 5 a 10 x 10<sup>6</sup> células HD3 (0,5 a 1 x 10<sup>6</sup> células por ml, meio EBM+H (Beug et al., 1982a; 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>) e incubou-se durante 16 a 48 h (a linha de células utilizada foi a linha de células de eritroblastos de galinha HD3 transformada por ts-v-erbB). Separaram-se as células (5 min a 1500 x g, 4°C), lavaram-se duas vezes com solução salina tamponizada com fosfato (PBS) e retomaram-se em 100 µl de tris-HCl e 0,25 M de pH 7,6. Preparam-se extractos celulares por meio de três ciclos de congelação e descongelação, seguidos de centrifugação a alta velocidade (15 min, 18 500 x g, 4°C). Analisaram-se aliquotas destes extractos celulares para verificação da ocorrência de actividade de luciferase (De Wet, J. R. et al., 1987). Mediu-se a bioluminescência usando o Clinilumat (Berthold, Wildbach, RFA).

Verificou-se que a presença dos complexos transferrina-polilcatiao/ADN no meio de cultura não tem qualquer influência prejudicial sobre o crescimento e a multiplicação celular. Como se pode verificar por meio da Figura 8, a actividade máxima de luciferase foi alcançada quando se usaram 3  $\mu$ g de ADN/10  $\mu$ g de Tfpl e 0,3 a 1  $\mu$ g de ADN/Tfprot. Na hipótese de que todos os complexos conjugado)ADN formados serem identicos, corresponde a uma proporção molar de 25 a 75 moléculas de conjugação por molécula de ADN plasmídico. A partir daqui é possível concluir-se que o ADN é completamente abrangido no complexo por meio da molécula de conjugado e a uma proporção conjugado/ADN que garante de modo evidente a neutralidade eléctrica (calculada com base nas cargas positivas no policatião que são necessárias para neutralizar as cargas negativas dos grupos fosfato no ADN). Esta hipótese está em concordância com a observação anterior de que em comparação com a transferrina-polilisina é necessário três vezes menos transferrina/protamina fortemente carregada positivamente para a formação óptima de complexo e para a transferência de genes. Esta hipótese está de acordo com o resultado obtido no Exemplo 4 para a proporção conjugado/ADN que é uecessária para a formação eficaz de complexo.

Determinou-se a sensibilidade deste sistema de transferência de genes usando uma proporção Tfpl/ADN optimizada como referido. O resultado desta experiência é apresentado na Figura 9; Menos de 1 ng de ADN plasmídico que codifica para a luciferase apresenta ainda um sinal detectável. A utilização de mais do que 2  $\mu$ g de ADN plasmídico complexado com 6  $\mu$ g de Tfpl ou 20  $\mu$ g de Tfprot não provavelmente em virtude da saturação do sistema, verificou-se ainda que não é necessária qualquer concentração especial de sais ou díóxides para a formação de complexos, uma vez que os complexos Tfpl/ADN formados com várias concentrações salinas (NaCl 0, 20, 50, 100,

200 mM) apresentavam actividades identicas nas experiências de transferência de genes. (Fig. 8 e Fig. 9: círculos = Tfprot, quadrados = TfpL). Foi possível demonstrar que se verifica a hipótese de que os complexos transferrina-policatão/ADN se ligam às células por meio do receptor de transferrina. Em primeiro lugar, conforme se apresenta na Figura 10A, demonstrou-se que a actividade de luciferase que se pode atingir por intermédio dos complexos TfpL-ADN é pelo menos 100 vezes superior à actividade medida para o complexo pL-ADN. Uma experiência de comparação mostrou que uma mistura de polilisina e transferrina isoladamente não facilita a absorção do ADN plasmídico. Numa outra experiência adicionou-se a uma quantidade constante de complexo TfpL-ADN um excesso de transferrina nativa. A Figura 10B mostra que a transferrina livre no meio concorre eficazmente para a absorção de ADN mediada por TfpL, o que tem como resultado uma diminuição da actividade enzimática de luciferase. Daqui é possível concluir que a absorção do complexo TfpL-ADN tem lugar nas células através dos receptores de transferrina.

#### Exemplo 10

Em experiências preliminares tinha sido verificado por meio de transfecção de fibroblastos de galinha com ADN da secção erbB que o ADNt da secção erbB-ribozima é expresso em células de galinha.

Com este exemplo foi possível demonstrar que as ADNt-ribozimas que são dirigidas contra o oncogene erb B são incorporadas em eritroblastos de galinha transformados por erb B com o auxílio de conjugados polilisina-transferrina e podem enfraquecer a actividade de transformação do oncogene.

Construiram-se dois genes de ARNt-ribozima dirigidos contra a região de início de tradução

de erbB (ver Figs. 7 e 11).

Digeriram-se com EcoRI cerca de 100 ug de cada um dos plasmídeos que contém o gene, a fim de libertar o gene de ARNt-ribozima de um fragmento de 325 pb. Os produtos da digestão foram marcados na extremidade por meio do fragmento de Klenow e foram purificados por meio de electroforese em gel através de um gel de agarose a 2 %/TBE. Localizaram-se o fragmento vector e os fragmentos do gene de ARNt-ribozima por meio de coloração com brometo de etídio, recortaram-se e isolaram-se por electroeluição, extração por fenol/clorofórmio e clorofórmio e por precipitação com etanol. Em seguida utilizaram-se os fragmentos de ADN purificados e marcados por isótopos radioativos com utilização do sistema de transporte de transferri-na-polilisina de determinar a absorção e a inibição do ARN de erbB. Utilizou-se como amostra de ADN de comparação o vector pSPT 18.

Para sistema de ensaio escolheu-se uma linha de células de eritroblastos de galinha transformada por meio de um mutante sensível à temperatura (*ts* 34, Graf et al., 1978) do vírus da eritroblastose das aves (Beug et al., 1982 b). O oncogene erb B igualmente expresso nestas células pode ser inibido por meio de um inibidor específico de quinase de proteína (H 7). (Verificou-se que o oncogene v-erbA in vivo e in vitro (isto é sob a forma de uma proteína expressa por bactérias) é fosforilado em dois locais, nomeadamente Ser 28 e Ser 29, por meio da quinase de proteína C ou através de quinase de proteína dependente de cAMP. A mutação destas serinas para alaninas reduz a fosforilação e prejudica a actividade do oncogene v-erbA. O inibidor H7 é específico destas duas quinase e possui a capacidade de neutralizar selectivamente as alterações causadas por v-erbA em eritroblastos que contém v-erbA-v-erbB (por exemplo bloqueamentos da diferenciação)).

E conhecido que os eritroblastos cujo oncogene erbB se encontra inactivado - por exemplo por elevação da temperatura no caso de um mutante de erb B sensível à temperatura, sofram mutação transformando-se em eritrócitos. Um dos indícios para este processo é uma indução da síntese da hemoglobina que pode ser detectada ao nível da célula isolada por meio de uma análise simples (coloração com benzidina ácida, Orkin et al., 1975, Graf et al., 1978). Como actividade fenotípica de uma ribozima dirigida contra erb B neste sistema de ensaio era deste modo de esperar uma elevação específica do número de células positivas em relação à benzidina.

A série de experiências em que se baseia este exemplo foi realizado do modo seguinte: Misturaram-se as diferentes preparações de ADN (ver no Quadro D anterior), dissolvidas em 30  $\mu$ l de tampão TE, com 10  $\mu$ g cada de complexo transferrina nativa-ferro ou de conjugado transferrina-polilisina (dissolvido em 50  $\mu$ l de água bidestilada) e incubou-se durante 30 minutos a 37°C.

No caso de ADN plasmídico, (10  $\mu$ g) realizou-se uma maior quantidade dos preparados de transferrina (100  $\mu$ g). Adicionou-se cada uma das misturas ADN-transferrina-ADN a 1 ml de meio de diferenciação isento de transferrina (Zenke et al., 1988). Incubaram-se previamente as células do ensaio ( $3 \times 10^6$  por experiência) durante 60 minutos de diferenciação isento de transferrina a 42°C, (fortalecendo-se deste modo a absorção de transferrina) e adicionou-se às amostras que continham a mistura ADN-transferrina. Após 6 h, 18 h e 68 h (para o tratamento das células ver acima) colheram-se amostras, conforme descrito, separaram-se em sobrenadante e sedimento celular, retomaram-se em tampão PK/SDS e analisaram-se o ADN.

A Figura 12 mostra que, de modo análogo ao do Exemplo 8, nas amostras de células tratadas

com transferrina-polilisina foi absorvido cerca de mais 5 a 10 vezes de ADN pelas células do que nas amostras de comparação com transferrina nativa.

Pista m: Marcadores de peso molecular: ADN de pBR322, cindindo com HpaII e marcado com alfa-<sup>32</sup>p-CTP radioactivo por meio do fragmento de Klenow da polimerase de ADN (Maniatis)

Pista 1 : Fragmento ES13 de 2000 cpm

Pista 2 : Material celular tratado com transferrina e ES13

Pista 3 : Material celular tratado com transferrina-polilisina e ES13.

Após terminada a incubação (6 h) separaram-se as células por centrifugação e incubaram-se mais 72 horas em meio de diferenciação que contém transferrina com eritropoietina e insulina (Kowenz et al., 1986, Zenke et al., 1988, 2 ml por ensaio e a 37°C, isto é na presença de uma proteína v-erb B activa).

Foram obtidos os seguintes resultados:

1. De modo análogo ao do Exemplo 8 foi possível observar uma absorção mais elevada de ADN (cerca de 5 vezes) na dimensão dos ADNs do sector erbB nas amostras celulares tratadas com transferrina-polilisina.
2. O Quadro D mostra que em todos os casos em que se incorporou ADNt de sector de erbB-ribozima com o auxilio de construções polilisina-transferrina em eritroblastos transformados em erb B, e percentagem de células positivas em relação à benzidina é si-

gnificativamente mais elevada (até cerca do dobro) (como referência serviram as amostras que foram tratadas com o ADN do vector e em que a utilização de conjugados polilisina-transferrina não provocava previsivelmente uma elevação do número de células positivas em relação à benzidina).

#### Exemplo 11

#### Ligaçāo eficaz e internalização de complexos transferrina-polilisina/ADN em células hematopoiéticas de galinha

Mediu-se a ligação de Tfpl e de ADN de Tfpl a receptores da superfície celular com substâncias marcadas com tritio de acordo com o método descrito por Stein et al., 1984. Preparou-se Tfpl marcado com  $^3\text{H}$  por conjugação de polilisina marcada com transferrina de acordo com o método descrito no Exemplo 1. A marcação da polilisina 90 foi levada a efeito por tratamento com formaldeído e boro-hidreto de sódio marcado com  $^3\text{H}$  (Ascoli e Puet, 1974). Os resultados desta experiência são apresentados na Figura 13. Investigou-se a ligação específica ao receptor de transferrina de células HD3 de Tfpl 90 marcado (quadrados) ou Tfpl 90 marcado complexado com ADN de pS-SK- (Promega Biotech, preparado por meios de lise com Triton X, centrifugação de gradiente de densidade equilibrada com CsCl/EtBr, descoloração com 1-butanol e diafilase contra tris.HCl 10 mM de pH 7,5, EDTA 1 mM) (triângulos). Para este fim juntaram-se os conjugados ou os complexos (0,1 a 100 nM) a células HD3 ( $1 \times 10^6/\text{ml}$  em MEM (= meio mínimo de Eagle) + 1 % de BSA) e incubou-se durante 3 h. A Figura 13 mostra que tanto os conjugados como os complexos se ligam a células HD3 de tal modo que atingem a saturação. As constantes de ligação aparentes calculadas a partir destes dados são de 22 nM para o Tfpl e de 43 nM para o complexo Tfpl-ADN. Se bem que um pouco mais elevado, estes valores estão em concordância relativa com os da transferrina nativa, que tinham sido determinados obtendo-se o valor

de 15 nM.

A fim de seguir a absorção de complexos Tf<sub>p</sub>L-ADN em vesículas intracelulares incubaram-se em primeiro lugar durante 18 h a 37°C células HD3 com meio de diferenciação isento de transferrina. Após adição de FITC-transferrina ou de conjugados de Tf<sub>p</sub>L (marcados com FITC no grupo polilisina e em algumas experiências complexadas com ADN) incubaram-se as células durante mais 18 h. Separaram-se as células por citoentrifugação, fixaram-se com uma mistura de formaldeído a 3,7 % e glutaraldeído a 0,02 %, lavaram-se com PBS, integraram-se em Mowiol 4,88 e observaram-se num microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot. Para amostras de comparação usaram-se anticorpos de cabra anti-rato marcado com FITC (0,1 mg/ml) (ver Exemplo 5). Para a determinação quantitativa de FITC-Tf, FITC-Tf<sub>p</sub>L e FITC-Tf<sub>p</sub>L/ADN incubaram-se as células durante 6 h com cada um dos preparados (TF: 40 µg/ml; Tf<sub>p</sub>L 270: 50 µg/ml; Tf<sub>p</sub>L270 com ADN de pB-SK (Promega Biotech, preparado por meio de lise com Triton X, centrifugação de gradiente de densidade com CsCl/EtBr, descoloração com 1-butanol e diafilase contra tris-HCl 10 mM a pH 7,6, EDTA 1 mM): 50 µg/ml ou 16 µg/ml, respectivamente; tampão de ligação), lavaram-se 3 x em PBS/BSA frio e submeteram-se a análise FACS quantitativa num FCSAN de Becton-Dickinson (BD).

A Figura 14 mostra que tanto com Tf<sub>p</sub>L como também com Tf<sub>p</sub>L-ADN todas as células apresentam uma fluorescência relativa elevada mais de 10 x, o que indica em consequência que os conjugados ou os complexos, respectivamente, foram absorvidos por mais do que 95 % das células (Tf:.....; Tf<sub>p</sub>L: ....; Tf<sub>p</sub>L/ADN:———; tampão de ligação; - - - ).

#### Exemplo 12

Expressão de ADN absorvido pelas células por meio de Tf<sub>p</sub>L

Depois de ter sido demonstrado nos exemplos anteriores que a transferência de genes com TfpL não é prejudicial para o crescimento das células, ensaiou-se a actividade dos complexos TfpL-ADN que foram utilizados durante um período de tempo mais longo sobre as células (o ADN usado foi o ADN plasmídico que contém o gene de luciferase, conforme descrito no Exemplo 9). Nesta experiência incubou-se sempre a mesma concentração com células HD3 durante 1 a 4 dias com ou sem suplemento diário com complexos TfpL-ADN.

Determinou-se a actividade enzimática de luciferase em alíquotas colhidas em diversos momentos, conforme descrito no Exemplo 9. Nas culturas com adição repetida dos complexos determinou-se uma expressão do gene da luciferase relativamente alta (100 000 a 200 000 unidades de luz/10<sup>6</sup> células) que se conserva essencialmente constante durante todo o período da investigação. Durante este período não se observaram quaisquer efeitos citotóxicos. Quando as células foram carregadas apenas uma vez com os complexos, a actividade de luciferase diminuiu entre o 2º e o 4º dia de 10 a 20 vezes. Estes resultados mostram que apesar de uma expressão evidentemente transitória do gene da luciferase, que foi introduzida com o auxílio dos conjugados da presente invenção nas células, por adição repetida é possível conservar uma expressão elevada constante do gene introduzido.

#### Exemplo 13

A fim de determinar a dimensão da fração das células que expressa de facto o ADN plasmídico que foi introduzido por meio transferrina, foram incubadas células HD3 com complexos TfpL/ADN como descrito nos exemplos anteriores. O ADN usado foi ADN do plasmídeo pRSV/-β Gal (\_\_\_\_\_\_). A expressão deste gene de relatório (reporter) foi investigado em consequência em células isoladas por meio

de análise de FACS (Nolan et al., 1986). Para comparação utilizou-se ADN de TfpL-pB-SK-ADN ( . . . ). Para este fim introduziu-se o substrato fluorescente  $\beta$  Gal-FDG (fluoresceina-di- $\beta$ -d-galactopiranosido) por meio de choque osmótico e investigou-se a distribuição das células que continham fluoresceina que tinha sido libertada em virtude da actividade enzimática de  $\beta$  Gal em FDG. A distribuição homogénea das células que contém fluoresceina leva à conclusão de que uma fracção importante das células expressa o gene  $\beta$  Gal-reporter. O resultado desta experiência é apresentado na Figura 15.

QUADRO A  
Transporte de Polilisina-transferrina em eritroblastos

Ensaio	Meio	transferrina - polilisina	Fluorescência das vesículas		Validade (incorporação de 3H Td R)
			24 h	48 h	
1	2 ml	sem adição	<1 %	<1 %	140.000 cpm
2	2 ml	145 µl H2O	<1 %	<1 %	126.000 cpm
3	2 ml	145 µl Tfpl Fr1	>90 %++	>90 %++	137.000 cpm
4	2 ml	145 µl Tfpl Fr2	>90 %+++	>90 %+++	161.000 cpm
5	2 ml	145 µl Tfpl Fr3	>90 %+++	>90 %+++	153.000 cpm
6	2 ml	145 µl Tfpl Fr4	ca. 80 %+++	>90 %+++	151.000 cpm
7	2 ml	145 µl Tfpl Fr5	ca. 60 %+++	>90 %+++	153.000 cpm
8	2 ml	145 µl Tfpl Fr6	ca. 40 %+++	>90 %+++	165.000 cpm

++ e +++ representam a intensidade relativa da fluorescência das vesículas

## QUADRO B

A polilisina-transferrina pode substituir funcionalmente a transferrina na estimulação da maturação induzida in vitro de eritroblastos

Nº	Meio	Aditivo <sup>b</sup>	Nº de células (x 10 <sup>6</sup> /ml)		Hemoglobina E 492	Grau de maturação % de reticulatários
			24 h	48 h		
1	2 ml	Fe-Transferring	3,28	4,38	1,38	2,74 >80 %
2	2 ml	-	2,62	2,56	0,35	0,23 <1 %
3	2 ml	H <sub>2</sub> O	2,60	2,42	0,30	0,13 <1 %
4	2 ml	TfPL Fr1	3,70	4,44	1,36	2,69 >80 %
5	2 ml	TfPL Fr2	3,56	4,24	1,16	2,51 n.b.a
6	2 ml	TfPL Fr3	3,72	4,54	1,58	2,54 >80 %
7	2 ml	TfPL Fr4	3,48	4,56	1,57	2,55 n.b.
8	2 ml	TfPL Fr5	3,36	4,26	1,41	2,47 n.b.
9	2 ml	TfPL Fr6	3,58	4,4	1,14	1,93 60-65 %

a: não determinado

b: Fe-transferrina, 200 µg em 13 µl; fração TfPL, 200 µg em 130 µl; H<sub>2</sub>O, 130 µl

Quadro C

Expe- riênci a	Transferrina	Meio - Aditivo Conjugado de transferrina	ADN	Nº de células (x 10 <sup>6</sup> / ml)	Hb (E492)	Parâmetros de diferencia- ção		
						% desin.	%	células
						LR+E	Ebl	
1	-	-	-	2.56	0.259	56	<1	44
	+	-	-	3.72	1.997	3	73	1
	-	Tfp190	-	3.67	1.105	5	54	8
	-	Tfp1270	-	3.30	1.366	11	60	4
2	-	-	PRSVLUC	1.24	0.28	n.n.	n.n.	
	+	-	PRSVLUC	5.22	2.459	n.n.	n.n.	
	-	Tfp190	PRSVLUC	4.46	2.265	n.n.	n.n.	
3	-	-	-	2.1	0.222	79	<1	21
	+	-	-	2.55	1.369	6	72	0
	-	Tfp190	-	2.64	1.016	10	56	7
	-	Tf-Prot	-	2.76	1.055	9	72	4

Quadro D

Maturação (conteúdo em hemoglobina) de eritroblastos transformados por v-erbB que obsorveram v-erbB - ribozima -ADN

Nº	ADN	Conteúdo em hemoglobina (% de positivos após coloração com benzidina ácida)					
		Tipo	P.M.	Quantidade	Tipo	Quantidade	14 h
1	fracção erb 13	2x105	1 µg	Tf	10 µg	<1	15+-3a (3)b
2	fracção erb 13			TfPL Fr5	10 µg	<1	37+-4 (2)
3	fracção erb 53	2x105	1 µg	Tf	10 µg	<1	25+-2 (2)
4	fracção erb 53			TfPL Fr5	10 µg	<1	42+-1 (2)
5	vector	2x106	10 µg	Tf	100 µg	<1	23+-3 (2)
6	vector	10 µg		TfPL Fr5	100 µg	<1	22+-2 (2)
7	fracção 13+53 (ver acima)	0,5+0,5 µg	Tf	10 µg	<1	21+-2 (2)	
8	fracção 13 + 53	0,5+0,5 µg	TfPL Fr5	10 µg	<1	38+-2 (2)	

a: Por determinação co taram-se > 200 células, valor + - desvio padrão

b: Número de determinações independentes

Literatura:

- Ascoli, M. e Puett, D. (1974), Biochem. Biophys. Acta 371, 203-210
- Beug, H., et al., (1982a), J. Cell Physiol. Suppl. 1, 195-207.
- Beug, H., et al., (1982b), Cell 28, 907-919.
- Beug, H., et al., (1984), Cell 36, 963-972.
- Cormier et al., (1988), Nucleic Acids Res. 16, 4583.
- Deakin, H., et al., (1963), Biochem. J. 89, 296.
- Felsenfeld et al., (1978), Nature 271, 115-122.
- Graf et al., (1978), Nature 275, 496-501.
- Huebsrs et al., (1987), Physiol. Rev. 67, 520-582.
- Jung et al., (1981), Biochem. Res. Commun. 101, 599.
- Kahazaie, K., et al., (1988), EMBO B., 10, 3061-3071.
- Killisch, I., et al., (1990), in Vorbereitung
- Kowenz, E., et al., (1986), Mod. Trends in Human Leukemia VII, Springer Verlag, pp. 199-209.
- Lemaitre et al., (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 648.
- Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor 1982.
- Morvan et al., (1988) Nucleic Acids Res. 16, 833.
- Nolan, G.P., et al., (1986), Proc. Natl. Acad. Sci, 85, 2603-2607.
- Praseuth et al., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 1349.
- Orkin, et al., (1975), Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 98-102.
- Radke, K., et al., (1982), Cell 31, 643-653
- Schmidt et al., (1986), Cell 46, 41-51.
- Smith et al., (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 2787.
- Stein et al., (1984), J. Biol. Chem. 259, 14762-14772
- Stein et al., (1988), Nucleic Acids Res. 16, 3209.
- Stirchak et al., (1987), J. Org. Chem. 52, 4203.
- Warrant R.W., et al., (1978), Nature 271, 130-135.
- Wu, G.Y. et al., (1988), J. Biol. Chem. 263, 14621-14624.
- Zamecnik et al., (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 4143.
- Zenke, M., et al., (1988), Cell 52, 107-119.
- .
- .

REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a preparação de novos conjugados de proteína-policatião dotados de capacidade para formar complexos solúveis com substâncias com afinidade para com policatiões, especialmente ácidos nucleicos ou análogos de ácidos nucleicos, os quais se ligam às células por meio de endocitose mediada por um receptor, caracterizado por se efectuar o acoplamento de uma proteína constituída por transferrina a um policatião por via química por meio de um método de acoplamento de peptídeos ou em alternativa por via recombinante por meio de um método de preparação de polipeptídeos quiméricos.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o policatião ser uma protamina eventualmente modificada.

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o policatião ser uma histona eventualmente modificada.

- 4ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o policatião ser um polipeptídeo sintético homólogo ou heterólogo.

- 5<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o polipeptídeo ser polilisina.

- 6<sup>a</sup> -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5, caracterizado por o policatião apresentar cerca de 20 a 500 cargas positivas.

- 7<sup>a</sup> -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6, caracterizado por a proporção molar entre a transferrina e a policatião ser de cerca de 10:1 a 1:4.

- 8<sup>a</sup> -

Processo para a preparação de novos complexos proteína-policatão/ácido nucleico que se ligam às células por meio de endocitose mediada por um receptor, caracterizado por se efectuar o acoplamento de uma proteína constituída por transferrina a um policatão/ácido nucleico por via química por meio de um método de acoplamento de peptídeos ou em alternativa por via recombinante por meio de um método de preparação de polipeptídeos quiméricos.

- 9<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por o complexo obtido conter como fração de conjugado um conjugado obtido de acordo com qualquer

das reivindicações 1 a 7.

- 10<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por o complexo obtido conter como ácido nucleico um ácido nucleico dotado de capacidade para a inibição específica de genes ou da função de ARN.

- 11<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por o complexo obtido conter um ácido nucleico dotado de capacidade para a inibição de ácido nucleico viral.

- 12<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por o complexo obtido conter um ácido nucleico dotado de capacidade para a inibição de oncogenes ou de outros genes chave que regulam o crescimento e/ou a diferenciação das células.

- 13<sup>a</sup> -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 10 a 12, caracterizado por o complexo obtido conter como ácido nucleico uma ribozima eventualmente em conjunto com um ARN veículo ou o gene que codifica para aquela.

•  
•  
•

Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o complexo obtido conter como ácido nucleico uma unidade genética constituída por um gene de ARNt como gene veículo e um gene de uma ribozima ordenada no interior deste gene.

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 8 a 12, caracterizado por o complexo obtido conter como ácido nucleico um oligonucleótido anti-sentido, eventualmente modificado, eventualmente em conjunto com um ácido nucleico veículo ou, no caso de um oligonucleótido de ARN, o gene que codifica para aquele.

Utilização *in vitro* ou *ex vivo* de um complexo de um conjugado de transferrina-policatião e de um ácido nucleico ou de ácidos nucleicos solúveis sob condições fisiológicas caracterizado por se destinar à introdução de ácidos nucleicos em células humanas ou animais por meio de endocitose mediada por um receptor.

Processo para a preparação de uma composição farmacêutica caracterizado por se incorporar como ingrediente activo um complexo quando obtido de acordo com

qualquer das reivindicações 8 a 15.

A requerente reivindica a prioridade do pedido austriaco apresentado em 16 de Março de 1989, sob o nº. A 610/89.

Lisboa, 15 de Março de 1990  
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVOS CONJUGADOS PROTEINA-POLICATIÃO E DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE OS CONTEM"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de novos conjugados proteína-policatião dotados de capacidade de formar complexos solúveis com substâncias com afinidade para com policatões, especialmente ácidos nucleicos ou análogos de ácidos nucleicos, os quais se ligam às células por meio de endocitose mediada por um receptor, que compreende efectuar-se o acoplamento de uma proteína constituida por transferrina a um policatão por via química por meio de um método de acoplamento de peptídeos ou em alternativa por via recombinante por meio de um método de preparação de polipeptídeos quiméricos.

•  
•  
•

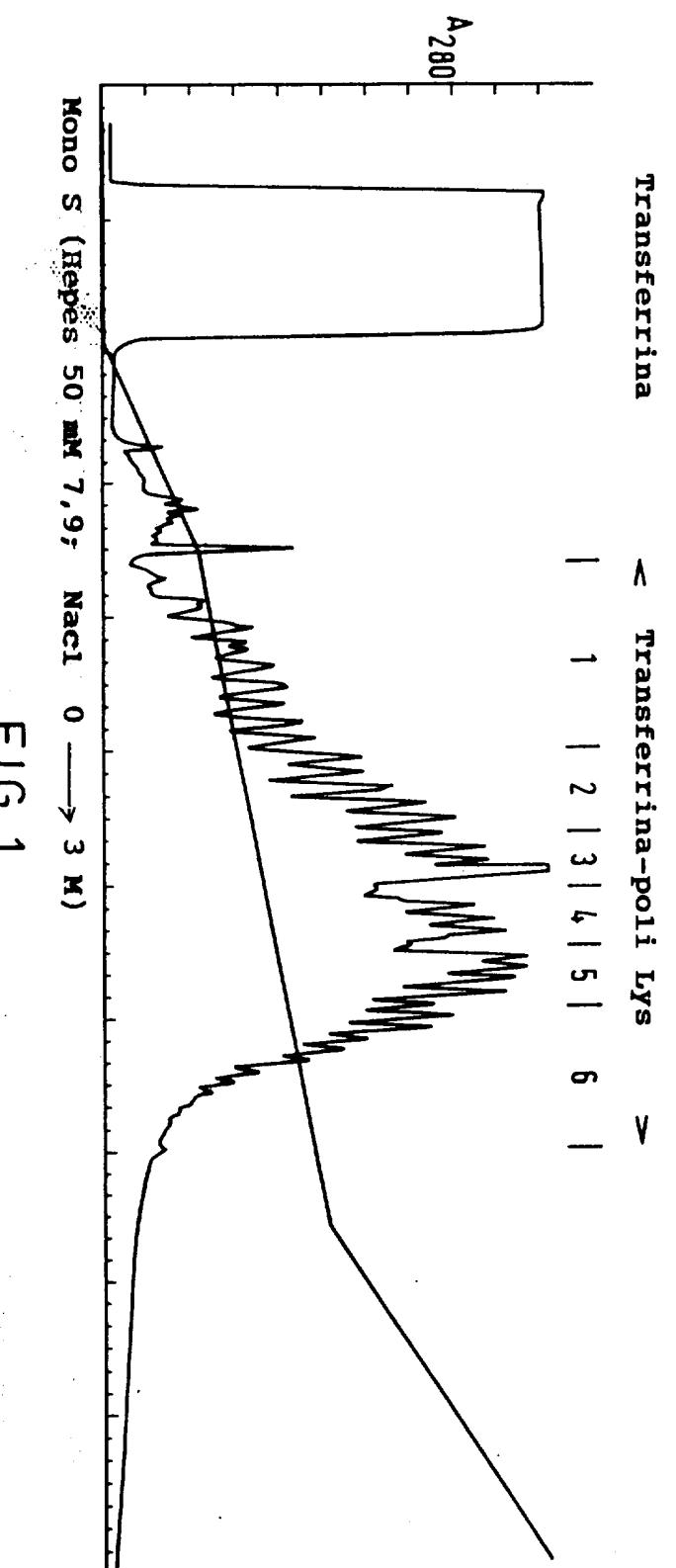
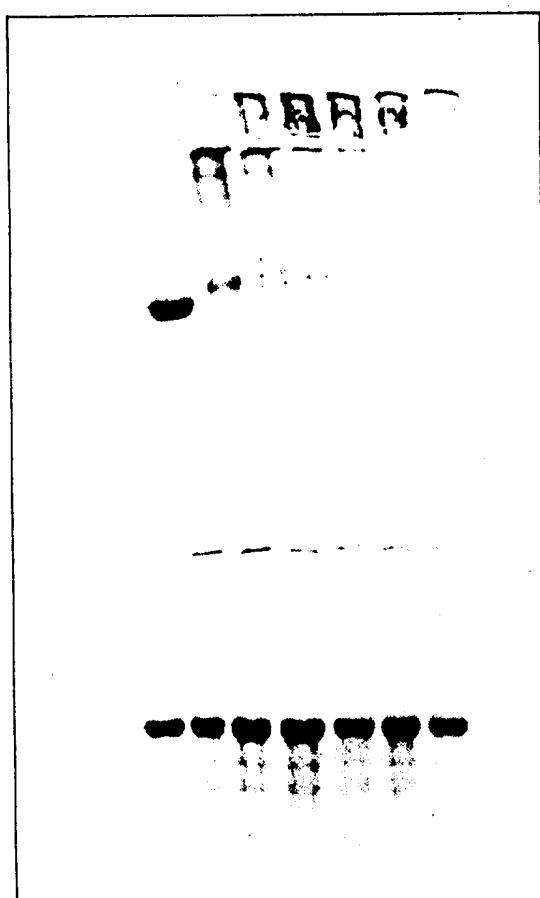


FIG. 1.

FIG. 2.

(B)

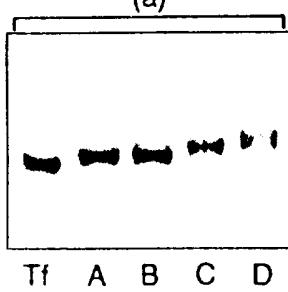


(A)

T 1 2 3 4 5 6

FIG. 2.

(a)



(b)

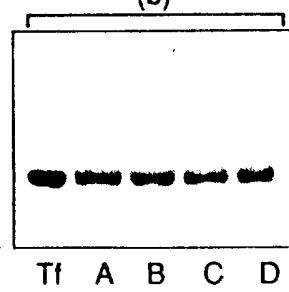


FIG. 3.

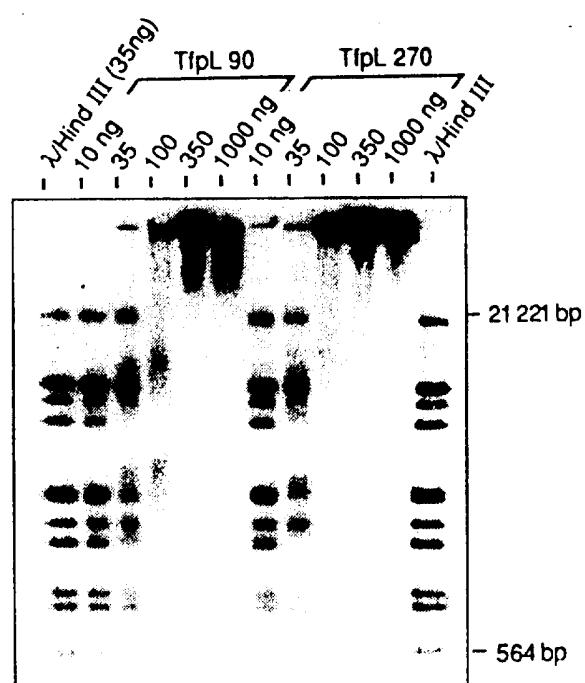


FIG. 4.

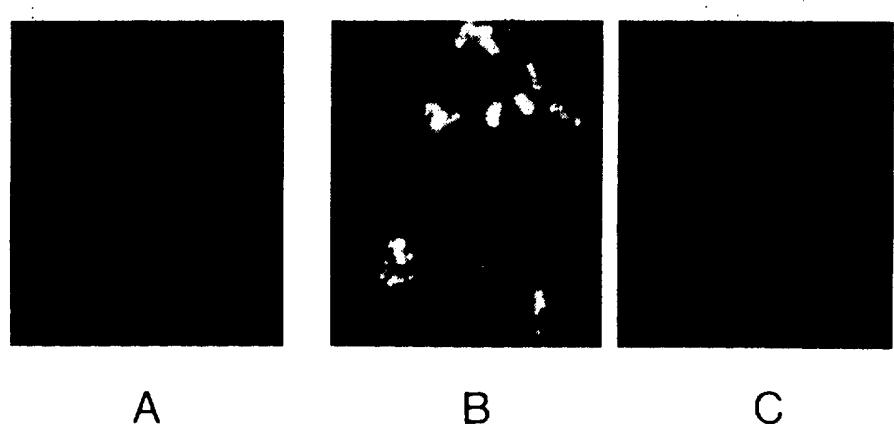
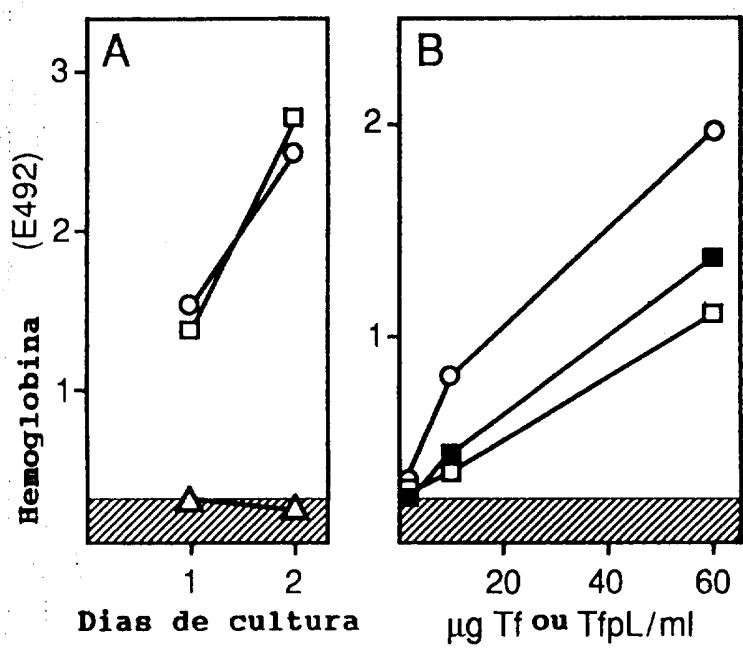
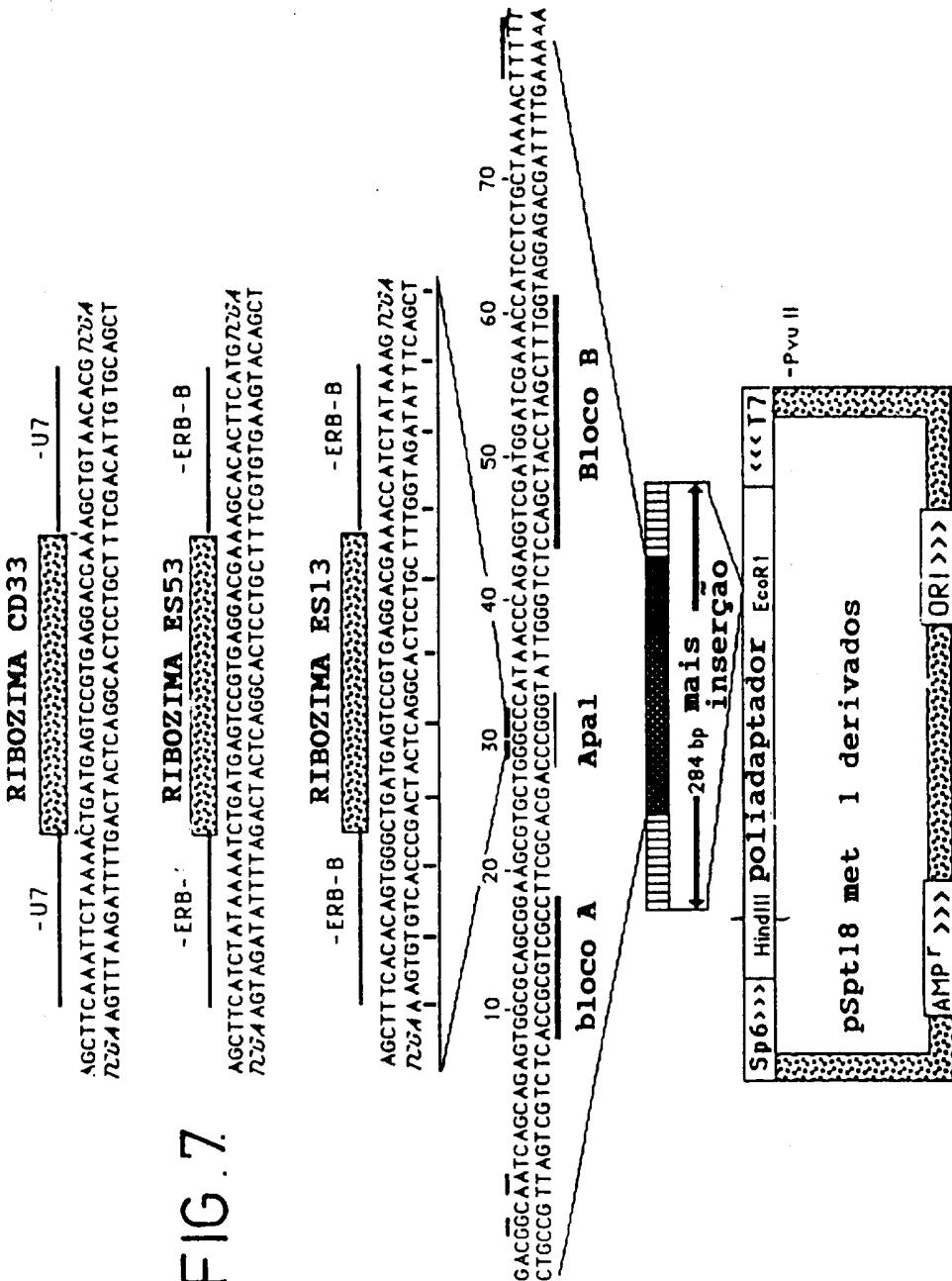


FIG. 5.



**FIG. 7**



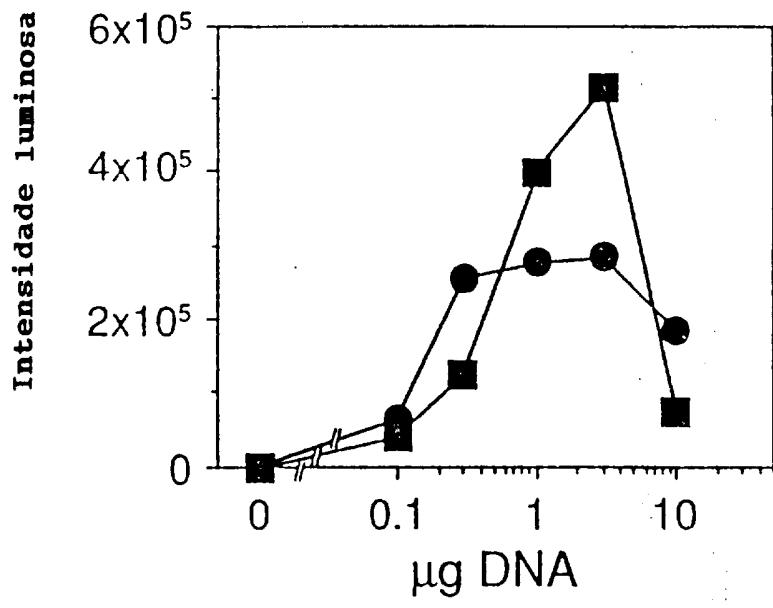


FIG. 8.

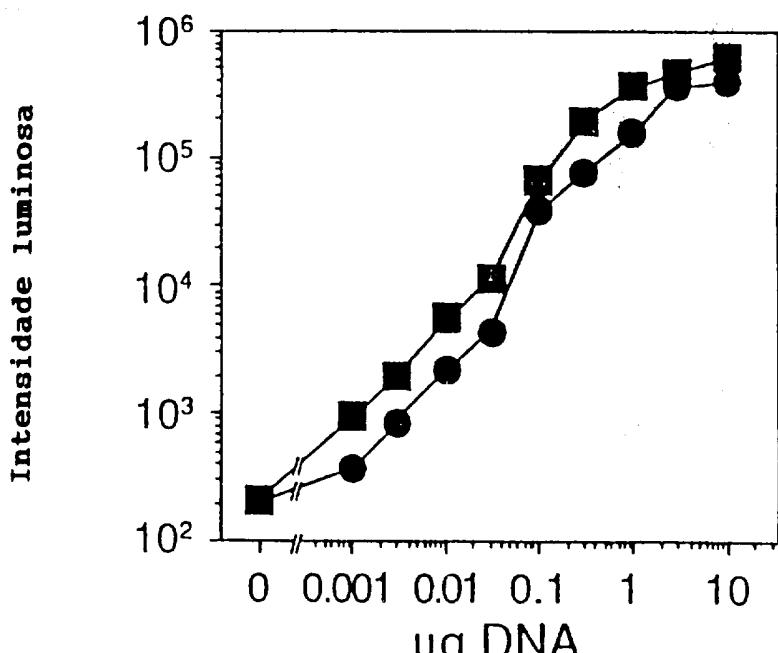


FIG. 9.

27/06/91

Intensidade luminosa relativa

FIG.10A.

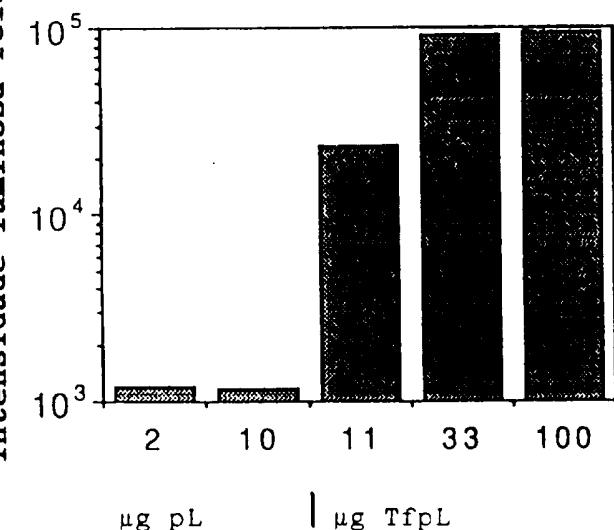
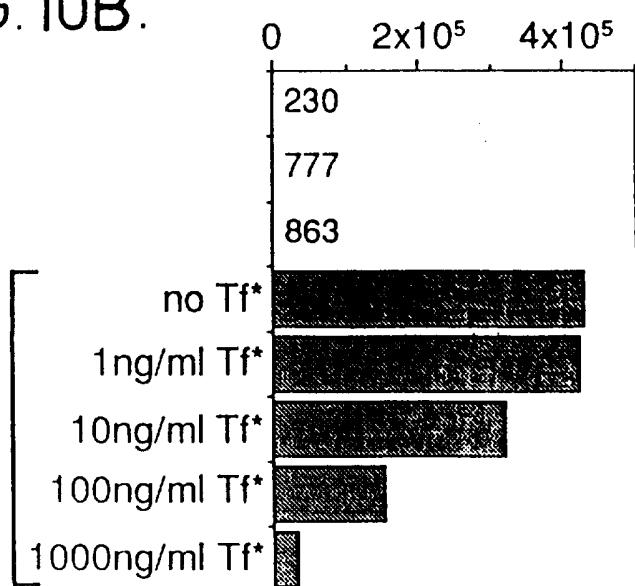


FIG.10B.

Intensidade luminosa



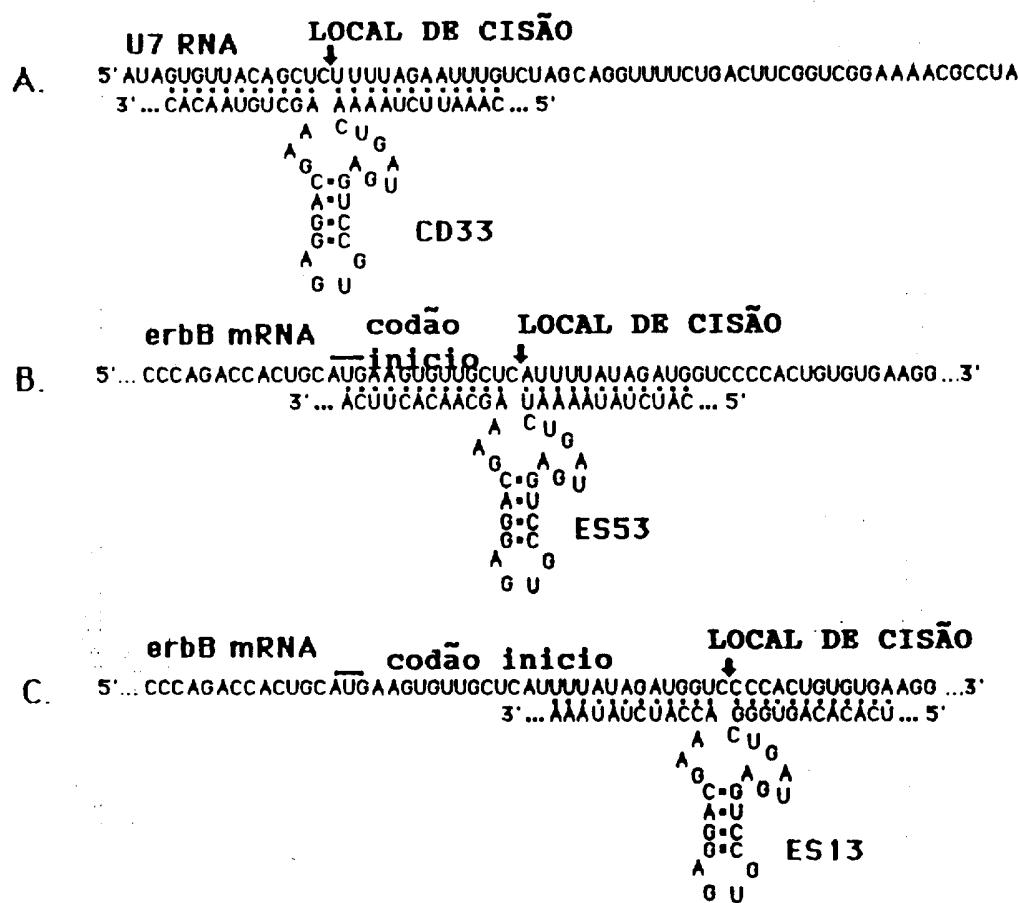


FIG. 11.

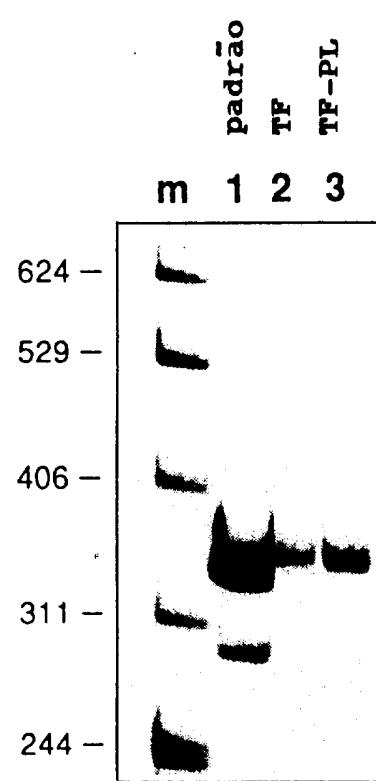


FIG. 12.

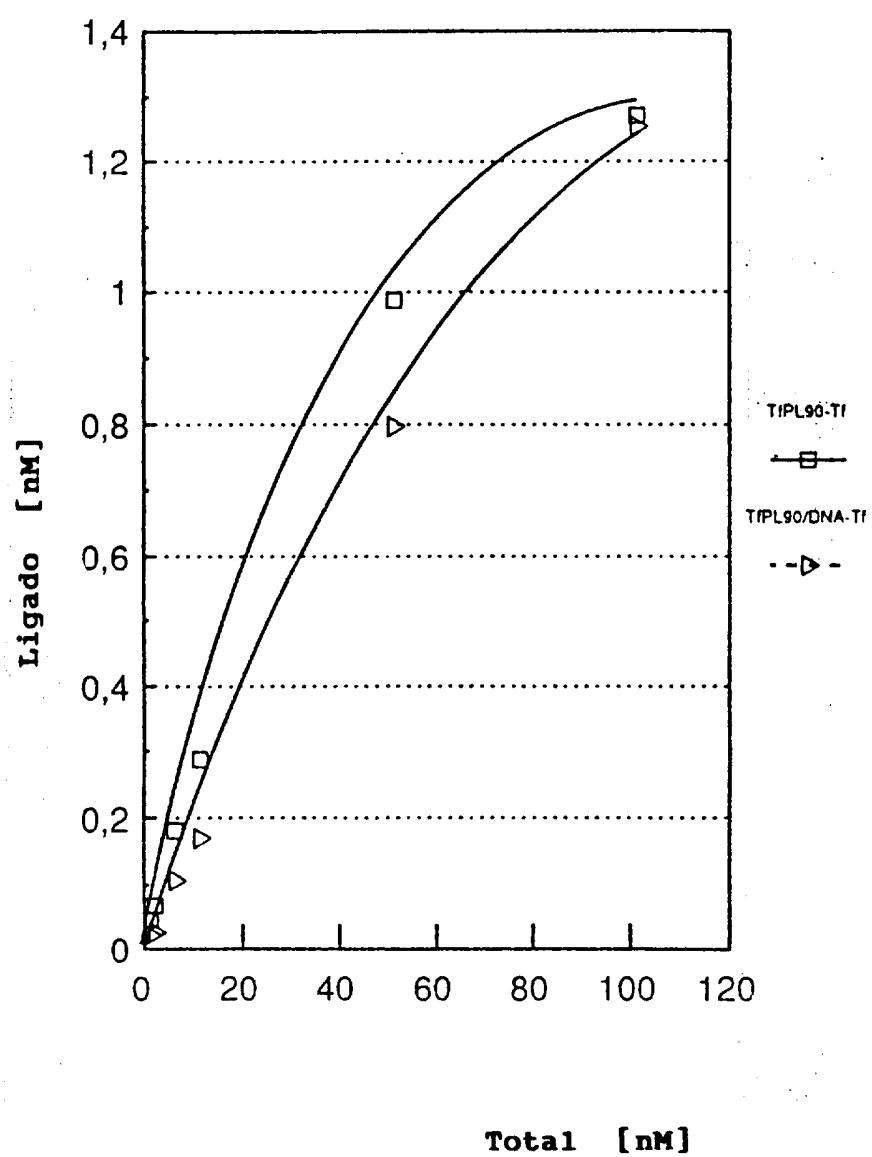
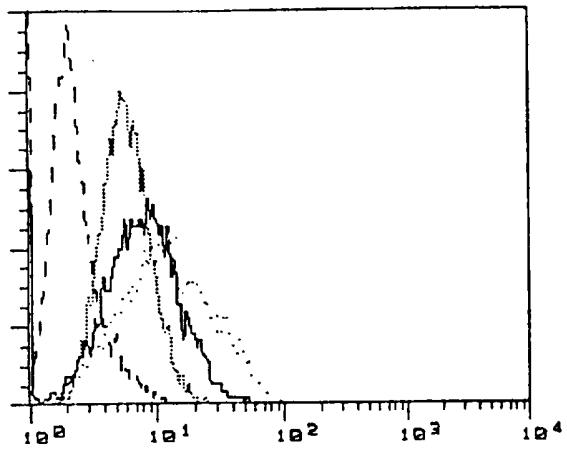


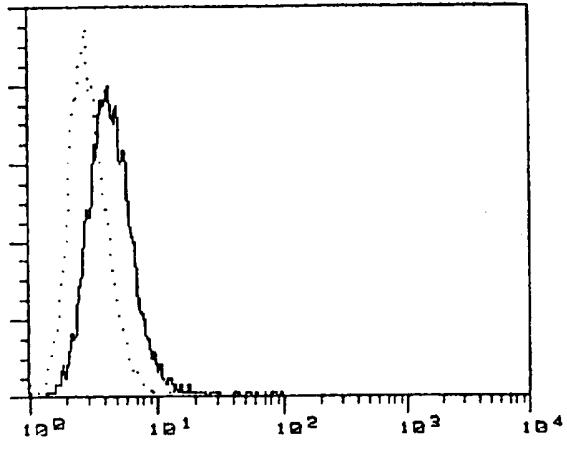
FIG. 13.

1144  
Número de ocorrências no contador



Intensidade relativa de fluorescência

Número de ocorrências no contador



Intensidade relativa de fluorescência

FIG.14.

FIG.15.