

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º** 86 144

**REQUERENTE:** SANDOZ, S.A., suíça, com sede em Basileia, Suíça.

**EPÍGRAFE:** "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DUMA PROTEÍNA TENDO  
ACTIVIDADE SEMELHANTE A FACTOR G-TsF HUMANO E  
DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE O CONTÊM".

**INVENTORES:** Rainer de Martin, Adriano Fontana, Erhard Hofer,  
Renate Hof Er-Warbinek e Michael Wrann.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris  
de 20 de Março de 1883. Austria 17 de Novembro de 1986, sob o nº  
A-2380, 10 de Dezembro de 1986, sob o nº A3274/86, 16 de De-  
zembro de 1986, sob o nº A3338/86 e A3342/86 e na Suíça em  
31 de Dezembro de 1986, sob o nº 05262/86 e 05263/86, 3 de  
Agosto de 1987 sob o nº 02963/87 e em 28 de Agosto de 1987,



P.I. Nº 86 144

MEMÓRIA DESCRITIVA DO INVENTO

PARA

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DUMA PROTEÍNA TENDO ACTIVIDADE SEMELHANTE A FACTOR G-TsF HUMANO E DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE O CONTÊM"

que apresenta

SANDOZ, S.A. suíça, industrial, com sede em Basileia, Suíça.

R E S U M O

A invenção refere-se ao processo para a preparação de factor supressor de células T (G-TsF) sob a forma substancialmente pura. Para isso, isolou-se, clonou-se e exprimiu-se ácido nucleico que codifica G-TsF e o seu peptido precursor em vários sistemas. Recupera-se o G-TsF de culturas transformadas para uso em diversas modalidades terapêuticas.

A pretente invenção diz respeito ao processo para a purificação duma proteína supressora de células T a partir de fontes naturais, à sua preparação mediante métodos recombinantes e à sua utilização.

## 1.- Enquadramento geral

Surgiu uma nova família de factores polipéptidos que regulamentam o crescimento e diferenciação das células.

Podem-se distinguir três linhas de pesquisa principais, as quais conduziram a factores relacionados com os polipéptidos da presente invenção, nomeadamente os factores  $\beta$  de transformação de crescimento (TGF- $\beta$ s), os factores provocadores de cartilagem (CIFs) e o factor supressor de células T derivado de glioblastoma (G-TsF). A presente invenção dirige-se e aplica-se principalmente ao factor supressor de células T derivado de glioblastoma (G-TsF). Como se torna aparente após os dados prioritários que são reivindicados pela invenção, o G-TsF podia ser idêntico aos TGF- $\beta$ 2 e/ou CIF-B.

### 1.1.- Os factores $\beta$ de transformação de crescimento (TGF- $\beta$ s)

Os TGF- $\beta$ s são homodímeros ligados a 25 Kd disulfeto e heterodímeros originalmente purificados de plaquetas humanas. Encontraram-se igualmente outros factores que estão funcionalmente e/ou estruturalmente relacionados com os TGF- $\beta$ s, como por exemplo novas formas de TGF- $\beta$ s, activinas, inhibinas e a substância inibidora de Muller (MIS) nos mamíferos, bem como o produto do complexo genético decapentaplégico em *Drosophila*.

A síntese destes polipéptidos faz-se normalmente como fazendo parte de precursores secretórios maiores como se deduz alguns deles mediante a análise de cDNAs correspondentes. A homologia destas proteínas umas com as outras reside principalmente nos domínios terminais C dos péptidos completos, nas partes que são geralmente clivadas do precursor para formar os dímeros bioactivos maduros. É particularmente notável a conservação de cisteínas múltiplas envolvidas em intra-cadeias e inter-cadeias da formação da ligação de disul

fetos. Comum a vários membros desta família de polipéptidos é o facto de aparentemente se envolverem em processos de diferenciação tais como embriogénese e reparação de tecidos.

Subsequentemente à primeira data prioritária reivindicada para a presente invenção, tornou-se aparente de que existem três formas de TGF- $\beta$ , nomeadamente TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 1.2, que resultam da combinação homodimérica e heterodimérica das sub-unidades  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 (S. Cheifetz et al., Cell 48 [Fevereiro 13, 1987] 409-415). O polipéptido originalmente descrito como sendo TGF- $\beta$  consistia de facto em duas sub-unidades  $\beta$ 1. As sub-unidades  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 estão mais proximamente relacionadas uma com a outra do que com quaisquer outros membros conhecidos da sua família genética e apresentam cerca de 70% na semelhança de sequência de aminoácidos nas suas metades de terminal N.

Outro aspecto notável dos membros da família TGF- $\beta$ , que só muito recentemente surgiu, é o elevado grau da conservação por sequência, como por exemplo 99% entre as sequências TGF- $\beta$ 1 humanas e dos ratos. Isto argumenta em prol do papel biológico crítico dos TGF- $\beta$ s nas espécies.

A função biológica dos TGF- $\beta$ s ainda não foi completamente esclarecida embora, como atrás se mencionou, seja muito diversificada. Deste modo in vitro eles inibem a proliferação de linhas de células epiteliais derivadas de tumores normais, mas provocam a proliferação de algumas células mesenquimas como uma possível resposta secundária a uma elevada recuperação de mitógenos autocrinos. A recuperação de fenótipos específicos por células com um potencial de diferenciação é frequentemente profundamente alterada pelos TGF- $\beta$ s. Deste modo eles bloqueiam a adipogénese, miogénese e hematopoiese enquanto promovem a condrogénese e a diferenciação de células epiteliais in vitro, e podem igualmente modular funções diferenciadas em linfócitos, células granulosas

*Winfred*

e adrenocorticais.

Os efeitos dos TGF- $\beta$ s in vivo têm sido menos investigados mas uma vez que eles se encontram presentes, em níveis relativamente elevados, em centros de diferenciação activa e em plaquetas sanguíneas, torna-se-lhe similar o envolvimento activo na génese de muitos tipos de tecidos em respostas ao desenvolvimento normal bem como em respostas à cicatrização de feridas.

Não existem dúvidas de que muitas células mesenquimais e epiteliais, cuja diferenciação e proliferação são afectadas pelos TGF- $\beta$ s, respondem a estes factores com uma elevada expressão de fibronectina, vários tipos de colagénio e outras proteínas de adesão de células. In vivo, a administração subcutânea provoca uma abundante deposição de colagénio.

Deste modo os TGF- $\beta$ s parecem afectar a diferenciação e a morfogénese por influenciarem ou regularem a interacção de células com a matriz extracelular, como por exemplo controlando a abundância e arquitectura da matriz extracelular bem como a capacidade das células em inter reagirem com ela, ou regulando os receptores e alvos intracelulares por outros factores de crescimento.

As funções do TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 não são idênticas e possuem diferentes propriedades de receptor-reconhecimento. Podem existir diferentes receptores para o TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2, alguns dos quais reagem transversalmente. Tal sugere uma função única para o TGF- $\beta$ 2. Ambos os factores parecem, contudo, serem equipotentes ao inibirem a proliferação de células epiteliais e a adipogénese e ao provocarem a expressão da fibronectina e colagénio.

A acção dos TGF- $\beta$ s é fortemente anabólica, especialmente no tecido correctivo, conduzindo à fibrose e angiogénese.

*Wifama*

- 5 -

As aplicações práticas vão assim em prol da recuperação dos tecidos danificados causados por trauma, queimaduras, intervenções cirúrgicas ou debilidade dos mais idosos; na osteoporose; e, em vista da sua acção supressiva nos linfócitos T e B, aplicam-se igualmente como agentes anti-inflamatórios ou imuno supressivos.

Os TGF- $\beta$ s, particularmente o TGF- $\beta$ 1, pode igualmente ser envolvido na regulação da hematopoiese (M. Ohta et al., Nature 329 [Outubro 1987] 539-540.

As sequências de aminoácidos e sequências nucleótidas para o TGF- $\beta$ 1 humano (originalmente denominado TGF- $\beta$ ) e seu precursor são conhecidas a partir de, por exemplo, R. Derynck et al., Nature 316 (1985) 701-704; R. Derynck et al., J. Cell. Biochem (1986) Supl. 10 C, 105; R. Derynck et al., J. Biol. Chem. 261 (5 Abril, 1986) 4377-4379; e Genentech EP 200 341 (publicado em 10 de Dezembro, 1986).

Aparentemente o TGF- $\beta$ 2 não tinha sido identificado como tal na primeira prioridade da presente invenção. Subsequentemente, publicaram-se sequências de aminoácidos parciais, como por exemplo para o primeiro TGF- $\beta$ 2 de porco, maduro de 29-N aminoácidos terminais em S. Cheifetz et al., Cell 48 (13 Fevereiro, 1987) 409-415 e para o primeiro terminal de aminoácidos 51N de TGF- $\beta$ 2 humano maduro em T. Ikeda et al., Biochemistry 26 (Meio 1987) 2406-2410; a sequência completa de aminoácidos do TGF- $\beta$ 2 humano maduro foi então publicado em H. Marquardt et al., J. Biol. Chem. 262 (5 de Setembro, 1987) 12127-12131, isto é mais tarde que as datas prioritárias para a presente invenção.

#### 1.2.- Factor B provocador de cartilagem (CIF-B)

Uma outra linha de pesquisa envolveu-se no isolamento, purificação e caracterização dos CIFs, mais precisa-

*Wifama*

mente do factor B (CIF B) provocador de uma proteína demineralizadora óssea dos bovinos denominada cartilagem (CIF-B), descrita por exemplo por S.M. Seyedin et al., PNAS 82 (1985) 2267-2271, e vários métodos de extracção ou purificação parcial deste mesmo factor B ou factores relacionados estão descritos, por exemplo, em Collagen EP 121 976 e USP 4 627 982.

O factor CIF-B está envolvido na formação óssea endocondral uma vez que é um potente produtor de condrogénese in vitro. Em Collagen EP 182 483 descrevem-se composições para implantação para efectuar a recuperação óssea, compreendendo um factor osteoindutivo de proteínas que podem possivelmente incluir CIF-B. A Collagen EP 213 776 divulga o uso de factores CIF-B para o tratamento de inflamações ou para o tratamento de uma disfunção ou malfunção da hematopoiese ou linfopoiese.

Divulgaram-se, parcial mas inexactamente, sequências de aminoácidos para os 30 aminoácidos de terminal N de factores CIF-B maduros isolados de ossos de bovinos como por exemplo em Collagen EP 163 016 e, durante o ano prioritário para esta invenção, em Collagen EP 213 776 (publicado em 11 de Março, 1987); a correcta sequência de aminoácidos para os 30 primeiros aminoácidos de terminal N do factor CIF-B maduro de bovino, foi publicada durante o ano anterior para a presente invenção em S.M. Seyedin, J. Biol. Chem. 262 (15 de Fevereiro, 1987) 1946-1949.

Sabe-se que o factor  $\beta 2$  de transformação de crescimento (TGF- $\beta 2$ ) e o factor  $\beta$  produtor de cartilagem (CIF-B) são provavelmente idênticos.

### 1.3.- Factor supressor de células T derivado de glioblastomas (G-TsF)

A terceira linha de pesquisa debruçou-se com o fac

Winfama

- 7 -

tor supressor de células T derivado de glioblastomas (G-TsF).

Os doentes com glioblastoma possuem uma imunidade mediada por células diminuída. Tal já era aparente em 1972 (W.H. Brooks et al., J. Exp. Med. 136 [1972] 1631-1647). Tanto os linfócitos periféricos sanguíneos e os linfócitos infiltrados no tumor dos doentes com glioblastoma apresentavam respostas proliferativas in vitro diminuídas. Além disso os doentes mostravam uma reactividade debilitada em testes in vivo da pele em relação a antígenos ubiquitários. Como no fluído e soro do quisto tumorigénico se encontra presente uma actividade immunossupressiva, antes e não depois se ter removido o tumor, a imunidade mediadora de células defeituosas tem sido atribuídas à produção de péptidos immunossupressivos pelas células de glioblastomas. Como apoio a esta concepção está a observação de que os sobrenadantes em bruto produzidos por várias linhas de células de glioblastomas cultivados pelo tumor inibem a proliferação de timócitos produzidos pela lectina bem como o crescimento de células T clonadas provocadas pela interleucina e a produção de células T citotóxicas aloreactivas (A. Fontana et al., J. Immunol. 132 [1984] 1837-1844; M. Schwyser e A. Fontana, J. Immunol 134 [1985] 1003-1009).

O G-TsF tem sido descrito, em vários estados de pureza, em diversas obras literárias e patenteado sem uma informação sequencial na sua forma natural, parcialmente purificada, como por exemplo em Sandoz EP 159 289, que descreve a caracterização bioquímica e purificação parcial do factor G-TsF. Outras publicações são, por exemplo, A. Fontana et al., J. Immunol. 132 [1984] 1837-1844 e M. Schwyser e A. Fontana, J. Immunol. 134 [1985] 1003-1009.

Este factor supressor de células T aumenta a formação de tecido correctivo, possui uma forte actividade anabólica e origina a fibrose e angiogénese.

Durante o ano prioritário para a presente invenção, a purificação do G-TsF até à homogeneidade e a sequência de amino terminal para os primeiros 20 aminoácidos da proteína madura, foram descritos, por exemplo, em M. Wrann et al., EMBO J. 6 (Junho de 1987) 1633-1636.

## 2.- Sumário da Invenção

Da descrição precedente parece que existe a necessidade de se ter os factores isolados na sua forma pura e, além disso, tê-los disponíveis em quantidades suficientemente grandes para possibilitar a preparação de derivados, a realização de mais testes e o seu uso em várias modalidades terapêuticas, isto é, ter esses factores disponíveis em forma recombinante.

A presente invenção consegue alcançar tal fim através dum processo que compreende

- a) isolar-se o factor G-TsF humano em forma substancialmente pura duma fonte natural como sejam as células de glioblastoma e
- b) preparar-se G-TsF recombinante e o seu precursor péptido

No que respeita a a), tal é conseguido usando-se técnicas da química proteica. Obtiveram-se duas variantes de G-TsF possíveis, uma das quais foi totalmente caracterizada.

O produto G-TsF possui uma pureza de, pelo menos, 90%. A sua actividade específica é de, pelo menos,  $5 \times 10^2$  unidades/mg nos ensaios de timócitos. A inibição máxima média é obtida numa concentração de  $1 \times 10^{-11}$  ou menos nesses mesmos ensaios.

Quanto a b), a presente invenção torna disponíveis, pela primeira vez, as sequências completas dos aminoácidos e nucleótidos para G-TsF maduro e G-TsF precursor e os cDNAs correspondentes.

A presente invenção proporciona assim G-TsF recombinante maduro e um processo para a preparação de G-TsF maduro por técnicas de DNA recombinante, e cDNAs correspondentes.

Além disso, a invenção proporciona ainda um percurso de G-TsF recombinante e um processo para a preparação de precursor de G-TsF por técnicas de DNA recombinante e cDNAs correspondentes.

Proporciona ainda uma parte precursora de G-TsF recombinante e um processo para a preparação de um precursor de G-TsF recombinante por técnicas de DNA recombinante, e cDNAs recombinantes.

O factor G-TsF maduro recombinante ou G-TsF precursor pode ser humano ou não-humano, como por exemplo uma forma de mamíferos. A preferida é a forma humana.

A presente invenção torna deste modo possível, pela primeira vez, a produção de G-TsF maduro, precursor de G-TsF e parte precursora de G-TsF em quantidades suficientes para aplicações terapêuticas, uma maior investigação das suas actividades biológicas multi-facetadas e, com base no reconhecimento das sequências, a produção de derivados.

Na fig. 2d) ilustra-se uma forma de realização preferida das sequências de CDNA e de aminoácidos para o factor G-TsF. As sequências completas são para o precursor G-TsF. A seta separa as sequências para a parte de G-TsF precursor das sequências de G-TsF maduro, as sequências para o G-TsF maduro aparecem igualmente na fig. 2a).

As expressões "precursor" e "parte precursora" como aqui são utilizadas, possuem significados diferentes entendendo-se por "precursor" a cobertura do péptido completo incluindo o péptido maduro, enquanto a expressão "parte precursora" significa as sequências para o péptido completo menos

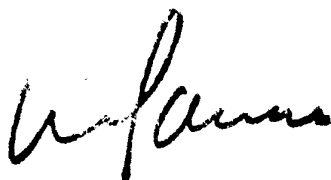
as sequências para o péptido maduro.

As variantes alélicas (isto é, as alterações de base das sequências que ocorrem naturalmente numa espécie que podem ou não alterar a sequência de aminoácidos) do nucleótido e sequências de péptidos correspondentes das figs. 2a) e 2b), e as variações na sequência de nucleótidos resultante da geração do código genético são igualmente incluídas na utilização prevista pela invenção, onde vão codificar um polipéptido possuindo actividade de G-TsF.

As variações nas sequências das figs. 2a) e 2d), que são causadas por mutuações pontuais ou modificações mais amplas para intensificar a actividade ou produção da proteína, não deveriam alterar, por expressão, as principais propriedades funcionais e estruturais da proteína madura ou precursora para a qual a sequência codifica.

Por conseguinte, tais variações na sequência são abrangidas na invenção. Tais modificações nos nucleótidos, deriberadamente architectadas na sequência DNA, podem ser feitas por alguém conhecedor deste campo utilizando técnicas conhecidas. Tal modificação pode causar a anulação, inserção ou substituição de aminoácidos na sequência do péptido ou do prepéptido para G-TsF. Por exemplo, a substituição de um ou mais dos resíduos de cisteína na sequência de codificação pode eliminar a ponte dissulfeto correspondente. Adicionalmente, a substituição, inserção ou anulação de um aminoácido num ou mais locais de reconhecimento da glicosilação ligada à asparagina tripéptida na sequência precursora pode resultar numa não-glicosilação nesse local. São bem conhecidas as técnicas mutagénicas utilizadas em tal substituição ou anulação.

Conhecem-se os processos para a selecção de células hospedeiras apropriadas e os métodos para a transformação, cultura e visionamento bem como para a produção e purificação



do produto.

As células dos mamíferos podem ser empregues como células hospedeiras para a produção de G-TsF. Uma linha de células de mamífero particularmente apropriada é a linha de célula do Ovário do Criceto Chinês (CHO). Outra linha de células de mamífero apropriada é a linha de célula do macaco COS-1 ou a linha de célula CU-1.

Podem-se também utilizar células de levedura. Adicionalmente, as células de insectos podem igualmente ser empregues como células hospedeiras em combinação com vectores de insectos, como por exemplo vectores virais, no método da presente invenção. Além disso, pode-se utilizar a vaccinia viruses recombinante para produzir G-TsF numa vasta variedade de mamíferos, como por exemplo células humanas.

Outro aspecto da presente invenção proporciona vectores para serem utilizados no método de recuperação de G-TsF, que contêm as mesmas, ou substancialmente as mesmas, sequências de nucleótidos como atrás se registou. Os vectores contêm igualmente sequências de controlo apropriadas que permitem a recuperação da sequência de G-TsF. Alternativamente, os vectores que englobem sequências alélicas modificadas ou que surgiram naturalmente constituem igualmente formas de realização da presente invenção. O vector pode conter sequências reguladoras seleccionadas em associação operativa com as sequências que codificam G-TsF por técnicas de DNA que atrás se descreveram, as quais são capazes de dirigir a sua reaplicação e recuperação em células hospedeiras seleccionadas. Conhecem-se neste campo sequências regulatórias úteis para tais vectores e que podem ser seleccionadas dependendo das células hospedeiras escolhidas.

O método para preparar G-TsF recombinante compreende a recuperação de G-TsF segregado duma célula hospedeira

transformada com um gene que codifica para G-TsF.

Em particular, este método compreende

- a) a construção dum vector que inclui ácido nucleico que codifica para G-TsF,
- b) a transformação de uma célula hospedeira heteróloga com o vector,
- c) a cultura da célula hospedeira transformada e
- d) a recuperação de G-TsF segregado pela cultura.

O processo da presente invenção proporciona o ácido nucleico que codifica para G-TsF maduro ou precursor G-TsF, sendo útil na construção dos supracitados vectores. Este ácido nucleico ou um ácido nucleico capaz de hibridizar pode igualmente ser classificado e usado em ensaios de diagnóstico para DNA ou mRNA que codificam G-TsF, seu precursor ou proteínas que lhe são relacionadas.

A preparação de derivados de G-TsF por métodos recombinantes foi tomada possível pelo conhecimento da sequência que codifica para G-TsF ou a sequência que codifica G-TsF e seu precursor aqui divulgadas. Estes derivados incluem mutantes silenciosos ou segregados no ácido nucleico que codifica para o G-TsF maduro ou que codifica para o G-TsF precursor.

Os montantes silenciosos envolvem a substituição de um codou degenerado por um outro em que ambos codificam para o mesmo aminoácido, cuja substituição podia exercer um efeito salutar na produção de G-TsF em cultura recombinante, como por exemplo por modificação da estrutura de mRNA secundária. Tal substituição pode ser identificada pela peneiração de produções de G-TsF a partir de transformantes.

Os mutantes de G-TsF segregados classificam-se por

uma ou mais do que uma destas classes: anulações, substituições ou inserções. As anulações caracterizam-se pela eliminação dos resíduos de aminoácidos sem a introdução de um resíduo de substituição. O G-TsF DNA anulado por mutação é útil para fazer fragmentos, por exemplo que seja desejado anular um epítoto imune.

As mutações de substituição são aquelas em que se substituiu um resíduo de aminoácido por outro. Tais mutações são extremamente difíceis de realizar por métodos diferentes do da síntese recombinante, especialmente as substituições programadas para o interior da primeira sequência de aminoácidos. São úteis para modificar a actividade biológica do G-TsF.

Os mutantes de inserção são aqueles em que se colocou um ou mais resíduos dentro de ou em qualquer uma das extremidades do ácido nucleico de G-TsF. As fusões são tipicamente uma espécie de mutantes de inserção em que a inserção se dá nos resíduos terminais carbóxi ou amino do G-TsF.

### 3.- Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 mostra os oligonucleótidos usados para escolher a biblioteca do cDNA. As duas amostras basearam-se nas sequências de aminoácidos ilustradas. A posição 22 mostrou-se mais tarde como sendo isolencina. A amostra A consistia em dois oligonucleótidos sobrepostos, um 39-mer e um 42-mer, com 12 nucleótidos complementares na sua extremidade 3'. Após se terem fundido e enchido com o fragmento Klenow da polimerase de DNA I, obtiveram-se os dois 69-mers correspondentes aos cordões de codificação ou não-codificação. Estão indicadas por asteriscos as posições da sequência nucleótida correspondentes a sequência de cDNA determinada. A amostra B consistia numa mistura de dezasseis 29-mers. Inseriram-se, em posições ambíguas, os resíduos de deoxinosina ou deoxicé-

tidina e de deoxitimidina como se indica.

A Figura 2a) mostra as sequências completas de nucleótidos e de aminoácidos do G-TsF maduro humano. As semelhanças de aminoácidos para TGF- $\beta$ 1 estão sublinhadas. A seta indica o local da clivagem da protease e o início da proteína madura.

A Figura 2b) ilustra a estratégia de sequência que se seguiu para se chegar à sequência do cDNA na região do G-TsF maduro. Após se sub-clonar a inclusão EcoRI de SUP25 lambda em pBS.M13, parte da sequência foi estabelecida pelo método Sanger de terminar a cadeia com dideoxi usando a Amostra B (ver a Fig. 1) como iniciadora. Procedeu-se à síntese de dois oligonucleótidos mais correspondentes a partes da sequência obtida foram utilizados para obter a sequência que codifica para a maior péptida de G-TsF, como se mostra.

A Figura 2c) é um diagrama esquemático e um mapa parcial da restrição da endonuclease do G-TsF cDNA. A sequência que codifica está encaixada e o péptido maduro está indicado pela parte sombreada na extremidade 3'. Sobre o diagrama estão alinhadas as inclusões do cDNA em sequência de lambda SUP25, lambda SUP40 e lambda SUP42.

A Figura 2d) mostra as sequências de nucleótidos e de aminoácidos para o precursor G-TsF humano. Aí se mostra a sequência de nucleótidos da região de lambda SUP25 por dois outros clones independentes (posição 1-1695). Uma torsão hidrofóbica de 15 aminoácidos, constituindo provavelmente parte da pré-peça da parte do precursor G-TsF, e o péptido do G-TsF maduro na extremidade do terminal carboxi estão sublinhados por um traço grosso. O sítio da clivagem da protease postulada está indicado por uma seta numa das extremidades do péptido G-TsF. A torsão dos aminoácidos básicos que precedem a clivagem está indicada por uma linha a tracejado.

*Winfance*

Sublinham-se com um traço fino três possíveis locais de glicosilação na sequência do precursor.

A Figura 2e) é uma comparação entre as sequências de aminoácidos dos precursores G-TsF e TGF- $\beta$ 1, analisados de acordo com o programa de "alinhamento" padrão da InteleGenética. Introduzem-se intervalos para maximizar as semelhanças de sequências entre as duas proteínas. Indicam-se aminoácidos idênticos por asteriscos. As 112 formas de grandes aminoácidos maduros dos péptidos estão encaixados.

A Figura 3a) mostra o vector de recuperação de células CHO- e COS denominado p91023(B)-SUP25-1 contendo a dimensão completa cDNA AdMLP = promotor do último adenovirus maior; DHFR = cDNA de reductase de dihidrofolato.

A Figura 3b) ilustra a recuperação de plasmido denominada pXMT3.neo7/SUP40-1 para as células CHO- e COS- com cDNA SUP40. AdMLP = promotor do último adenovirus maior; TKP = promotor quinase timidina do virus Hermes simples; DHF3 = cDNA de reductase de dihidrofolato.

A Figura 4 mostra a última fase de purificação para G-TsF a partir de 308 células de glioblastoma do cobrenadante 11 glioblastoma em Fro-RPC<sup>TM</sup> com ácido trifluoracético/ /isopropanol. As fracções do FPLC de fase inversa sobre Fro-RPC<sup>TM</sup> foram testadas por causa da proliferação de timócitos provocada pelo ConA a uma diluição final de 1:5.000. Adicionalmente, liofilizaram-se 100-microl aliquotas das fracções na presença de 1 gr. de manitol sendo analisadas por SDS-PAGE sob condições de diminuição numa composição de 10-15% de gel de poliacrilamida e estanhado de prata. As faixas 29, 30 e 31 mostram as proteínas presentes nas três fracções com actividade G-TsF. Indica-se a migração dos marcadores de proteínas de peso molecular (BR).

A Figura 5 mostra a actividade de G-TsF humano puro em

dois sistemas de ensaios:

- A - Efeito inibitório do G-TsF (●) e do TGF- $\beta$ 1 (▲) dependente da dose na proliferação de timócitos provocados por CON-A. O dissolvente (0,1% de ácido trifluoracético em 25% de 2-propanol v/v) usado na eluição do G-TsF da coluna Pro-RPC<sup>TM</sup> final foi tirado como um tampão de controle para o G-TsF.
- B - A supressão do crescimento de célula T dependente de IL-2 pelo G-TsF e TGF- $\beta$ 1. Cultivaram-se as células auxiliares T específicas da ovalbumina na presença de várias concentrações de IL-2 recombinante juntamente com G-TsF (●) a uma concentração de  $1,6 \times 10^{11}$  ou TGF- $\beta$ 1 (▲) a uma concentração de  $10^{-10}$  M. Os controles consistiam em dissolventes (veja atrás) ou em meio no qual se diluiu o TGF- $\beta$ 1 (○/△).

A Figura 6 mostra a purificação final de G-TsF a partir de 10 l de sobrenadante de glioblastoma em Pro-RPC<sup>TM</sup> com ácido trifluoracético/isopropanol. Testaram-se as frações provenientes da fase inversa de FPLC sobre Pro-RPC<sup>TM</sup> no ensaio de proliferação de timócitos. A inserção mostra o SDS-PAGE de 100 microl aliqual a partir das frações 28 a 34 como se descreveu para a Fig. 4.

A Figura 7a) é um mapa do plasmídeo denominado pP<sub>L</sub>Sl-SUP25-1 para recuperação do G-TsF em E.coli com base num promotor lambda. P<sub>L</sub> = promotor lambda.

A Figura 7b) mostra a construção do plasmídeo de recuperação pP<sub>L</sub> Sl-SUP25-1. O fragmento parcial Hae III-XbaI do G-TsF cDNA derivou convertendo-se primeiro o local Hae III na posição 2141 do lambda SUP25 cDNA com elos XbaI para um local XbaI. Realizou-se então a clivagem parcial do cDNA com Hae III e XbaI.

A Figura 8 mostra a recuperação e purificação do G-TsF

recombinante de E. coli:

- A. - Imunomancha da proteína E. coli total recuperada a seguir à indução do promotor  $\lambda$  P<sub>L</sub> à temperatura de 42°C. As faixas 0 a 6 são dos vários tempos de incubação.
- B. - SDS-PAGE das fracções 30 e 31 do FPLC de fase inversa sobre Pro-RPC<sup>TM</sup> mostrando que se recupera essencialmente G-TsF puro a partir do Pro-RPC<sup>TM</sup>.

A Figura 9 indica a inibição da proliferação de timócitos da proteína E. Coli pelo G-TsF recombinante

A Figura 10 mostra a demonstração de recuperação do G-TsF recombinante numa imunomancha de células sobrenadantes obtidas de células CHO.

Faixa 1 - Sobrenadante das células de controle CHO intersectadas com o vector livre de cDNA (pXMT3.neo7).

Faixa 2 - sobrenadante das células CHO intersectadas com o vector contendo G-TsF cDNA (pXMT3.neo 7/SUP40-1) e seleccionadas em 1 nM metotrexato.

Faixa 3 - à semelhança da faixa 2, mas seleccionada em 10 nM metotrexato.

A Figura 11 mostra a inibição da proliferação de timócitos com G-TsF recombinante a partir de células CHO.

Diluição = diluição final de CHO sobrenadante em ensaio de timócitos.

□ = sobrenadante das células de controle CHO intersectadas com pXMT3.neo 7, sem activação ácida

○ = como □, mas sem activação, com 1M de ácido acético durante a noite sob temperatura ambiente.

■ = sobrenadante das células CHO intersectadas com pXMT3.neo 7/SUP40-1 e seleccionadas em 10 nM metotrexato,

sem activação ácida.

● = como em ■, mas com activação ácida como em ○.

É visível alguma inibição endogenosa, por células CHO activadas pelo ácido, o que poderia ser causado por G-TsF ou qualquer outro factor tal como o TGF- $\beta$ 1 produzido pelas células CHO; contudo, a produção de material recombinante origina um aumento na actividade supressiva de pelo menos 2 ordens de magnitude.

#### 4. - DESCRIÇÃO DETALHADA

4.1 - Num primeiro aspecto o factor G-TsF foi purificado até atingir a homogeneidade e fez-se a sequência de 20 primeiros aminoácidos da proteína humana madura:

Purificou-se o G-TsF após a concentração e defiltração dos sobrenadantes derivados das células de glioplasma, num processo que incluiu uma cromatografia sobre hidróxilapatite e Pro-RPC<sup>TM</sup>, cromatografia de permuta de catiões sobre Mono-S<sup>TM</sup> e uma fase final invertida de FPLC sobre Pro-RPC<sup>TM</sup>. A fase decisiva do esquema de purificação foi a cromatografia de permuta de catiões sobre Mono-S<sup>TM</sup> que resultou numa purificação dobrada em 16 e permitiu a correlação da actividade biológica para uma faixa de proteínas 12,5 Kd sobre SDS-PAGE. Tal foi confirmado pela fase da cromatografia final de fase inversa (vidé Fig. 4) uma vez que após SDS-PAGE e o estanhamento a prata se detectou em três fracções uma única faixa de 12,5 Kd. As intensidades destas faixas correlacionavam-se com a actividade G-TsF ao ensaio de timócitos. Além disso, a actividade específica de  $5 \times 10^7$  unidades/mg calculada para a faixa 12,5 Kd, é comparável a outras citocinas.

A partir deste material obtiveram-se os primeiros 20 aminoácidos de terminal amino de G-TsF maduro (vidé tam-

*Winfance*

bém Fig. 2a), por sequência de fase gasosa da fracção de pico: AlaLeuAspAL<sub>5</sub>aAlaTirCisPheArgAsnValGlnAspAsnCisLeuArgProLeu<sub>20</sub>.

Como se demonstrou na Fig. 2e) tanto o factor G-TsF como o TGF- $\beta$ 1 das plateletas de porco (Sistema R & D) inibiram a resposta proliferativa de timócitos provocada por Concanavalina A. A concentração necessária para uma activação da inibição de timócitos média e  $10^{-11}$  para TGF- $\beta$ 1. Observa-se uma curva de resposta à dose quase idêntica usando-se G-TsF purificado em vez de TGF- $\beta$ 1, dando-se a inibição média em  $8 \times 10^{-12}$  M. Como o sobrenadante em bruto de 308 células de glioblastoma suprimia, como se descobriu originalmente, a actividade das células T por interferir com o efeito de IL-2, analisaram-se o G-TsF e TGF- $\beta$ 1 purificados numa linha de células T auxiliares específicas da ovalbumina (OUA-7T), estabelecida a partir do C57 BL/6 de ratos. Nas concentrações testadas (G-TsF em  $1,6 \times 10^{-11}$  M; TGF- $\beta$ 1 em  $10^{-10}$  M) ambos os factores inibiram o crescimento de células OVA-7T, dependente de IL-2, quase completamente (Figura 5, parte B). O grau de inibição era independente de concentrações de IL-2 entre 1 e 256 unidades/ml.

Na sua forma biologicamente activa o G-TsF humano é um dímero de duas sub-unidades idênticas unidas por uma intercadeia de união cruzada sobre pontas disulfeto. A dimerização pode preceder o processamento proteolítico. São igualmente biologicamente activos os heterodímeros com factor TGF- $\beta$ 1.

O G-TsF biologicamente activo é aqui descrito com o G-TsF que é capaz de inibir a proliferação de timócitos provocada por Concanavalina-A, e o crescimento de clones de células T provocado por IL-2. Estes ensaios estão descritos no Exemplo que adiante se descreve e em várias publicações.

Isto define igualmente o significado da expressão "actividade similar à do G-TsF".

Quando se usa "G-TsF maduro" sem qualquer outra qualificação, significa possuindo mais do que uma semelhança de 71%, da sequência de aminoácidos estando a sequência de aminoácidos indicada na Fig. 2d) a seguir à seta, como por exemplo > 90%.

Quando se utiliza "G-TsF precursor" sem qualquer outra qualificação significa uma proteína com uma semelhança da sequência de aminoácidos superior a 30% com a sequência completa de aminoácidos na Fig. 2d), como por exemplo > 60%.

Num dos seus aspectos a invenção proporciona assim, para G-TsF humano substancialmente puro e para um processo para a preparação de G-TsF humano substancialmente puro compreendendo uma dose de cromatografia de permuta de catiões, preferencialmente uma fase de cromatografia de permuta de catiões sobre mono-S<sup>TM</sup>. Em particular, o processo compreende:

- a) concentração e defiltragem de sobrenadantes de células de uma fonte natural de G-TsF, tal como células de glioblastoma,
- b) cromatografia sobre hidróxi lapatite,
- c) cromatografia de fase inversa sobre Pro-RPC<sup>TM</sup> usando-se, como eluente, ácido trifluoracético/acetonitrilo (2x),
- d) cromatografia de permuta de catiões, preferencialmente sobre Mono-S<sup>TM</sup>, e
- e) cromatografia de fase inversa sobre Pro-RPC<sup>TM</sup> usando-se, como eluente, ácido trifluoracético/2-propanol.

Uma maior purificação do G-TsF a partir de 10 l de glioblastomas sobrenadantes produziu um vasto pico duplo do material 12,5 Kb durante a última FPLC de fase inversa sobre

Pro-RPC<sup>TM</sup>, o que indicou a presença de dois picos sobrepostos de dois péptidos ligeiramente separados. Material referente a toda a área do pico duplo mostrou haver uma bioactividade similar no ensaio da proliferação de timócitos (vide Fig. 6). Deste modo sujeitou-se o material do primeiro e segundo pico à uma sequência de fase gasosa. O material do primeiro pico (fracção 30) deu uma sequência aminoterminal idêntica à primeira ilustrada na Fig. 2a). Contudo, o material recuperado do segundo pico (fracção 32) produziu a seguinte sequência aminoterminal:

AlaLeuAspAlaAlaTirCisPheArgAsnValGlnAspAsnCisIleLeuArgProLeu  
 5 10 15 20  
 TirIleBlankPheVal  
 25

Esta sequência parcial difere da sequência correspondente na Fig. 2a) porque tem Ile em vez de Cis na posição 16 e Val em vez de Lis na posição 25 (Não se conseguiu determinar com toda a certeza o aminoácido correspondente ao Asp na posição 23 do material a partir da fracção 30).

Esta outra sequência podia bem ser a mesma daquela da porção N-terminal dum variante do G-TsF terminal. A presente invenção engloba também esta e outras variantes.

4.2. - Num segundo aspecto a sequência citada foi usada para se obter G-TsF por técnicas de DNA recombinante.

4.2.1.- Esta produção pode ser efectivada de acordo com métodos geralmente conhecidos, como por exemplo usando-se processos similares aos descritos por T. Maniatis et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982).

Contudo, no que respeita o TGF- $\beta$ 1, o G-TsF recombinante demonstrou dificuldades em sintetizar durante a sua actividade. Como se pode ver pela Fig. 2 a) a sequência de aminoácidos maduros contém um grande número de resíduos de

cisteína, dos quais pelo menos alguns estão aparentemente envolvidos em reticulação intercadeia na formação de G-TsF homodimérico, o qual é recuperado de fontes naturais. Além disso o G-TsF é recuperado como uma molécula precursora possuindo uma grande região terminal amino a qual está provavelmente envolvida em direccionar o último percurso de G-TsF, isto é transportá-lo através das membranas reticulum endoplasmáticas, transposição correcta do polipéptido precursor incluindo a formação de pontes disulfeto inter - e intramoleculares, armazenagem em vesículas segregadoras e regulação da clivagem proteolítica seguida pela segregação do péptido bioactivo. Contudo, tem sido possível transformar as células encarióticas de forma a segregarem G-TsF heterólogo, sem resistência por parte da dificuldade em proceder apropriadamente o primeiro produto de translação em cultura recombinante. Conseguiu-se igualmente a produção do péptido de G-TsF maduro em E. Coli.

A invenção abrange G-TsF maduro recombinante e a sua parte precursora, a sua síntese recombinante e a formação de G-TsF bioactivo por via do seu precursor; particularmente, o F-TsF biologicamente activo possuindo as sequências da Fig. 2d), incluindo o G-TsF precursor, o G-TsF maduro e a parte precursora de G-TsF, e fragmentos polipéptidos, inserção, substituição e/ou anulação dos seus mutantes. Compreende por exemplo a preparação de G-TsF dimérico bioactivo por via da síntese prévia do G-TsF precursor ou de partes do G-TsF precursor, essenciais ao processamento de transposição e proteolítico.

As amostras oligonucleótidas ilustradas na Fig. 1 foram deduzidas da sequência de proteínas de G-TsF parcial e foram utilizadas para proteger a biblioteca cDNA derivada da linha de células de glioblastoma humano 308. Esta biblioteca estabelecida em lambda gt 10 tinha sido previamente seleccionada

nada pela sua dimensão para inserções maiores que 1600 bp. Após se protegerem um total de 100.000 fagos recombinantes, detectou-se apenas um clone produzindo um sinal com ambas as amostras. Usando-se a amostra --- B como uma base sequencial descobriu-se que ela continha análogos ao TGF- $\beta$ 1. Este clone, denominado lambda SUP25, foi subsequentemente usado para isolar clones cDNA adicionais para G-TsF (lambda SUP40 e lambda SUP42).

A estratégia sequencial seguida para estabelecer a sequência nucleotídica na zona que codifica para o péptido maduro, está ilustrada na Fig. 2b).

Na Fig. 2c) mostra-se um mapa parcial de restrição de enzimas do G-TsF cDNA. Na Fig. 2d) mostra-se a sequência de nucleótidos, que é determinada ao fazer-se a sequência das duas torsões do inserto no clone lambda SUP25 da posição 1 para a 1695 e a sequência de aminoácidos deduzida, incluindo a sequência da proteína precursora. Fez-se a sequência das inclusões dos clones lambda SUP40 e lambda SUP42 para ambas as extremidades de 300 nucleótidos e para toda a região que codifica para o péptido G-TsF maduro com a ajuda de iniciadores oligonucleótidos internos específicos. Estes cDNAs começam dentro de vários nucleótidos desde a extremidade 5' do lambda SUP25 e terminam nas posições 1534 e 1695, respectivamente. Estas consequências foram por outro lado consideradas como sendo idênticas às do inserto de lambda SUP25, que no entanto é maior na extremidade 3'.

A região 5' do G-TsF DNA não traduzida é AT rico (71% AT) e nas posições 182-184 localiza-se um codon de iniciação de translação ATG. Este codon é na maioria das vezes utilizado para o início da translação visto que é o primeiro ATG numa estrutura de leitura aberta para um aminoácido 414 - proteína longa contendo a sequência terminal amino do

péptido G-TsF nas posições 303-323 dos aminoácidos. Adicionalmente é imediatamente precedido por vários codons de paragem na mesma estrutura de leitura aberta e os vinte primeiros aminoácidos da referida proteína mostram a forte característica hidrófoba dos péptidos de sinal. O primeiro grupo de significativa homologia em relação ao dito TGF- $\beta$ 1 precursor dá-se a partir dos aminoácidos 21 para 24. Não se encontrou qualquer homologia para a sequência de consenso observada à volta do local de iniciação de translação de outros mRNAs, excepto uma purina na posição -3. Contudo os codons ATG que se seguem nas posições 266, 278 e 503 não são seguidos por uma sequência que codifica para uma corrida significativa de aminoácidos hidrofóbicos.

A clivagem pós-translacional do precursor origina o G-TsF maduro. Não se conhece a disposição da parte precursora mas pode dar origem a outros péptidos biologicamente activos. O G-TsF precursor contém vários pares de resíduos básicos que poderiam igual seguir uma clivagem pós-translacional e originar entidades de polipéptidos separados.

#### 4.2.2. - Construção de uma biblioteca cDNA

Isolou-se RNA usando-se o método da ureia-LiCl e seleccionou-se RNA poliadenilado por cromatografia de oligo (dt) celulose. A primeira torsão cDNA foi então alvo de síntese com transcriptase de fase inversa, convertendo-se o RNA/DNA em cDNA de dupla torsão. Tornou-se as extremidades cDNA cegas com nuclease SI e polimerase T4 DNA, metilados com metilase EcoRI, ligado aos elos EcoRI fosforilados sendo os produtos digeridos com quantidades EcoRI em excesso. Seleccionou-se o cDNA pelas suas dimensões e recuperaram-se os fragmentos acima de 1600 bp por extracção de fenol e precipitação de etanol. Após ligação ao lambda gt 10, incubou-se o DNA recombinante com uma extracção de embalagem in vitro, estabelecendo-se a biblioteca a seguir à infecção de E.Coli 0600

hfl por galvanização sobre chapas agar BBC e eluindo-se as fagos da camada cimeira agar.

#### 4.2.3. - Peneiramento da biblioteca

Aproximadamente 10.000 fagos recombinantes foram placados em E. Coli C600 fazendo-se uma cópia das placas em filtros de nylon. Processaram-se e peneiraram-se então os filtros usando-se duas amostras provenientes dos aminoácidos de G-TsF de terminal amino (Fig. 1). As amostras de oligonucleótidos foram sintetizadas com um sintetizador DNA. Uma amostra consistia numa mistura de dezasseis 29-mer correspondentes a uma porção longa de dez aminoácidos. Foi etiquetada com T4 polinucleótida cinase e  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP. A segunda amostra consistia de um 39-mer e um 42-mer (Fig. 1) com 12 bases complementares na sua extremidade 3', que podia deste modo ser enchida após aquecida usando  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dGTP e o fragmento Klenow da polimerase I do DNA. Pré-hibridizaram-se os filtros durante um período entre 4 até 6 horas hibridizando-se então os filtros com as amostras durante 16 horas à temperatura de 42°C. Lavaram-se os filtros em 5 x NET à temperatura de 42°C, 0,2% SDS, lavando-se depois novamente sob temperaturas gradualmente aumentadas até um máximo de 55°C. Rechapearam-se e repeneiraram-se áreas das placas dando sinais com ambas as amostras à temperatura de 47°C. Apenas uma placa deu sinais reproduzíveis com ambas as amostras e o cDNA dela recuperado foi mais tarde usado para repeneirar a biblioteca.

#### 4.2.4. - Subclonação e sequenciamento

Extraíu-se lambda DNA de clones positivos após se efectuar um processo de minipreparação. As inclusões cDNA foram recuperadas após a clivagem EcoRI e subclonadas no vector de sequência pBS. M13 (Stratagene). Realizou-se a sequência DNA usando-se o método de Sanger da cadeia terminada em

dideoxi. Para se obter um conjunto de sequências sobrepostas em ambas as direcções, digeriu-se primeiro o inserto com Hind III. Obtiveram-se assim subclones dos fragmentos de Hind III quer por meio de exonuclease e digestões de nucleasa de feijão mungoquer por clivagem em sítios de restrição revelados em dados parciais da sequência. Obteve-se uma informação adicional sobre a sequência na região do péptido G-TsF maduro com ajuda de iniciadores oligonucleótidos sintéticos. Resolveram-se áreas ambiguas que permaneceram após o sequenciamento de toda a zona em ambas as direcções com polimerase de Klenow DNA, usando-se transcriptase de fase inversa para a reacção de alongamento da cadeia.

O sequenciamento (vidé Fig. 2d) mostrou que o G-TsF é traduzido como uma proteína precursora da qual se tem que libertar a proteína madura por clivagem proteolítica. Esta proteína activa é um dímero constituído por duas partes péptidas maduras. A sequência de aminoácidos do péptido G-TsF maduro começa na posição dos aminoácidos 303 do precursor. O precursor G-TsF contém três locais potenciais para a N-glicosilação.

É de 12.320 daltons o peso molecular calculado para o G-TsF maduro da Fig. 2d). A molécula completa, incluindo tanto a parte precursora como a madura, possui um peso molecular calculado de 45540 daltons (desconsiderando uma possível glicosilação).

O G-TsF maduro pode ser O-glicosilado e o precursor G-TsF pode ser C- e/ou N-glicosilado. Tais formas glicosiladas formam igualmente parte da invenção, bem como as formas alélicas e/ou variantes.

A comparação entre da sequência de G-TsF maduro com as sequências publicadas para factores relacionados durante o ano prioritário para esta invenção, nomeadamente pa-

*Wifama*

- 27 -

ra os primeiros aminoácidos de terminal 29N de TGF- $\beta$ 2 de porco (S. Cheifetz et al., Cell 48 [13 de Fevereiro, 1987] 409-415) ou para os primeiros aminoácidos de terminal 51-N de TGF- $\beta$ 2 humano (T. Ikeda et al., Biochemistry 26 [5 de Maio, 1987] 2406-2410), ou para os primeiros aminoácidos de terminal 30N de CIF-B bovino (S.M. Seyedin et al., J. Biol. Chem. 262 [15 de Fevereiro, 1987] 1946-1949) demonstram uma completa identidade: deste modo o G-TsF é o análogo humano dos factores citados e a considerável semelhança estrutural confirma a muito forte conservação de sequências entre as espécies, que também pode ser observada no caso do TsF- $\beta$ 1.

Como já atrás se mencionou em 1, a sequência completa de aminoácidos do TGF- $\beta$ 2 humano maduro tem sido independentemente publicada durante o ano prioritário para a presente invenção (H. Marquardt et al., J. Biol. Chem. 262 (5 de Setembro, 1987) 12127-12131); essa sequência é idêntica à sequência de aminoácidos para o G-TsF maduro na Fig. 2d).

O G-TsF mostra ainda uma semelhança da sequência de aminoácidos de 71% em relação ao TGF- $\beta$ 1. Esta semelhança é extremamente elevada dos aminoácidos 329 para 346 e para os aminoácidos de terminal 14 C (Fig. 2e)). Isto pode igualmente ver-se nos dois péptidos mais distantemente relacionados e na substância inibidora Muelleriana, em que as regiões correspondentes são as partes mais conservadas das moléculas. A semelhança estrutural é mais reforçada pela conservação no G-TsF de todos os nove resíduos de cisteína. É de 30% a semelhança entre a sequência de aminoácidos do G-TsF precursor e o TGF- $\beta$ 1 precursor.

Nas partes precursoras do TGF- $\beta$ 1 e G-TsF conservam-se também alguns padrões estruturais. Os péptidos maduros são obviamente libertados por clivagem proteolítica nos resíduos His-Arg. A homologia estrutural entre os precursores

G-TsF e TGF- $\beta$ 1 é muito menos pronunciada do que entre as proteínas maduras mas existem grupos definitivos de homologia de sequência espalhados sobre a parte precursora. Isto indica uma grande divergência evolucionária, uma regulação possivelmente diferente na produção do factor e um papel biológico possivelmente modificado. Os grupos de sequência conservados podem constituir domínios funcionais da molécula precursora envolvida no transporte e processamento da molécula e no controle da libertação do péptido G-TsF.

As características, tais como o peso molecular e similares, para o G-TsF maduro nativo ou do tipo selvagem da Fig. 2d) obtido das células de glioblastoma, são descritivas apenas para as espécies nativas de G-TsF. Os mutantes aqui considerados podem mudar consideravelmente as características do G-TsF nativo, podendo isto constituir na realidade o objectivo da mutagénese. Enquanto o G-TsF como aqui é considerado inclui G-TsF nativo, outros polipéptidos relacionados biologicamente activos serão abrangidos por essa definição. As espécies de G-TsF como mutantes de inserção, mutantes de anulação ou proteínas de fusão trarão o mutante para fora do peso molecular estabelecido para o G-TsF nativo. Por exemplo, as proteínas de fusão com G-TsF maduro ou precursor de G-TsF terão um peso molecular superior que o G-TsF nativo e G-TsF maduro ou precursor do G-TsF, enquanto os mutantes de anulação do G-TsF maduro ou precursor de G-TsF terão um peso molecular mais baixo. Similarmente o precursor de G-TsF ou o G-TsF podem ser calculados de forma a introduzir locais de glicosilação ou de substituir serina por cisteína em locais que não sejam críticos para a actividade biológica. Além disso, o processamento pós-translacional do pré-G-TsF humano, como por exemplo em linhas de células derivadas de mamíferos não primatas, pode produzir micro-heterogeneidade no terminal amino da região do G-TsF maduro, de forma a que a alanina não

mais será o terminal amino dos aminoácidos.

Cutros precursores poderão ser proteínas de fusão nas quais o G-TsF está unido, por uma ligação péptida no seu término carboxil, a uma proteína insolúvel ou gelatinosa. A sequência na região ou dentro da região desta ligação péptida é seleccionada de forma a ser susceptível à hidrólise proteolítica em que é libertado G-TsF, quer in vivo em geração in situ, quer in vitro como parte dum protocolo de fabricação.

G-TsF recombinante significa ordinariamente G-TsF de mamíferos, preferencialmente humano, recombinante; contudo o G-TsF recombinante de fontes tais como ratos, suínos, equinos ou bovinos está incluído na definição de G-TsF recombinante desde que doutra forma se enquadre nos padrões atrás descritos para a actividade biológica. O G-TsF não é específico à espécie. Por isso o G-TsF de uma espécie pode ser utilizado na terapia duma espécie.

O DNA que codifica o G-TsF pode ser obtido por síntese química, peneirando-se transcriptos de fase inversa de mRNA dos glioblastomas ou outras células, ou peneirando-se bibliotecas genómicas a partir de células encarióticas. Este DNA não necessita dos codons representados na Fig. 2d) desde que a célula hospedeira reconheça os codons que são utilizados e pode-se, sem dúvida, otimizar os codons a fim de melhorar a produção, de acordo com o sistema de recuperação.

4.3. - A Segregação pode ser obtida por qualquer apropriado sistema de recuperação pro-encariótico ou encariótico usando-se métodos conhecidos, como se descreve por exemplo em Genentech EP 200 341.

4.3.1. - Os vectores de recuperação apropriados são sequências DNA que codificam G-TsF e que ligam operacionalmen

*W. J. ...*

te com apropriadas sequências de controle capazes de efectuar a recuperação de G-TsF na célula hospedeira. Tais sequências de controle incluem um promotor transcripcional, uma sequência operadora opcional para controlar a transcrição, uma sequência que codifica apropriados locais de união dos ribossomos de mRNA e sequências de controle a terminação ou transcrição e tradução. Para recuperar o G-TsF em células encarióticas o vector deverá igualmente incluir DNA que codifica um gene selectivo. O gene de selecção pode ser fornecido por um plasmídeo desligado em contranformação.

Os vectores compreendem plasmídeos, viroses (incluindo fago) e fragmentos de DNA integráveis, isto é fragmentos que são integráveis, por recombinação, no genoma hospedeiro.

As regiões DNA estão operacionalmente ligadas quando estão funcionalmente relacionadas umas com as outras. Por exemplo, O DNA para uma presequência ou para uma liderança de degregação está operacionalmente ligado ao DNA para um polipéptido se estiver recuperado como uma pré-proteína que participe na secreção do polipéptido. Um promotor está operacionalmente ligado a uma sequência que codifica se ela controlar a transcrição da sequência. Um local de ligação de ribossomos está operacionalmente ligado a uma sequência que codifica se estiver posicionado de forma a permitir a translacção. Geralmente, os meios contíguos de união operacional e, no caso de líderes de secreção, contíguos e em fase de leitura.

As células hospedeiras preferidas são as células que derivam de organismos multi-celulares. Em princípio qualquer cultura elevada de células encarióticas é trabalhável, quer seja duma cultura de invertebrados ou vertebrados. Exemplo de linhas de células úteis são as linhas de células de

*Wifama*

- 31 -

ovário de criceto chinês (CHO) e linhas de células CCS-7.

O G-TsF é recuperado de células transformadas de lisina e detritos de células solúveis separados por centrifugação. Alternativa os sobrenadantes da cultura das células transformadas de segregam G-TsF são simplesmente separados das células por centrifugação. Então o G-TsF é geralmente purificado por métodos conhecidos neste campo, como por exemplo usando-se filtração por gel na presença de ácido seguida de HPLC e eluição sobre um gradiente de acetonitrilo.

Como uma outra fase de purificação ou fase de purificação substituta os lisatos celulares ou sobrenadantes são aquecidos durante um certo período e a uma temperatura que seja suficiente para desnaturalizar e para precipitar proteínas contaminantes mas não G-TsF.

Similarmente ao TGF- $\beta$ 1, o G-TsF é uma proteína de calor remarcadamente estável, talvez como resultado da formação prolongada da união dissulfeto. Como sequência o aquecimento devia ser conduzido num meio que contenha baixos conteúdos de reagentes dissulfeto tais como ditiotreitol. O aquecimento pode igualmente ser combinado com uma acidificação já que o G-TsF é estável ao ácido 1 M acético.

O G-TsF maduro não é glicosilado. Deste modo ele é separado de quaisquer glicoproteínas estáveis ao calor e ao ácido contaminantes e residuais, por adsorção das glicoproteínas sobre colunas lectinas tais como sefarose ligada a lentil lectina.

Se se pretender um produto altamente purificado a mistura crua ou parcialmente purificada fica depois sujeita a cromatofocagem.

Podem-se usar métodos similares para purificar o péptido precursor.

#### 4.3.2. - Recuperação em células CHO

Numa forma de realização efectuou-se a recuperação em células CHO segundo duas variantes:

##### 4.3.2.1. - Primeira variante: com p91023(B)-SUP25-1

Clonou-se o comprimento total do SUP25 cDNA dentro do vector p91023 B de segregação de células CHO e COS (G.G. Wong et al., Science 228 [1985] 810-815) e seleccionou-se um clone, possuindo a orientação correcta, por restrição da análise enzimática (vidé Fig. 3a)). O DNA plasmídeo obtido foi então transferido, por electroporação, para dentro da linha de células DUKX-B de CHO deficiente em dihidrofolato-reductase. Todos os clones que incorporaram o DNA p91023(B)-SUP25-1 foram então seleccionados sob condições dum meio  $\alpha(-)$ , em que só as células que produzem reductase dihidrofolatos sobreviverão. Uma vez que o vector p91023(B) fornece um gene para a dihidrofolato-reductase de ratos, podem-se seleccionar clones de células transferidas. Os genes transferidos podem ser ampliados por ulterior selecção utilizando o metotrexato das drogas em concentrações aumentativas começando com 1 nM. Os clones podem ser seleccionados até 10 nM de metotrexato ou mais, podendo-se mostrar que produzem G-TsF maduro bioactivo por imunomanchamento e pelo ensaio de proliferação de timócitos como se descreveu no EXEMPLO.

##### 4.3.2.2. - Segunda variante: com p<sub>XMT3</sub><sup>neo</sup>7/SUP40-1

Em mais outra construção o comprimento total do cDNA SUP40 (vidé Fig. 2c)) foi incluído no vector p<sub>XMT3</sub><sup>neo</sup>7 de segregação de células COS e CHO. Este vector é uma modificação do pXM (Y. Yong et al., Cell 47 [1986] 3-10), que contém os mesmos elementos básicos que o p91023 (B), embora esteja reunido de forma diferente. Deste modo, à semelhança do p91023(B), o pXM confere igualmente às células os elementos necessários para a réplica de DNA ligado em hospedeiros

procarióticos e encarióticos e, adicionalmente, o último promotor maior do forte adenovirus para segregação dos cDNAs clonados num local próximo do promotor e seus elementos ligados. O pXMT3.neo 7 derivou do pXM pela inserção de múltiplos sítios de clonação e o novo gene badericida para conveniente selecção de células transferidas com o antibiótico G418.

A construção contendo o comprimento total do SUP 40-cDNA em pXMT3.neo7 na correcta orientação transcripcional, denominado pXMT3.neo 7/SUP 40-1 (vidé Fig. 3b)) e transferido para dentro de E. Coli HB 101, foi depositada em 27 de Agosto de 1987 com o Número DSM 4226 com o Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM), Grisebachstr, 8, D-3400, Göttingen, República Federal da Alemanha e convertido em 6 de Novembro de 1987 para um depósito sob o Tratado de Budapeste no Reconhecimento Internacional de Depósito de Microorganismos para os "Purposes of Patent Procedure" (1977), com o mesmo número de Acesso.

Este plasmídeo foi transferido para a linha de células CHO DUKX deficiente em dihidrofolato e os clones contendo o plasmídeo DNA foram primeiramente seleccionados por 0,5 mg/ml de G418. Realizaram-se mais selecções para sequências amplificadas de dihidrofolatoreredutase usando-se um meio  $\alpha(-)$  e aumentando as concentrações do metrotexato como atrás se descreveu e como se descreveu no EXEMPLO. Poderia ser demonstrado sem ambiguidade que os clones das células seleccionados com 10 nM de metrotexato produziram G-TsF recombinante maduro humano por SDS-PAGE e pela inuno-manchamento das proteínas segregadas pelas células (Figura 10). Este material era igualmente bioactivo no ensaio de poliferação de timócitos com uma actividade específica estimada ----- (Fig. 11) a qual está próxima do material isolado das células de glioblastoma humanas. As células seleccionadas em 10 nM metotre-

xato, denominadas CHO/SUP40-1/10MTX --- foram depositadas em 11 de Novembro de 1987 sobre o Número de Acesso ECA CC87111101 sob o Tratado de Budapeste com European Collection of Animal Cell Cultures, Porton Down, Salisbúria, Wiltshire SP4 OJG, Reino Unido.

#### 4.3.3. - Segregação em E. Colli

O plasmídeo usado para segregação em E. Coli baseia-se no promotor  $\lambda$ mbda. Procedeu-se à síntese dum oligonucleótido e ligou-se a extremidade 5' da sequência G-TsF com o local NdeI do vector.

O plasmídeo resultante, denominado pP<sub>SI</sub>-SUP25-1 (vidé Figs. 7a) e 7b)), transferido para dentro de E.coli HB 101, foi igualmente depositado em 27 de Agosto de 1987 com o Número de Acesso DSM 4225, com o Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM), e foi convertido em 6 de Novembro de 1987 para um depósito sob a alçada do Tratado de Budapeste, com o mesmo Número de Acesso.

Esta construção foi usada para transfectar a torção E. coli W3110  $\lambda$ mbda Y139 que produz um receptor  $\lambda$ mbda sensível às temperaturas. O produto segregado foi muito caracterizado. Como se pode ver pela Fig. 8, o G-TsF recombinante do E. coli foi purificado até a homogeneidade, dando uma simples faixa no SDS-PAGE. Adicionalmente, a proteína de sequência revelou os correctos aminoácidos no terminal amino do material, demonstrando assim sem ambiguidade que o G-TsF pode ser eficazmente segregado em sistemas procarióticos.

A Fig. 9 indica, embora a um baixo nível, que se pode obter alguma actividade biológica com o material recombinante de E. coli. A baixa actividade específica sugere que a forma dimérica bioactiva do G-TsF não se pode formar espontaneamente a partir do G-TsF monomérico desnaturalizado.

Para segregação no E. coli tem que se inserir um

Wifama

- 35 -

resíduo de metionina à frente do cDNA G-TsF maduro. O Met-G-TsF faz igualmente parte da presente invenção. A inserção do resíduo de metionina pode ser efectuada de maneira já conhecida.

#### 4.3.4. - Segregação noutros sistemas

É evidente possível uma segregação noutros sistemas usando-se técnicas convencionais, que pode resultar numa eficácia aperfeiçoada, como por exemplo começando pelos clones referidos anteriormente e utilizando técnicas de amplificação de genes por via duma selecção com concentrações aumentativas de metótrexato.

Dever-se-á notar que a proteína pode-se apresentar em forma insolúvel que deve ser solubilizada, ou nalgumas outras formas que podem exigir retransposição por meio de métodos convencionais (vidé por exemplo T.E. Creighton, Progr. Biophys. Molec. Biol. 33 [1978] 231-297).

O G-TsF é segregado como uma proteína latente, possivelmente associada com porções da sua parte precursora, e com uma proteína de ligação, podendo assim exigir algum processamento mais, tal como interrupção dum complexo não covalente, para possuir actividade biológica completa. Este processamento pode, por exemplo, consistir de uma acidificação prévia sobrenadante de células produtoras, mediante, por exemplo, diálise contra o ácido acético ou bicarbonato de amónio. Alternativamente, são igualmente considerados como agentes activadores os agentes alcali ou caotrópicos. O processamento preferido é a acidificação com, por exemplo, ácido acético.

4.3.5. - Embora este aspecto ainda não esteja completamente entendido, o péptido precursor parece ser da maior importância na segregação com êxito dum produto biologicamente activo. Poderia ser útil ou até mesmo essencial na transposição

de moléculas, na formação de pontes dissulfeto ou clivagem proteolítica. Após a libertação proteolítica de G-TsF maduro a parte precursora do péptido pode ainda desempenhar um papel importante em, por exemplo, potenciar a função biológica do G-TsF, talvez em relação à união celular, ou a parte precursora do péptido pode formar, após a clivagem proteolítica, o complexo não covalente atrás aludido (vide 4.3.4) com o dímero de duas subunidades de G-TsF maduro, talvez juntamente com outro componente, tal como a protease envolvida na clivagem do precursor. De acordo com uma linha de pensamento, o crescimento de células epiteliais não regular pode ser o resultado dum falhanço para activar a forma latente de G-TsF autócrino.

Qualquer que sejam as incertezas mencionadas, uma vez que a activação *in vivo* é um passo regulador crucial na especificidade pretendida da acção do G-TsF, e sendo o precursor claramente da maior importância neste processo de activação, a importância da presente invenção pode residir ainda mais na estipulação das sequências para a parte precursora do péptido do que das sequências para o G-TsF maduro.

Poder-se-ia igualmente realizar a síntese da proteína precursora completa enquanto tal em *E. Coli*, ser transposta e dimerizada, recuperando-se mais tarde o péptido maduro por clivagem proteolíticas. Poder-se-ão obter igualmente bem, formas de precursor não-clivadas naturais ou modificadas, a partir de células como por exemplo células CHO transfectadas com cDNAs correspondentes a serem clivadas após a purificação do precursor. Podem-se segregar formas híbridas do precursor adicionando-se pré-peças não relacionadas, por exemplo aquelas do interlencina-2 ou GM-CSF, a certas posições internas do precursor. Estas proteínas híbridas podem ser mais eficazmente segregadas e podem ou não ser correctamente clivadas nas células. Podem-se também isolar das linhas

de células formas não clivadas que seriam depois clivadas in vitro. O local da clivagem protease poderia ser mutagenizado para produzir sequências reconhecidas por diferentes proteases. Uma vez mais, os precursores não clivados contendo estes locais de clivagem modificados poderão ser isolados e clivados pelos respectivos enzimas.

O Exemplo que se segue ilustra a presente invenção não pretendendo ser limitativo.

## 5. EXEMPLO

5.1.1.- As células de glioblastoma SN 308 (A. Fontana et al., J. Immunol. 132 [1984] 1837-1844) são cultivadas em frascos de cultura de tecidos ou em tabuleiros (Nunc). O meio utilizado é o Dulbecco's Modified Eagle's Medium contendo 10% de sêro fetal de bezerro e 300 microgr./ml de L-glutamina. Após se obter a confluência lavam-se as células com a solução Hank, tratam-se com Trypsin/versen (Gibco) e semeiam-se a uma densidade de  $8 \times 10^6$  de células/175 cm<sup>2</sup> frasco ou  $4 \times 10^8$  células/tabuleiro. Após se ter alcançado a confluência as células são incubadas durante 3 dias num meio isento de sêro com 1 microgr./ml de indometacina. Colhem-se então os sobrenadantes e usam-se para purificar o G-TsF, como se descreveu em 5.1.2. Alternativamente, as células são colhidas um dia após a confluência e são usadas para isolar o mRNA, como se descreveu em 5.2.1.

5.1.2 - Concentra-se 1 litro de sobrenadante isento de sêro (no seu conjunto são  $1,1 \times 10^5$  unidades no ensaio de timócitos) para 139 ml no sistema de cassettes Pelli-con<sup>TM</sup> e uma membrana PTGC<sup>TM</sup> (Millipore), sendo diafiltrado contra o volume de 10 ml de Tris.HCl, pH 7,5.

5.1.3.- Faz-se então a cromatografia da amostra numa coluna

de hidróxilapatite:

dimensões: 1,6 x 24 cm; 49 ml

tampão A: 10 mM tris. HCl, pH 7,5 + 10 microm CaCl<sub>2</sub>

tampão B: 0,5 M de fosfato de sódio, pH 7,5

velocidade de fluxo: 2 ml/min.

A actividade biológica elui a 100-250 mM de fosfato (tampão B).

5.1.4.- Isto é seguido por uma cromatografia de fase inversa sobre Pro-RPC<sup>TM</sup> (Pharmacia) com ácido trifluoracético/acetonitrilo como eluente:

dimensões: HR 5/10; 2 ml

tampão A: 0,1% de ácido trifluoracético em água

tampão B: 0,1% de ácido trifluoracético em acetonitrilo

Adiciona-se 0,1% de ácido trifluoracético ao conjunto com a actividade biológica (29 ml), centrifuga-se a solução e adiciona-se o sobrenadante (11,4 mg) à coluna. A actividade biológica elui a 1-25% do tampão B (sob condições de excesso de proteínas).

5.1.5.- Recromatografia sobre Pro-RPC<sup>TM</sup>: dilui-se o conjunto de actividade biológica em 1:5 com o tampão A e adiciona-se à coluna. A actividade biológica elui a 30-32% do eluente B.

5.1.6.- Cromatografia de permuta de catiões sobre Mono-S<sup>TM</sup> (Pharmacia):

dimensões: HR 10/10; 8 ml

tampão A: 25 mM de formiato de amónio, 50% de 2-propanol, pH 4,0

tampão B: 500 mM NaCl no tampão A

Dilui-se o conjunto com a actividade biológica a 1:10 com o tampão A. A actividade elui a 68-69% do tampão B.

*Virgílio*

- 39 -

- 5.1.7.- Cromatografia de fase inversa sobre Pro-RPG<sup>TM</sup> com ácido trifluoracético/2-propanol:  
dimensões: HR 5/2; 0,4 ml  
tampão A: 0,1% de ácido trifluoracético/água  
tampão B: 0,1% de ácido trifluoracético/2-propanol

Dilui-se o conjunto com a actividade biológica 1:5 com o tampão A e adiciona-se à coluna. A eluição da actividade biológica tem lugar a 24-26% do tampão B. Inicia-se a cromatografia por ----- adição da amostra no tampão A, seguida de eluição gradual com o aumento de concentrações do tampão B.

O resultado encontra-se na Fig. 4. A fracção de pico desta soluna da cromatografia possui as seguintes características:

- A proliferação dos timócitos estimulados é inibida a metade do seu máximo a uma diluição de 1:5.000 numa amostra de 200 microl. Isto equivale a uma actividade de cerca de 25.000 unidades/ml.

O método seguido no teste é o seguinte: adicionam-se amostras de 50 microl de sobrenadante com várias diluições a  $6 \times 10^5$  timócitos de ratos C3H/HeJ ----- em suspensão em 150 microl dum meio RPMI com um suplemento de 300 microgr/ml de L-glutamina,  $1 \times 10^{-5}$ M 2-mercaptoetanol e 5% de sêro fetal de borrego. As células são incubadas em chapas microtituladas de fundo plano durante 72 horas e na presença de Concanavalin-A (0,5 microgr/depressa). Dezasseis horas antes da colheita adicionam-se 0,5 microci de [<sup>3</sup>H]-timidina (5,0 Ci/mole) por depressa. Os resultados são expressos como a percentagem de supressão comparada com a resposta concanavalin-A dos timócitos tratados com um controle do meio. Para fins de padronização a percentagem de supressão pode ser parcelada para se obter uma curva-padrão a partir da qual se po

*Wifama*

- 40 -

de fazer a conversão para unidades da actividade do G-TsF. Uma unidade de G-TsF é definida como a quantidade de G-TsF contida num ml do meio do ensaio final o qual causa uma inibição de metade, no seu máximo, no ensaio.

A proliferação de células auxiliares T específicas dos antígenos dependente da interleucina-2 é igualmente inibida em valor superior a 90% em concentrações de G-TsF de  $10^{-10}$  M (vidé Fig. 5, parte B).

O método seguido no teste é o seguinte: Cultivam-se  $2 \times 10^4$  células auxiliares T OVA-7T em chapas microtitulares na presença de várias concentrações de IL-2 (Amersham ARN 1010, matéria 10) e de fracções a testar. O meio utilizado é Iscove's Complete Medium (Bahringerwerke Cat. Nº.7852),  $5 \times 10^5$  de M 2-mercapto etanol e 300 microgr/ml de 2-glutamina. Mede-se a incorporação de  $^3\text{H}$ -Tdr (1 micro Ci/depressa) passadas 16 horas. Os resultados são medidos como valores cpm de  $^3\text{H}$ -Tdr.-absorção e expressos como a percentagem de inibição.

A liofilização na presença do veículo seguida por SDS-PAGE (gradiente gel 5-15%) e coloração de prata dá uma faixa visível de 12,5 Kd de peso molecular (extrapolado a partir de padrões com 93, 67, 45, 31, 21 e 14 Kd), (vidé Fig. 4). Estima-se que a concentração de proteínas seja de 0,5 microgr/ml com base nas quantidades-padrão utilizadas, correspondente a uma actividade biológica específica da proteína de  $5 \times 10^7$  unidades/mg no ensaio de proliferação de timócitos e uma inibição metade do máximo do ensaio a uma concentração de  $10^{-11}$  M (vidé Fig. 5, parte A).

Estes dados relativos à actividade específica da proteína purificada, conjuntamente com a demonstração de uma só marca em SDS-PAGE, demonstram sem ambiguidade que o G-TsF biologicamente activo foi purificado até atingir a homogeneidade.

## 5.2. - Clonação e Sequenciamento do cDNA

### 5.2.1. - Isolamento do mRNA

As células de 50 chapas --- cultivadas como se descreveu em 5.1.1., são daí retiradas, centrifugadas, e faz-se suspender a pelete em 40 ml de uma solução que realiza a lise (6M de ureia, 3M de LiCl, 50 mM de acetato de sódio com 5,0 de pH, 200 microgr/ml de heparina e 0,2% de sulfato dodecil de sódio) e homogenizam-se por três vezes durante 30 segundos num sorvall Omnimix, após o que se armazena durante a noite à temperatura de 4°C. Após a sua centrifugação a 10.000 rpm e à temperatura de 4°C -----, o precipitado é lavado uma vez com 8 M de ureia -----, 4 M de LiCl, sendo então dissolvido em 50 ml de tampão acetato (200 mM de acetato de sódio com 5,0 de pH, 0,2% de sulfato dodecil de sódio e 1 mM de EDTA) e é extraído com fenol saturado com água. Após a centrifugação separa-se a fase aquosa e extrai-se novamente com uma mistura 1:1 de fenol e clorofórmio. O RNA é precipitado com 2 volumes de etanol durante toda a noite à temperatura de -20°C. Após a centrifugação durante 10 minutos a 10.000 rpm, dissolve-se o precipitado em 10 ml TES. A solução é trazida para 0,5 M de NaCl e percorre uma coluna com 500 mg de oligo(dT)-celulose (FL, tipo 7). Após uma lavagem intensiva com 0,5 M NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, elui-se a união mRNA contendo poli (A) com água estéril. Adicionam-se 0,3 M de acetato de sódio de pH 7,0 e 2,5 volumes de etanol, precipita-se o mRNA durante toda a noite à temperatura de -20°C e centrifuga-se a solução a 10.000 rpm. Dissolve-se o precipitado em água o qual é trazido para uma concentração de cerca de 1 microgr/microl. Recuperam-se aproximadamente 40-60 microgr de mRNA a partir de 50 chapas com 14 cm.

### 5.2.2. - Síntese do cDNA

A primeira torsão cDNA é sintetizada a partir de 20 microgr. de mRNA em 200 microl duma solução contendo 50 mM de Tris.HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ditioneitol, 30 microgr/ml oligo (dT), 0,1 microgr/ml actinomicina D, 1 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 1 unidade/microl RNase inibidor RNasin<sup>R</sup> (Promega) e 1,5 unidade/microl de transcriptase de fase inversa do vírus micloblastose avian (Life Sciences). Efectua-se a incubação durante 4 horas à temperatura de 42°C. A reacção é parada com 1/10 volumes de 0,5 M EDTA e percorre uma pipeta Pasteur cheia com Sephadex G 150 a fim de remover os trifosfatos não incorporados, actinomicina D e sais. Adiciona-se 0,3 M de acetato de sódio com 7,0 de pH ao híbrido cDNA/mRNA eluído e precipita-se a mistura com 2,5 volumes de etanol à temperatura de -20°C. Recupera-se o precipitado por centrifugação, o qual é lavado uma vez com 80% de etanol e dissolvido em microl TEN.

Faz-se a síntese da segunda torsão pelo método de U. Gubler e B.J. Hoffman, Gene 25 (1983) 263-269 com as seguintes modificações numa mistura reaccional de 400 µl consistindo de 20 mM de Tris.HCl de 8,0 de pH, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, 0,05 mM cada de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 0,1 M de ditioneitol, 20 microCi  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P] dCTP, (Amersham, 3.000 Ci/mole), 20 microl RNase H (Bethesda Research Laboratories, 3 unidades/microl), 10 microl de polimerase I DNA (New England Biolabs, 10 unidades/microl) e o cDNA/mRNA híbrido atrás obtido. A incubação dura 90 minutos à temperatura de 12°C e 3 horas à temperatura de 22°C. A reacção é parada com 1/20 volumes de 0,5 M de EDTA e os componentes de baixo peso molecular são separados sobre uma coluna Sephadex G150. O cDNA de torsão dupla é então precipitado com etanol e dissolvido em 20 microl TEN.

O cDNA é então metilado nos locais EcoRI mediante tratamento durante uma hora à temperatura de 37°C em 50 mi-

crol de 50 mM Tris.HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 80 microm de adenosil metionina (Sigma) e 5 microl de metilase EcoRI (New England Biolabs, 20 unidades/microl).

Além disso, qualquer formação aberta com o diâmetro de um alfinete de cabelo que se forme é cortada com nuclease S1 mediante tratamento, durante 30 minutos à temperatura de 22°C, em 400 microl de 250 mM de NaCl, 30 mM de acetato de sódio com um pH de 4,5, 1 mM de ZnSO<sub>4</sub> e 10 unidades de nuclease S1 (PL).

Após extracção com 1:1 de fenol/clorofórmio o cDNA é precipitado com etanol, dissolvido em 100 microl TEH e são descarregados pequenos fragmentos de DNA mediante a sua passagem numa coluna G150. Após a precipitação com etanol o cDNA é dissolvido num pequeno volume (10-20 microl) de TEH.

As extremidades do cDNA são então preparadas para uma ligação de união mediante incubação com polimerase T4 de DNA durante 30 minutos à temperatura de 37°C em 40 microl de 33 mM de Tris-acetato com pH de 7,9, 66 mM de acetato de potássio, 10 mM de acetato de magnésio, 2,5 mM de ditionitroto, 0,1 mM cada um de dATP, dCTP, dGTP e dTTP e 4 microl de polimerase I de DNA T4 (New England Biolabs, 10 unidades/microl). O enzima é inactivado mediante tratamento durante 10 minutos à temperatura de 70°C.

Os elos EcoRI sintéticos (New England Biolabs) recebem então uma cinase nas suas extremidades 5', como se segue: 20 microgr. de DNA de ligação são incubados durante 40 minutos à temperatura de 37°C em 200 microl de 70 mM de Tris.HCl pH 7,5, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de ditionitroto, 2 mM de ATP e 10 microl de cinase polinucleótida.

Os elos fosforilados em 5' são então ligados ao cDNA: a mistura reaccional do cDNA inactivada por acção do calor é trazida para 100 microl e para as seguintes concen-

trações: 35 mM Tris.HCl pH 7,5, 7 mM HgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP e 5 mM de ditiotritol. Adiciona-se 1,6 microgr. de elos EcoRI que receberam cinase e efectua-se a ligação durante a noite à temperatura de 15°C com 10 microl de ligase DNA T4 (New England Biolabs). A ligase é então inactivada à temperatura de 70°C durante 10 minutos e os elos EcoRI são completamente clivados mediante tratamento durante 4 horas à temperatura de 37°C com um grande quantidade em excesso de EcoRI (New England Biolabs), 1.000 unidades. Extraem-se os enzimas com 1 volume de fenol e de cDNA precipitado com etanol. Os fragmentos dos elos monoméricos podem ser separados do cDNA sobre uma coluna Sepharose 4B. cDNA com mais de 300 bp elui no volume de exclusão, é precipitado com etanol e dissolvido numa placa de gel agarose Sea de 1% em tampão de electroforese (40 mM Tris. acetato pH 7,8, 1 mM EDTA) 50 V, revestido com brometo de etídio, e os fragmentos de DNA maiores que 1600 bp foram cortados e extraídos do gel. Fragmentos HinfI de pBR 322 são usados como marcadores de tamanho (J.G. Sutcliffe, Nucl. Acids Res. 5 [1978] 2721-2728). Adiciona-se um volume igual de TE e 3 M de acetato de sódio com 7,0 de pH, funde-se a agarose durante 5 minutos à temperatura de 70°C e arrefece-se durante 5 minutos à temperatura de 37°C. Extrai-se a agarose por duas vezes com um volume igual de fenol e do cDNA recuperado da fase aquosa por precipitação com etanol.

### 5.2.3. - Clonação para lambda gt10

O cDNA fraccionado nas suas dimensões é clonado em fago lambda gt 10 (T.V. Huynh et al., DNA Cloning, Glover Ed., IRL Press, vol. 1 [1985] 49-78. Braços de lambda gt 10 defosforilados com fosfatase podem ser obtidos pelos sistemas de Clonação Stratagémica. Um microgr. de braços de lambda gt 10 são ligados, num volume total de 8 microl, como se descreveu em 5.2.2., com o cDNA total obtido de 20 microgr. de mRNA,

usando-se 1,6 microl de ligase DNA T4. Os fagos são então encubados com um extracto de embalagem (Gigapack, Sistemas de Clonação Stratagénicos) seguindo-se as instruções do fabricante, e as células E. coli C600 hfl (Stragénicas) são injectadas. A embalagem dos fagos tem lugar com 20 microlitos de produto de congelação é 30 microl de extracto sónico durante 2 horas à temperatura de 22°C. Diluem-se então os fagos com 1 ml de tampão de diluição (5,8 gr de NaCl, 2 gr. MgSO<sub>4</sub>. 7 H<sub>2</sub>O, 50 mM de Tris. HCl pH 7,5) é estabilizam-se com 40 microl de clorofórmio. Uma cultura fresca de C600 hfl é então centrifugada e suspensa numa metade de volume de 10 mM MgSO<sub>4</sub>. 1 ml desta suspensão de bactérias é injectada com um terço da suspensão dos fagos durante 20 minutos à temperatura de 37°C e as células E.coli são placadas em 30 ml Top-Agar em meio BBL<sup>TM</sup> ----- (0,8% Bactoagar Difco, 10 gr tripticase, ---- 5 gr NaCl pH 7,2) sobre 1,5% agar num disco biológico (Nunc) de 245 x 245 mm, e incubadas durante 5-6 horas à temperatura de 37°C. Retira-se o Top-Agar com as placas sendo agitado durante a noite num tampão fago de 20 ml à temperatura de 4°C. O agar é centrifugado a 6.000 rpm e a suspensão eluída de fago é estabilizada com 800 microl de clorofórmio. Desta maneira obtêm-se 500.000 fagos recombinantes de 3 placas, contendo insertos cDNA com mais de 1600 pb em comprimento.

#### 5.2.4. - Síntese de amostras oligonucleótidas radioactivas

5.2.4.1.- Os oligonucleóticos para a Amostra A e Amostra B como se mostra na Fig. 1 são preparados usando-se um sintetizador de DNA de Biosistemas Aplicado de acordo com as instruções do fabricante (para a Amostra A o aminoácido assumido na posição 22, Ala, descobriu-se mais tarde estar errado mas tal não trouxe consequências para a experiência).

5.2.4.2. - Os oligonucleótidos são então radioativamente rotulados como se segue:

a) Amostra A: Aquecem-se 100 microgr. de cada um dos dois oligonucleótidos da Amostra A à temperatura de 70°C durante 10 minutos em 18 microl de água, adicionando-se então 2 microl duma solução de 1 M NaCl, 10 mM Tris.HCl pH 7,5 e hibridizam-se as amostras durante uma hora à temperatura de 37°C e durante 2 horas à temperatura ambiente. A mistura é então trazida para 50 microl e estabelecem-se as seguintes concentrações: 50 mM Tris.HCl pH 8,0, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ditio treitol, 0,05 mM cada de dATP, dGTP e dTTP e 100 microCi de  $\alpha$ [<sup>32</sup>P] dCTP (Amersham, 3000 Ci/mMole). Após se adicionar 2 microl de polimerase DNA de fragmento Klenow, a mistura é incubada durante 45 minutos sob temperatura ambiente e separam-se os nucleótidos não incorporados do fragmento de DNA de dupla torção que sofreu a síntese, sobre uma coluna Sephadex G25. Obtiveram-se entre  $1 \times 10^8$  e  $2 \times 10^8$  cpm/100 nanog. de Amostra A.

b) Amostra B: Ela é radioativamente rotulada com 100 microCi  $\alpha$ [<sup>32</sup>P] ATP (Amersham, 300 Ci/mMole) e 2 microl de cinase polinucleótida, (Boehringer, 11 unidades/microl) numa mistura de cinase de 20 microl, sob condições iguais às descritas em 5.2.2.. Obtiveram-se entre  $0,5 \times 10^7$  e  $1 \times 10^7$  unidades/100 nanog.

#### 5.2.5. - Separação e selecção dos clones de G-TsF

Revestem-se cerca de 100.000 fagos recombinantes (vidé 5.2.3.) após infecção do E.coli C600 em 0,7% de Top. Agarose, num meio BBL<sup>TM</sup> sobre discos Petri com 10 x 14 cm com 1,5% agar. Após incubação durante 6 até 9 horas à temperatura de 37°C as placas resultantes são copiadas em filtros Nylon (Pall) seguindo-se as instruções do fabricante. Prepararam-se duas cópias. O DNA dos filtros é primeiramente desna-

turalizado com 0,5 N de NaOH, 1,5 M de uma solução de NaCl durante 5 minutos sendo depois neutralizado com 3 M de acetato Na de 5,5 de pH durante 5 minutos. Finalmente, os filtros são secos ao ar, mergulhados em clorofórmio durante 30 segundos, secos ao ar e misturados durante 1 hora à temperatura de 80°C.

Lavam-se então os filtros durante 2 horas à temperatura de 65°C numa solução de NET com 1% de SDS e pré-hibridizam-se durante 4 horas à temperatura de 42°C numa solução de NET com 0,2% de SDS, 0,1% de Ficoll, 0,1% de polivinilpirrolidone, 0,1% de albumina de sêro de borrego e 100 microgr/ml de esperma de salmão denaturalizado DNA.

A hibridização é efectuada numa solução de NET com 0,2% de SDS, 0,1% de Ficoll, 0,1% de polivinilpirrolidone, 0,1% de albumina do sêro de borrego, 100 microgr/ml de tRNA levedura e 0,05% de pirofosfato de sódio, durante toda a noite à temperatura de 42°C.

A primeira cópia é hibridizada com  $2 \times 10^6$  cpm/ml da Amostra A, a segunda cópia com  $0,5 \times 10^6$  cpm/ml da Amostra B. Após a hibridização ter sido efectuada as placas são lavadas por duas vezes durante 30 minutos com um grande volume de NET com 0,2% de SDS sob temperatura ambiente. Aumenta-se então a temperatura progressivamente para 42°C, 52°C e 57°C, realizando-se a lavagem com a mesma solução duas vezes durante 15 minutos. Após cada fase de lavagem os filtros são expostos durante 16 até 18 horas sob um filme de Raio X Kodak XAR-5 com telas de intensificação.

Podia-se identificar nos filtros, após terem sido lavados à temperatura de 52°C, a hibridização dos clones com ambas as amostras. Uma área correspondente a estes clones é colhida da placa e os fagos são eluídos num tampão. Uma vez que a área escolhida continua a conter um número de fagos re-

combinantes diferentes, os fagos eluídos são usados para um renovamento da infecção de E.coli C600 nos fagos revestidos a baixa densidade. São de novo feitas cópias em filtros de nylon como atrás se descreveu, hibridizando-se os filtros com as amostras correspondentes. Uma única placa pode agora ser escolhida da chapa. É eluída em 1 ml de tampão fago e a resultante suspensão de fagos é mantida à temperatura de 4°C.

Após se subclonar o inserto de cDNA deste clone (denominado lambda SUP25) em pBs.M13 (vidé abaixo) obteve-se uma amostra RNA classificada mediante a transcrição do subclone pSUP25 com polimerase T3 RNA.

Isto é realizado num ensaio de 10 microl contendo 40 mM Tris.HCl pH 8,0, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM espermidina 50 mM NaCl, 75 mM ditiotreitol, 1 mM cada de dATP, dGTP, e dUTP, 25 unidades de RNasin<sup>TM</sup>, 50 microCi  $\alpha^{32}$ P-dGTP (400-800 Ci//mmole), 1 microgr. de plasmideo de DNA linearizado e 10 unidades de polimerase T3 RNA. O tempo de incubação é de 30 minutos à temperatura de 37°C.

Usou-se aproximadamente  $1 \times 10^6$  cpm de amostra por ml da solução de hibridização para seleccionar outras cópias preparadas após o revestimento adicional da library cDNA como atrás se descreveu. Isolaram-se mais dois clones a partir desta selecção (lambda SUP40 e lambda SUP42, vidé Fig. 2c)).

#### 5.2.6. - Confirmação da identidade do clone de G-TsF

##### 5.2.6.1. - Reclonação no vector de sequenciamento pBs.M13

Para se confirmar de que os fragmentos de cDNA, obtidos sob 5.2.1., contêm cDNA que codifica para o G-TsF de comprimento total, ele deverá ser sequenciado. Isola-se primeiramente uma pequena quantidade de DNA fago. Usam-se 50 microl da suspensão de fago obtida em 5.2.5., para infectar uma suspensão de 100 microl de células E.coli C600 em 10 mM

*W. F. A. A.*

- 49 -

de  $\text{MgSO}_4$ , durante 15 minutos à temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Adiciona-se a mistura resultante a 20 ml de BBL<sup>TM</sup> contendo 0,2% de maltose e agitam-se 10 ml de  $\text{MgSO}_4$  durante um período entre 4 a 7 horas à temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Adicionam-se 2 ml de clorofórmio durante 30 minutos à cultura parcialmente lisada, sendo então centrifugada durante 10 minutos a 5.000 rpm, incubando-se o sobrenadante durante 60 minutos à temperatura de  $37^\circ\text{C}$  com 30 microl de DNase I (1 mg/ml e 40 microl de RNase (5 mg/ml). Precipitam-se os fagos durante a noite à temperatura de  $4^\circ\text{C}$  por adição dum volume equivalente de 20% de polietileno glicol 6000, 2 M NaCl, 2 gr/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 50 mM Tris. HCl pH 7,5. A pelete obtida, após centrifugação durante 20 minutos a 5.000 rpm é recebida num tampão de fago de 500 microl e extraída por uma vez com 500 microl de clorofórmio. O DNA fago na fase aquosa é então tratado com 3,8 microl de 20% SDS e 7,5 microl de 0,5 M de EDTA à temperatura de  $68^\circ\text{C}$  durante 15 minutos, extraíndo-se as proteínas da solução com fenol, e o DNA é precipitado com etanol.

Dissolve-se então o DNA num pequeno volume de TE. Metade do DNA fago resultante é clivado com EcoRI numa mistura reaccional de 10 microl e o fragmento de cDNA inserido é separado dos braços lambda sobre uma Placa de gel de agarose-Sea, como se descreveu em 5.2.2.. A faixa é cortada e o DNA é recuperado da agarose, como se descreveu em 5.2.2. mediante uma extracção com fenol e precipitação de etanol. Cerca de 50 ng do fragmento de cDNA são ligadas com 50 ng do vector pBS.M13 (Sistema de clonação estratagénico) numa mistura de ligação de 10 microl como se descreveu em 5.2.2.. Para tal tem primeiro que se clivar o vector pBS.M13 com EcoRI e defosforilá-lo nas extremidades 5' com fosfatase alcalina de intestino de borrego (Boehringer) de acordo com as instruções do fabricante. Entre 1 e 2 microl da mistura de ligação são então transfectadas numa suspensão de 100 microl de E.coli

JM 109 competente.

As células JM 109 competentes podem ser obtidas por método-padrão tais como os descritos por T. Maniatis et al., em Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova York (1982). Derretem-se sobre gelo 100 microl da suspensão das células, adicionando-se 2 microl de mistura de ligação. A incubação tem lugar durante 20 minutos sobre gelo, incubando-se então as células durante 45 segundos à temperatura de 37°C agitando-se durante 1 hora à temperatura de 37°C, em 1 ml de meio SOC (2% Bacto-triptone, 0,5% de extracto de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub>, 20 mM de glucose). As bactérias são granuladas por ---- centrifugação, suspensas em 100 microl de meio SOB (meio SOC sem glicose) e espalhadas sobre um prato agar de 1,5% em meio SOB com 50 microgr./ml de ampicilina. Após o prato ter sido pré-tratado com 100 microl duma solução contendo 4 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosida e 50 mg de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosida por ml de dimetilformamida, então a galactosidase- $\beta$  contida no vector causa uma cor azul nas colónias de E. coli. As colónias com inserções são incolores. Estas colónias são semeadas em culturas de 6 ml e crescem durante a noite. O meio de crescimento pode ser um meio SOC com 50 microgr./ml de ampicilina. Isola-se o DNA plasmídeo mediante o "método fervente" descrito por Maniatis (1982, supra).

#### 5.2.6.2. - Sequenciamento dos fragmentos cDNA

Um terço do DNA plasmídeo obtido a partir de 6 ml do meio de cultura é desnaturalizado por tratamento, durante 5 minutos, com 1/10 volumes de 2 N NaOH, 2 mM de EDTA; adiciona-se 1/5 volume de 5 M de acetato de amónio e o DNA é precipitado com 2 volumes de tanol. O precipitado é dissolvido em 8 microl de água, adiciona-se 1,5 microl do tampão

da reacção (0,5 M de NaCl, 0,1 M de Tris.HCl pH 7,5, 0,1 M de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de EDTA e hibridizam-se com o cDNA os primeiros oligonucleótidos apropriados. Após a adição das várias misturas de deóxi-nucleótidos e trifosfatos dideoxinucleótidos, o DNA é sequenciado segundo o método de F. Sanger et al., PNAS 74 (1977) 5463-5477, usando-se a polimerase I de DNA Klenow.

A estratégia do sequenciamento que confirma a identidade do cDNA SUP25, está ilustrada na Fig. 2b). Pode-se utilizar a Amostra B como um primeiro iniciador (vidé 5.2.4.2). É possível ler uma região de cerca de 200 nucleótidos por seu intermédio. Tal fornece uma suficiente informação da sequência para sintetizar mais dois outros iniciadores de sequenciamento:

Iniciador 1: 5'-CCG TAT TTA TGC ACT TCA G-3'

Iniciador 2: 5'-GGA GAA GCA GAT GGT TGT GCA T-3'

Com estes dois iniciadores é possível ler a região completa cobrindo os 112 aminoácidos da proteína madura (vidé Fig. 2a)). A posição correcta do péptido maduro dentro da proteína precursora é deduzida a partir da sequência de péptidos de terminal amino determinada, e pode igualmente ser inferida por comparação com a sequência publicada para TGF- $\beta$ 1 (R. Derinck et al., Nature 316 [1985] 701-704).

A sequência completa do cDNA entre as posições 1 e 1695 derivou após a subclonação e sequenciamento de uma série de fragmentos de cDNA transpostos obtidos pela divisão do cDNA SUP25 com vários enzimas de restrição ou por se tratarem subclones com nuclease mung-bean e exonuclease III, de acordo com o método de S. Henikoff, Gene 28 (1984) 351-359).

Adicionalmente sequenciaram-se os cDNAs SUP40 e SUP42 para 300 nucleótidos de ambas as extremidades e em re-

giões que codificam para o péptido maduro usando os iniciadores internos de sequenciamento atrás descritos. Descobriu-se que as regiões sequenciadas eram idênticas ao cDNA SUP25 (vidé figs. 2c) e 2d)).

A sequência completa para a proteína madura possui 71% de semelhança com o TGF- $\beta$ 1, e a sequência de proteínas está, como para o TGF $\beta$ 1 na extremidade de terminal carboxi de uma proteína precursora (vidé Fig. 2b)).

Tal segue da presença de um codon de terminação na extremidade 3' e de um resíduo de arginina como fazendo parte de um local potencial para o corte da protease situado em frente do primeiro aminoácido na proteína madura.

### 5.3. - Recuperação de G-TsF recombinante

#### 5.3.1. - Recuperação em células CHO

##### 5.3.1.1. - Construção de vectores de recuperação

Os cDNAs lambda SUP25 e lambda SUP40 (vidé fig. 2c)) são reclonados nos vectores de recuperação das células COS e CHO p91023 B e pXMT3.neo 7.

O vector p91023 B é descrito por G.G. Wong et al., em Science 228 (1985) 810-815.

O vector pXMT3.neo 7 foi dividido do vector pXL, o qual contém os mesmos elementos principais que o p91023 B e encontra-se descrito por Y. Yang et al., em Cell 47 (1986) 3-10.

Resumidamente, ambos estes vectores contém elementos que permitem o crescimento em células E.coli e células eucarióticas. O cDNA inserido pode ainda ser recuperado em células CHO e COS. Elas possuem locais de iniciação para responder em procariotes e eucariotes, o elemento intensificador de SU40, o último e maior promotor de adenovirus seguido

por partes das três sequências principais do último adenovirus transcripto, um intrão de um gene de imunoglobulina, um local de poliadenilação de SV40 e os genes VA do adenovirus que funcionam junto com as sequências principais 5' não translaçadas no controle da translação.

Adicionalmente os vectores contêm um cDNA de redutase dihidrofolata de rato inserido entre o local da clonação, o qual está localizado depois no intrão de imunoglobulina, e a sequência de poliadenilação de SV40 (vidé Fig. 3a)). Deste modo, estes vectores podem também ser transfectados para dentro de células CHO e os genes transferidos serem ampliados conjuntamente com o cDNA de redutase dihidrofolata, por selecção de subclones resistentes a concentrações aumentativas de metotrexato (de acordo com J. Haynés et al., Nucl. Acid. Res. 11 (1983) 687-706).

O vector de construção pXMT3.neo 7 deriva do vector pXM para facilitar o procedimento da clonação mediante a inserção de múltiplos locais de clonação. Além do mais, o neo-gene bactericida sob controle do promotor da cinase de timidina do virus Herpes simplex está inserido entre a resposta da origem SV40 e os genes VA. Isto permite uma primeira fase de selecção após a transfecção das células CHO usando-se sulfato G418 (Gibco) de acordo com F. Colbère-Garapin et al., em J. Mol. Biol. 150 [1981] 1-14. Em detalhe, a região PstI-EcoRI do poli-elo de pUC18 (C. Yanich-Perrou et al., Gene 33 [1985] 103) foi inserido no plasmídeo pXM após clivagem com PstI e EcoRI, o qual retirou um fragmento de 36 Sp do pXM. Isto originou o clone pXMT3. Para a inserção do neo-gene, o fragmento de 1882 bp, obtido de uma clivagem parcial PvuII de pAG60 (F. Colbère-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150 [1981] 1-14) contendo o promotor da cinase de timidina acoplado ao neo-gene, foi inserido no vector pXMT3 clivado StuI e um plasmídeo contendo o neo-gene e o maior e

último promotor do adenovirus na mesma orientação transcripcional pXMT3.neo 7 foi seleccionado (vidé Fig. 3b)).

A reclonação é efectuada como se descreveu em 5.2.6.1. para dentro do local EcoRI dos vectores (vidé Figs. 3a) e 3b)).

#### 5.3.1.2. - Transfecção das células CHO e ampliação do cDNA de G-TsF

Realizou-se a transfecção da reductase dihidrofolata - deficiente em linha de células CHO DUKX-B (G. Urlaub e L.H. Chasin, PNAS 77 [1980] 4216-4220) mediante electroporação de acordo com E. Neumann et al., EMBO J. 1, [1982] 841-845. As células cresceram em próxima confluência num meio  $\alpha$ + (Yibco), sendo lavadas uma vez com PBS sem  $\text{Ca}^{++}$  e sem  $\text{Mg}^{++}$  e foram libertadas das placas por incubação em PBS contendo 0,5 mM de EDTA e 0,5 mM de EGTA durante aproximadamente 5 minutos. As células foram centrifugadas e resuspensas em TBS (25 mM Tris.HCl pH 7,5, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$  e 0,6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Após uma centrifugação adicional as células foram suspensas em TBS frio e ajustadas para  $10^7$  células/ml. Realizou-se a electroporação com 100 microl aliquotas desta suspensão usando-se um fornecimento de energia ISCO de modelo 494 e uma unidade de electroporação Haefliger. As células foram incubadas juntamente com 5  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídeo linearizado durante 30 minutos antes da pulsação e por mais 30 minutos após. Verificaram 5 impulsos em intervalos de 5 minutos. As quantidades de energia fornecida foram: 2.000 V, 5W, 3mA; limite de voltagem entre 600 e 1.800 volts como especificado, dando resistência de 3.000 até 9.000 V/cm. Os capacitores foram seleccionados para carregar para 169 microF. Após a electroporação as células foram semeadas em frascos de cultura com 75  $\text{cm}^2$  num meio  $\alpha$ +. Passadas 24 horas adicionou-se G418 a uma concentração de 0,5 mg/ml, sendo seleccionadas clones celulares tendo in-

corporado o DNA plasmídeo contendo o neo-gene. A mistura dos clones celulares em crescimento foi libertada das placas por incubação em PBS contendo 0,5 mM de EDTA e 0,5 mM EGTA e re-semeada num meio  $\alpha(-)$  (Gibco) para seleccionar a presença da reductase dihidrofolata nas células. Outras ampliações dos genes transfectados foi então conseguida por selecção após o reseamento das culturas em concentrações aumentativas de metotrexato, --- começando-se por 1 nM e aumentando até 3 e 10 nM.

#### 5.3.1.3. - Confirmação da produção de G-TsF humano recombinante bioactivo por células CHO.

Os clones das células seleccionados em 1 nM e 10 nM de metotrexato bem como uma cultura de controle transfectada com os vectores sem insertos de cDNA e seleccionados pela mesma via, foram semeados a uma densidade celular de 2 até  $4 \times 10^6$  células/frasco de 75 cm<sup>2</sup> e foram deixadas crescer até uma confluência de 90%. Lavaram-se então as células três vezes com PBS, a fim de se remover o metotrexato, e foram incubadas durante 48 horas com 6 ml de um meio isento de sêro  $\alpha$ , ou um meio  $\alpha$  contendo 10% de sêro fetal de borrego. Após a precipitação das proteínas provenientes dos sobrenadantes da cultura isenta de sêro com ácido tricloroacético, realizou-se o SDS-PAGE e a inuno-manchamento, de acordo com os protocolos-padrão como descreveu H. Towbin et al., em PIAS 76 [1979] 4350-4354. O anti-sêro de coelho utilizado foi obtido mediante a imunização de coelhos com um péptido sintético correspondente à parte aminoterminal do G-TsF. Sintetizou-se o péptido Ala-Leu-Asp-Ala-Ala-Tir-Cis-Phe-Arg-Asn-Val-Gln-  
10

Asp-Asn-Cis-Cis-Leu-Arg-Fro-Leu-  
15 20

-Tir-Ile-Asp-Phe-Lis-Arg-Asp-Leu-Gli num sintetizador do Bio  
25

sistema de Péptidos de acordo com o protocolo do fabricante

e injectou-se em coelhos de acordo com os processos-padrão.

As experiências de inuno-manchamento identificam sem ambiguidade a produção de G-TsF humano recombinante maduro nos clones celulares seleccionados em 10 nM de metotrexato. Não se detectou qualquer material de G-TsF sob estas condições nas células de controle e nas células seleccionadas em 1 nM de metotrexato (vidé Fig. 10).

Os sobrenadantes obtidos num meio de 10% de sêro isento de metotrexato foram testados no ensaio de proliferação de timócitos como se descreveu em 5.1.7.. Sempre que os sobrenadantes das células de controle e das células seleccionadas em 1 nM de metotrexato revelaram uma actividade inibidora muito pequena, o meio obtido dos clones celulares seleccionados em 10 nM metotrexato demonstraram ---- inibição de proliferação de timócitos;

-----Seguidamente à activação ácida do complexo do G-TsF produzida pelos clones celulares, os clones seleccionados com ----- 10 nM de metotrexato causaram uma inibição metade da máxima possível no ensaio, a uma diluição --- para além de 1:5.000 ..... (vidé Fig. 11).

Estas experiências provam definitivamente a produção de G-TsF humano recombinante bioactivo por células CHO transfectadas com o cDNA do G-TsF. A actividade específica calculada a partir da quantidade de G-TsF estimada para estar presente no inuno-mancha (vidé Fig. 10) (aproximadamente 100 ng/ml) é pelo menos tão elevada quanto as  $5 \times 10^7$  unidades/mg calculadas para o material isolado das células de glioblastoma (vidé 5.1.3.).

Além disso, a actividade inibitória do sobrenadante obtido das células CHO transfectadas com pXLT3.neo 7/SUP 40-1 e seleccionadas em 10 nM de metotrexato, foi completamente neutralizada no ensaio de timócitos após a incubação

*Wifan*

de sobrenadante isento de metotrexato diluído em 1:10 com 24 microgr./ml de anticorpos anti-TGF- $\beta$ 1 policlonais (R & D Sistemas), em que normalmente isto resulta em 87% de inibição na ausência de anticorpos. Estes anticorpos demonstraram ser reactivos de cruzamento para o TGF- $\beta$ 1 e G-TsF; eles neutralizam o G-TsF natural das células de glioblastoma.

### 5.3.2. - Recuperação em células E.coli

Uma parte do cDNA lambda SUP25, contendo a região que codifica para o péptido de G-TsF maduro e sequências não translacionadas em 3' até ao local Hinde III (vidé Fig. 2c)), é clonado em  $P_L$ Sl. Este vector permite a recuperação do cDNA sob o controle do promotor lambda. Para a construção faz-se primeiramente a síntese dum oligonucleótido o qual faz a ligação do local HaeIII na posição 1099-1102 do cDNA do G-TsF com o local NdeI no vector, de tal forma que cria um códore de iniciação da translação ATG. Isto é directamente seguido pela sequência que codifica para o G-TsF maduro de 112 aminoácidos no comprimento (Figs. 7a) e 7b)). Esta construção ( $P_L$ Sl-SUP25-1) é transfectada numa torsão E.coli W3110 lambda Y139, a qual produz um lambda repressor sensível à temperatura. As bactérias crescem então à temperatura de 30°C. Após se ter atingido uma densidade de 0,6 OD<sub>600</sub> o promotor  $P_L$  é induzido mediante o aumento da temperatura para 42°C (o que faz inactivar o repressor lambda). Após de 54 horas de incubação a proteína E.coli total é isolada e confirma-se o G-TsF recombinante após a separação sobre um gel poliacrilamida, usando-se o anticorpo de coelho policlonal para o G-TsF, que se descreveu em 5.3.1.3.. Deste modo pôde-se demonstrar a produção do G-TsF, iniciando-se uma hora antes da inactivação do repressor lambda a 42°C (vidé Fig.8).

Verificou-se uma vez mais a identidade do G-TsF segregado na proteína E.coli fazendo-se crescer 6 l de meio de cultura contendo E.coli com o plasmídeo recombinante até atin

*Wifama*

- 58 -

gir uma densidade de  $OD_{600}=0,6$ , induzindo durante 5 horas à temperatura de  $42^{\circ}\text{C}$  e isolando o G-TsF da maneira que se segue:

1) Segregação: As 8 gr de células obtidas foram incluídas numa suspensão com 28 ml de um tampão (10 mM de tris.HCl com 7,5 de pH; mM de EDTA; 1,5% de SDS e 0,5% de 2-mercapto-etanol), aquecida à temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos após o que foi centrifugada durante 15 minutos a 48.000 g. O sobrenadante foi regeitado e extraiu-se a pelete uma vez mais com o mesmo tampão mas contendo 5% de SDS. Ambos os sobrenadantes foram misturados, reduzindo-se a viscosidade por meio de agitação energética.

2) Cromatografia sobre Biogel: A proteína extraída foi fraccionada sobre uma coluna de Biogel (Biogel P100, 160-200 mecha, K 100/100) e eluída com um tampão (de composição igual à fornecida em 1) (120 ml, velocidade de fluxo de 260 ml/hora). Separaram-se aliquotas das fracções por meio de PAGE e imuno-manchamento. Fundiram-se as fracções 23 e 24, liofilizaram-se, dissolveram-se em 40 ml de água destilada e dializaram-se durante 6 dias de encontro a água destilada. O material dializado (85 ml) foi então trazido para um pH de 2,15 com ácido trifluoracético.

3) F.p.l.c. de fase inversa sobre Pro-RPC (Pharmacia HR 16/10): Centrifugaram-se as fracções dializadas a 48.000 g durante 10 minutos e o sobrenadante claro (9 mg de proteína) foi transferido para a coluna:

Tampão A: 0,1% de ácido trifluoracético em água

Tampão B: 0,1% de ácido trifluoracético em acetonitrilo

Dimensão das fracções: 2 ml; velocidade de fluxo: 2 ml/  
/min. gradiente: 5-60% em 45 minutos.

Verificaram-se as fracções contendo G-TsF (fracções

43 e 44) mediante inuno-manchamento, sendo ainda fundidas, obtendo-se 5 mg de manitol como veículo, e liofilizadas.

4) F.p.l.c. de permuta de catiões sobre Mono S (Pharmacia HR 10/10): dissolveu-se o produto liofilizado em 2 ml do tampão A (25 mM de formiato de amônio com 4,0 de pH; 50% de 2-propanol) e transferiu-se para a coluna:

Tampão B: 500 mM de NaCl no tampão A

Dimensão da fracção: 1 ml, velocidade de fluxo: 1 ml/  
/min. gradiente: 0-100% em 60 minutos.

Determinaram-se as fracções contendo G-IsoF em SDS-PAGE após o revestimento a prata (fig. 9). As fracções 31 e 32 (eluídas com 175 mM de NaCl, aproximadamente 8 microgr. de proteínas) foram liofilizadas com 1 mg de manite.

5) F.p.l.c. de fase inversa sobre Pro-RPC (Pharmacia HR 5/2): O produto liofilizado foi dissolvido em 1 ml do tampão A (0,1% de ácido trifluoracético em água) e transferido para a coluna:

Tampão B: 0,1% de ácido trifluoracético em acetonitrilo

Dimensão da partícula: 1 ml; velocidade de fluxo: 1 ml/  
/min. gradiente: 5-60% do tampão B em 45 minutos.

As fracções foram caracterizadas por SDS-PAGE e pelo revestimento a prata das aliquotas. Usa-se o material da fracção eluindo a 36% do tampão B (aproximadamente 1 microgr de proteínas) para fazer a sequência do terminal amino.

6)- Sequenciamento de terminal amino: 800 microl da fracção 26 da fase 5) foram directamente transferidos para o filtro de vidro dum sequenciador de fase gasosa dos Biosistemas Aplicados (Ensaio 155, 87 05 15). A degradação e a identificação dos aminoácidos foi feita de acordo com as ins

truções do fabricante. O resultado (Ala-Leu-vazio-Ala-Ala-Tir-Vazio-Phe-vazio-Asn) confirma a identidade e a correcta sequência de terminalamino do G-TsF recombinante segregado em E.coli.

7) Testou-se uma aliquota das fracções 31 e 32 da fase 4) no ensaio de proliferação de timócitos (vidé 5.1.7.) e mostrou possuir a actividade inibitória (vidé Fig. 10) embora se tenha observado metade da inibição máxima apenas em concentrações de aproximadamente  $10^{-7}$ M. Isto indica que apenas uma pequena fracção do G-TsF monómero está apta a espontaneamente forma a forma dimérica bioactiva.

A presente invenção torna desta forma viável a preparação de largas quantidades de G-TsF recombinante para ulterior estudo e aplicações terapêuticas.

É evidente que o G-TsF é um péptido multifuncional o qual, para além do seu efeito inuno supressor, controla igualmente a proliferação, diferenciação e outras funções em muitos tipos de células.

O G-TsF é útil nas indicações dadas em "1-Inquadramento Geral" para o TGF- $\beta$ 2, CIF-B e G-TsF, primeiramente como um agente immunosupressivo, de cicatrização de feridas, de formação de tecido ósseo ou anti-inflamatório, como por exemplo em condições de tumores, transplantes, autoimunidade, osteoporose, danificação de tecidos e inflamações.

O factor é biologicamente activo principalmente como o dímero de cerca de 25 Kd.

A actividade immunosupressora pode por exemplo ser determinada in vitro pela inibição da proliferação de timócitos estimulada pela lectina e pela inibição da proliferação de células auxiliares T específicas do antigene de murino dependente da interlencina-2. Pode-se igualmente efectuar o

ensaio in vivo, no modelo aloreactivo e citolítico das células T e no modelo da encefalomielite, como foi descrito por S.L. Hefeneider et al., J. Immunol. 130 (1983) 222-227 e por A. Ben-Nun et al., J. Immunol. 129 (1982) 918-919. Outros modelos de testes são descritos em Sandoz EP 159 289. O G-TsF inibe os mecanismos de actividade antecipada nas células-T, incluindo fases dependentes de IL-2. Esta actividade é útil para controlar o sistema imune humano em muitas indicações que vão desde a transplantação de órgãos até doenças auto-inunológicas tais como a poliartrite crónica e a encefalite dependendo da imunidade.

Deste modo, as concentrações de  $10^{-11}$  (baseadas no monómero) resultam numa inibição, metade do seu máximo, da proliferação de timócitos provocada pelo Concanavalin-A e da proliferação de células auxiliares T provocada pela interleucina-2 (vidé EXEMPLO).

Para além disto, o G-TsF aumenta a formação do tecido conectivo, e conduz à fibrose e angiogénese. É desta forma útil no tratamento de lesões da pele causadas por trauma, queimaduras, intervenções cirúrgicas ou senilidade. A capacidade do G-TsF em promover a formação de colagénio torna-o útil também para o tratamento de, por exemplo, osteoporose, em que a insuficiente formação de colagénio e outros componentes da matriz óssea conduz à patogénese.

As citadas actividades de formação de tecidos podem-se conhecer através de conhecidos modelos de testes, como por exemplo através de ensaio de cicatrização de feridas em ratos (M.B. Sporn et al., Science 219 [1983] 1329-1330) e no ensaio de provocação celular nos músculos de ratos (S. M. Seyedin et al. PNAS 82 [1985] 2267-2271).

Outras aplicações de interesse incluem o uso do G-TsF no tratamento de locais doadores de enxertos de pele,

*W. J. J. J.*

ferimentos na córnea, chagas provocadas pela permanência prolongada na cama e úlceras diabéticas. Pode-se até encarar o seu uso potencial na terapia do cancro.

Além disso, o conhecimento da sequência completa para o G-TsF maduro e precursor possibilita a preparação de derivados do G-TsF recombinante possuindo propriedades modificadas, como por exemplo melhoradas, em relação às propriedades do produto maduro.

É muito possível que a parte do precursor, enquanto tal, possua as suas próprias actividades farmacológicas benéficas.

Para as supracitadas indicações as dosagens apropriadas irão naturalmente depender, por exemplo, do G-TsF empregue, do hospedeiro, do modo de administração e da natureza e severidade da condição a ser tratada. Contudo, em geral, há notícia de resultados satisfatórios em animais mediante a administração de dosagens diárias, desde cerca de 0,3 microgramas por Kg até cerca de 15 microgramas por Kg do peso total do animal. Em mamíferos de maior porte, como por exemplo os humanos, uma dosagem diária indicada está compreendida entre cerca de 20 microgramas até cerca de 1.000 microgramas, como por exemplo entre 50 e até 500 microgramas de G-TsF em forma madura, convenientemente administradas até 4 vezes por dia.

O G-TsF pode ser administrado por qualquer via convencional aos péptidos, em particular tópicamente, como por exemplo sob a forma de pomadas ou suspensões ou sistémicamente, como por exemplo sob a forma de injeções parentéricas ou infusões.

A presente invenção compreende ainda a preparação de composições farmacêuticas contendo G-TsF em associação com pelo menos um veículo farmacêutico ou diluente. Tais com

posições podem ser feitas de maneira convencional. As formas de dosagem unitária contem, por exemplo, desde cerca de 5 microgramas até cerca de 500 microgramas de G-TsF.

As indicações particularmente preferidas para o G-TsF são a cicatrização de feridas, que sejam feridas de superfície quer sejam feridas internas, osteoporose, transplantação de órgãos e doenças autoimunológicas.

O G-TsF pode ser combinado com agentes de activação tais como TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, EGF (factor de crescimento epidérmico) ou outros factores de crescimento ou de diferenciação. A quantidade de agente de activação presente depende directamente da quantidade de G-TsF nas composições activadas como são administradas ao recipiente.

#### 7 - Abreviaturas

|                      |                                                                                                                                                 |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CHO -                | Ovário de Criceto Chinês                                                                                                                        |
| CIF-B -              | Factor B provocador de cartilagens                                                                                                              |
| DMEM -               | Meio Eagle modificado do Dulbecco                                                                                                               |
| EDTA -               | Ácido tetracético etileno diamina                                                                                                               |
| EGTA -               | etileneglicol-bis-( $\beta$ -aminoetiléter)-N,N,N',N'-ácido-tetraacético                                                                        |
| FPLC <sup>TM</sup> - | Cromatografia de rápida proteína líquida                                                                                                        |
| G-TsF -              | Factor Supressor de células T derivadas de glioblastoma                                                                                         |
| <sup>3</sup> H-Tdr - | timidina tritriatada                                                                                                                            |
| IL-2 -               | Interleucina-2                                                                                                                                  |
| MIS -                | Substância Inibidora Mülleriana                                                                                                                 |
| NET -                | 750 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 50 mM de Tris.HCl pH 7,5                                                                                          |
| PAGE -               | Electroforese de gel de poliacrilamida                                                                                                          |
| PBS -                | Salina tamponizada com fosfato: 8 gr/l NaCl, 0,2 gr/l KCl, 1,15 gr/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
| SDS -                | Sulfato dodecilo de sódio                                                                                                                       |

TBS - 10 mM Tris.HCl pH 7,5, 140 mM NaCl  
TE - 10 mM Tris.HCl pH 7,5, 1 mM EDTA  
TEN - 100 mM NaCl, 10 mM Tris.HCl pH 7,5, 1 mM EDTA  
TES - 10 mM Tris. HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,2% SDS  
TGF- $\beta$  - Factor $\beta$  transformador do crescimento (=TGF- 1)  
TGF- $\beta$ 1 - Factor $\beta$  1 transformador do crescimento  
TGF- $\beta$ 2 - Factor $\beta$  2 transformador do crescimento

Figura 1 - Oligonucleótidos usados para vislumbra a livraria de cDNA

Prova A:

|    |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1  | Ala  | Leu | Asp | Ala | Ala | Tir  | Cis | Phe | Arg | Asn | Val | Gln | Asp | Asn | Cis | Cis | Leu | Arg | Pro | Leu | Tir | Ala | Asp |
|    | **   | **  | **  | **  | **  | **   | **  | **  | *   | **  | **  | **  | **  | **  | **  | **  | **  | *   | **  | **  | **  | *   | **  |
| 5' | -GCC | CTG | GAT | GCT | GCC | TAC  | TGC | TTC | CGC | AAT | GTG | CAG | GAC | -3' |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    |      |     |     |     | 3'  | -TTA | CAC | GTC | CTG | TTC | ACG | ACG | GAC | TCC | GGC | GAC | ATA | CGA | CTG | -5' |     |     |     |

Prova B:

|    |      |     |     |     |     |     |     |     |     |       |
|----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| 4  | Ala  | Ala | Tir | Cis | Phe | Arg | Asn | Val | Gln | Asp   |
|    |      |     |     |     |     |     |     |     |     | 13    |
| 5' | -GCI | GCI | TAC | TGC | TTC | IGI | AAC | GFI | CAI | GA-3' |
|    |      |     | T   | T   | T   | T   |     |     |     |       |

*Wifama*

- 66 -

Figura 2a: Sequências completas de nucleótidos e aminoácidos do G-TsF maduro humano

Sítio de clivagem pela protease

↓

CGT GCT TTG GAT GCG GCC TAT TGC TTT AGA AAT GTG CAG GAT AAT  
Ara Ala Leu Asp Ala Ala Tir Cis Phe Ara Asn Val Gln Asp Asn  
1 10

54 81  
TGC TGC CTA CGT CCA CTT TAC ATT GAT TTC AAG AGG GAT CTA GGG  
Cis Cis Leu Arg Pro Leu Tir Ile Asp Phe Lis Arg Asp Leu Gli  
20

108 135  
TGG AAA TGG ATA CAC GAA CCC AAA GGG TAC AAT GCC AAC TTC TCT  
Trp Lis Tro Ile His Glu Pro Lis Gli Tir Asn Ala Asn Phe Cis  
30 40

162  
GCT GGA GCA TGC CCG TAT TTA TGG AGT TCA GAC ACT CAG CAC AGC  
Ala Gli Ala Cis Pro Tir Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser  
50

189 216  
AGG GTC CTG AGC TTA TAT AAT ACC ATA AAT CCA GAA GCA TCT GCT  
Arg Val Leu Ser Leu Tir Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala  
60 70

243 270  
TCT CCT TGC TGC GTG TCC CAA GAT TTA GAA CCT CTA ACC ATT CTC  
Ser Pro Cis Cis Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu  
80

297  
TAC TAC ATT GGC AAA ACA CCC AAG ATT GAA CAG CTT TCT AAT ATG  
Tir Tir Ile Gli Lis Thr Pro Lis Ile Glu Gln Leu Ser Asn MET  
90 100

324 351  
ATT GTA AAG TCT TGC AAA TGC AGC TAA  
Ile Val Lis Ser Cis Lis Cis Ser .  
110

Figura 2b: Estratégia de Sequenciamento

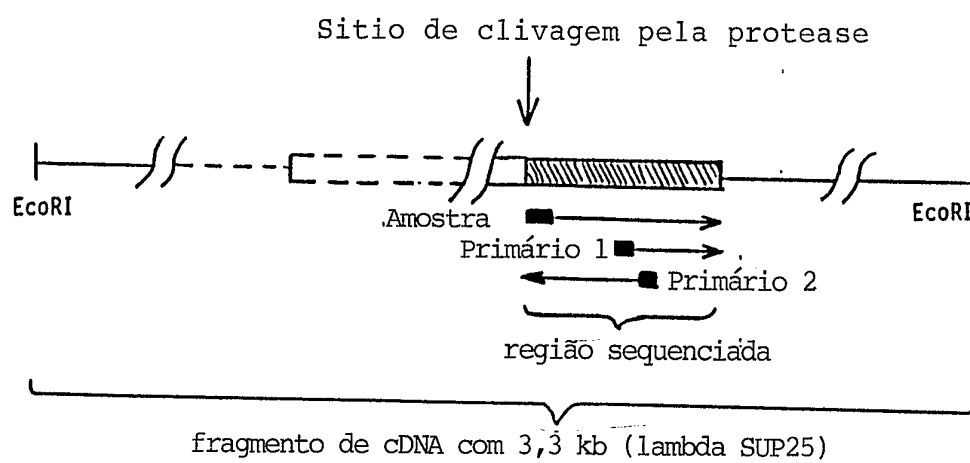


Figura 2c Diagrama esquemático e mapa parcial da restrição  
da endonuclease do cDNA do G-TsF

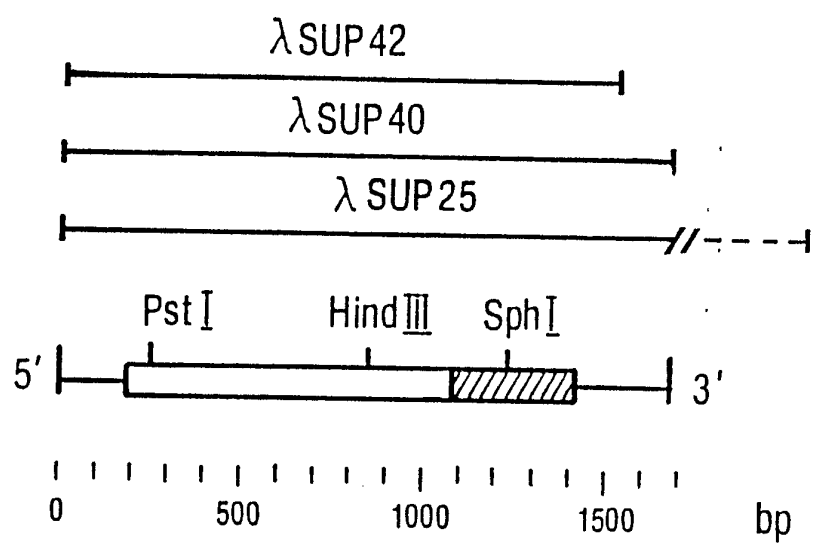


Figura 2d Sequências de nucleótidos e de aminoácidos para o precursor de G-TsF humano

```

10      20      30      40      50      60      70
CAAGCAGGAT ACGTTTTTCT GTTGGGCATT GACTAGATTG TTTCGAAAG TTTCGCATCA AAAACAAACA

80      90      100     110     120     130     140
ACAACAACAA AAAACCAAAC AACTCTCCTT GATCTATACT TTGAGAATTG TTGATTTCCT TTTTITATT

150     160     170     180     196
CTGACTTTTA AAAACAACCT TTTTTCAC TTTTAAAAA ATG CAC TAC TGT GTG CTG AGC GCT
MET His Tyr Cys Val Leu Ser Ala

211     226     241     256
TTT CTG ATC CTG CAT CTG GTC ACG GTC GCG CTC AGC CTG TCT ACC TGC AGC ACA CTC
Phe Leu Ile Leu His Leu Val Thr Val Ala Leu Ser Leu Ser Thr Cys Ser Thr Leu

271     286     301     316
GAT ATG GAC CAG TTC ATG GCG AAG AGG ATC GAG GCG ATC GCG GCG CAG ATC CTG AGC
Asp Met Asp Gln Phe Met Arg Lys Arg Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser

331     346     361     376
AAG CTG AAG CTC ACC AGT CCC CCA GAA GAC TAT CCT GAG CCC GAG GAA GTC CCC CCG
Lys Leu Lys Leu Thr Ser Pro Pro Glu Asp Tyr Pro Glu Pro Glu Glu Val Pro Pro

391     406     421
GAG GTG ATT TCC ATC TAC AAC AGC ACC AGG GAC TTG CTC CAG GAG AAG GCG AGC CCG
Glu Val Ile Ser Ile Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Leu Leu Gln Glu Lys Ala Ser Arg

436     451     466     481
AGG GCG GCC GCC TGC GAG GCG AGG AGC GAC GAA GAG TAC TAC GCC AAG GAG GTT
Arg Ala Ala Ala Cys Glu Arg Glu Arg Ser Asp Glu Glu Tyr Tyr Ala Lys Glu Val

496     511     526     541
TAC AAA ATA GAC ATG CCG CCC TTC TTC CCC TCC GAA AAT GCC ATC CCG CCC ACT TTC
Tyr Lys Ile Asp Met Pro Pro Phe Phe Pro Ser Glu Asn Ala Ile Pro Pro Thr Phe

556     571     586     601
TAC AGA CCC TAC TTC AGA ATT GTT CGA TTT GAC GTC TCA GCA ATG GAG AAG AAT GCT
Tyr Arg Pro Tyr Phe Arg Ile Val Arg Phe Asp Val Ser Ala Met Glu Lys Asn Ala

616     631     646     661
TCC AAT TTG GTG AAA GCA GAG TTC AGA GTC TTT CGT TTG CAG AAC CCA AAA GCC AGA
Ser Asn Leu Val Lys Ala Glu Phe Arg Val Phe Arg Leu Gln Asn Pro Lys Ala Arg

676     691     706
GTG CCT GAA CAA CGG ATT GAG CTA TAT CAG ATT CTC AAG TCC AAA GAT TTA ACA TCT
Val Pro Glu Gln Arg Ile Glu Leu Tyr Gln Ile Leu Lys Ser Lys Asp Leu Thr Ser

721     736     751     766
CCA ACC CAG GCG TAC ATC GAC AGC AAA GTT GTG AAA ACA AGA GCA GAA GGC GAA TGG
Pro Thr Gln Arg Tyr Ile Asp Ser Lys Val Val Lys Thr Arg Ala Glu Gly Glu Trp

781     796     811     826
CTC TCC TTC GAT GTA ACT GAT GCT GTT CAT GAA TGG CTT CAC CAT AAA GAC AGG AAC
Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Ala Val His Glu Trp Leu His His Lys Asp Arg Asn

841     856     871     886
CTG GGA TTT AAA ATA AGC TTA CAC TGT CCC TGC TGC ACT TTT GTA CCA TCT AAT AAT
Leu Gly Phe Lys Ile Ser Leu His Cys Pro Cys Cys Thr Phe Val Pro Ser Asn Asn

901     916     931     946
TAC ATC ATC CCA AAT AAA AGT GAA GAA CTA GAA GCA AGA TTT GCA GGT ATT GAT GGC
Tyr Ile Ile Pro Asn Lys Ser Glu Glu Leu Glu Ala Arg Phe Ala Gly Ile Asp Gly

961     976     991
ACC TCC ACA TAT ACC AGT GGT GAT CAG AAA ACT ATA AAG TCC ACT AGG AAA AAA AAC
Thr Ser Thr Tyr Thr Ser Gly Asp Gln Lys Thr Ile Lys Ser Thr Arg Lys Lys Asn

1006    1021    1036    1051
AGT GGG AAG ACC CCA CAT CTC CTG CTA ATG TTA TTG CCC TCC TAC AGA CTT GAG TCA
Ser Gly Lys Thr Pro His Leu Leu Leu Met Leu Leu Pro Ser Tyr Arg Leu Glu Ser

1066    1081    1096    1111
CAA CAG ACC AAC CGG CGG AAG AAG CGT GCT TTG GAT GCG GCC TAT TGC TTT AGA AAT
Gln Gln Thr Asn Arg Arg Lys Lys Arg Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn

1126    1141    1156    1171
GTG CAG GAT AAT TGC TGC CTA CGT CCA CTT TAC ATT GAT TTC AAG AGG GAT CTA GGG
Val Gln Asp Asn Cys Cys Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly

1186    1201    1216    1231
TGG AAA TGG ATA CAC GAA CCC AAA GGG TAC AAT GCC AAC TTC TGT GCT GCA GCA TGC
Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys

1246    1261    1276
CCG TAT TTA TGG AGT TCA GAC ACT CAG CAC AGC AGG GTC CTG AGC TTA TAT AAT ACC
Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu Tyr Asn Thr

1291    1306    1321    1336
ATA AAT CCA GAA GCA TCT GCT TCT CCT TGC TGC GTC TCC CAA GAT TTA GAA CCT CTA
Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu

1351    1366    1381    1396
ACC ATT CTC TAC TAC ATT GGC AAA ACA CCC AAG ATT GAA CAG CTT TCT AAT ATG ATT
Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile

1411    1426    1436    1446    1456    1466
GTA AAG TCT TGC AAA TGC AGC TAA AATTCTTGA AAGTGGCAA GACCAAAATG ACAATGATGA
Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser

1476    1486    1496    1506    1516    1526    1536
TGATAATGAT GATGACGACG ACAACGATGA TGCTTGTAAC AAGAAAACAT AAGAGAGCCT TGGTTCATCA

1546    1556    1566    1576    1586    1596    1606
GTGTAAAAA ATTTTGAAG AGGCGGTACT AGTTGAGACA CTTTGAAGT TTGTGTTCTG TTTGTAAAAA

1616    1626    1636    1646    1656    1666    1676
CTGGCATCTG ACACAAAAA AGTTGAAGGC CTTATTCTAC ATTTACCTTA CTTTGAAGT GAGAGAGACA

1686
AGAAGCAAT TTTTAAAA

```

*W. F. F. F.* 70

Figura 2e Comparação das seqüências de aminoácidos dos pre-  
cursores de G-TsF e TgF- $\beta$ 1

|                |                                                                                                  |                                                                               |                                                 |       |                                    |      |      |     |     |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------|------------------------------------|------|------|-----|-----|
|                | 11                                                                                               | 21                                                                            | 31                                              | 41    | 51                                 | 61   | 66   | 76  | 86  |
| G-TsF          | 1                                                                                                | MHYCVLSAPLILHLVTVALSLSTCSTLDMQFMKRKRIEAI                                      | QILSKLKLTSPPEDYPEEVP                            | ----  | EVISIYNSTRDLLQEKASRA               |      |      |     |     |
| TGF- $\beta$ 1 | 1                                                                                                | MPPSGRLRLPLLLPLMLLVLTTPGPPAAGLSTCKTIDMELVKRKRIEAI                             | QILSKLRLASPP                                    | ----  | SQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRD            | ---- | RV   |     |     |
|                | 10                                                                                               | 20                                                                            | 30                                              | 40    | 50                                 | 60   | 66   | 76  | 86  |
|                | 96                                                                                               | 103                                                                           | 113                                             | 123   | 133                                | 149  | 159  | 169 | 179 |
|                | AACERERSDE                                                                                       | ----                                                                          | EYYAKEVYKIDMPPFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFVSAHEKNA     | ----  | SNLVKAEFRVFRQLQNPKEQRIELYQILSKDLTS |      |      |     |     |
|                | AGESAEPPEPEADYAKVTRVLH                                                                           | ----                                                                          | VETHNEIYDKFKQSTHSIYMEFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLRLK | ----  | VEQHVVELYQ                         | ---- | KYSN |     |     |
|                | 98                                                                                               | 108                                                                           | 115                                             | 125   | 135                                | 145  | 155  | 172 | 177 |
|                | 189                                                                                              | 199                                                                           | 209                                             | 219   | 229                                | 239  | 249  | 259 | 269 |
|                | PTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDVHWEHLHKRNLGFKISLHCPCTFPVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKNSGKTP |                                                                               |                                                 |       |                                    |      |      |     |     |
|                | NSWRYLSNRLAPSDSPFWLSFDVTGVVROWLSRGGEIEGFRLSAHCSC                                                 | -----                                                                         | DSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATI                       | ----- | HGMNRP                             |      |      |     |     |
|                | 187                                                                                              | 197                                                                           | 207                                             | 217   |                                    | 233  | 243  |     | 257 |
|                | 289                                                                                              | 299                                                                           | 309                                             | 319   | 329                                | 339  | 349  | 359 | 369 |
|                | HLLMLLPSYRLESQOTNRKKH                                                                            | ALDAAYCFRNVDNCCLRPLYIDFKRDLGKWKIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINFEASAPC   |                                                 |       |                                    |      |      |     |     |
|                | FLLMATFLERAQHLQ                                                                                  | SSRHRRLDTNYSSTKNCVQRLYIDFRKDLGKWKIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINFEASAPC |                                                 |       |                                    |      |      |     |     |
|                | 267                                                                                              | 276                                                                           | 286                                             | 296   | 306                                | 316  | 326  | 336 | 346 |
|                | 389                                                                                              | 399                                                                           | 409                                             |       |                                    |      |      |     |     |
|                | CVSQDLEPLTILYIYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS                                                              |                                                                               |                                                 | 414   |                                    |      |      |     |     |
|                | CVPALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVKSKCS                                                                 |                                                                               |                                                 | 391   |                                    |      |      |     |     |
|                | 366                                                                                              | 376                                                                           | 386                                             |       |                                    |      |      |     |     |

Figura 3a: Vector de expressão das células de CHO e COS

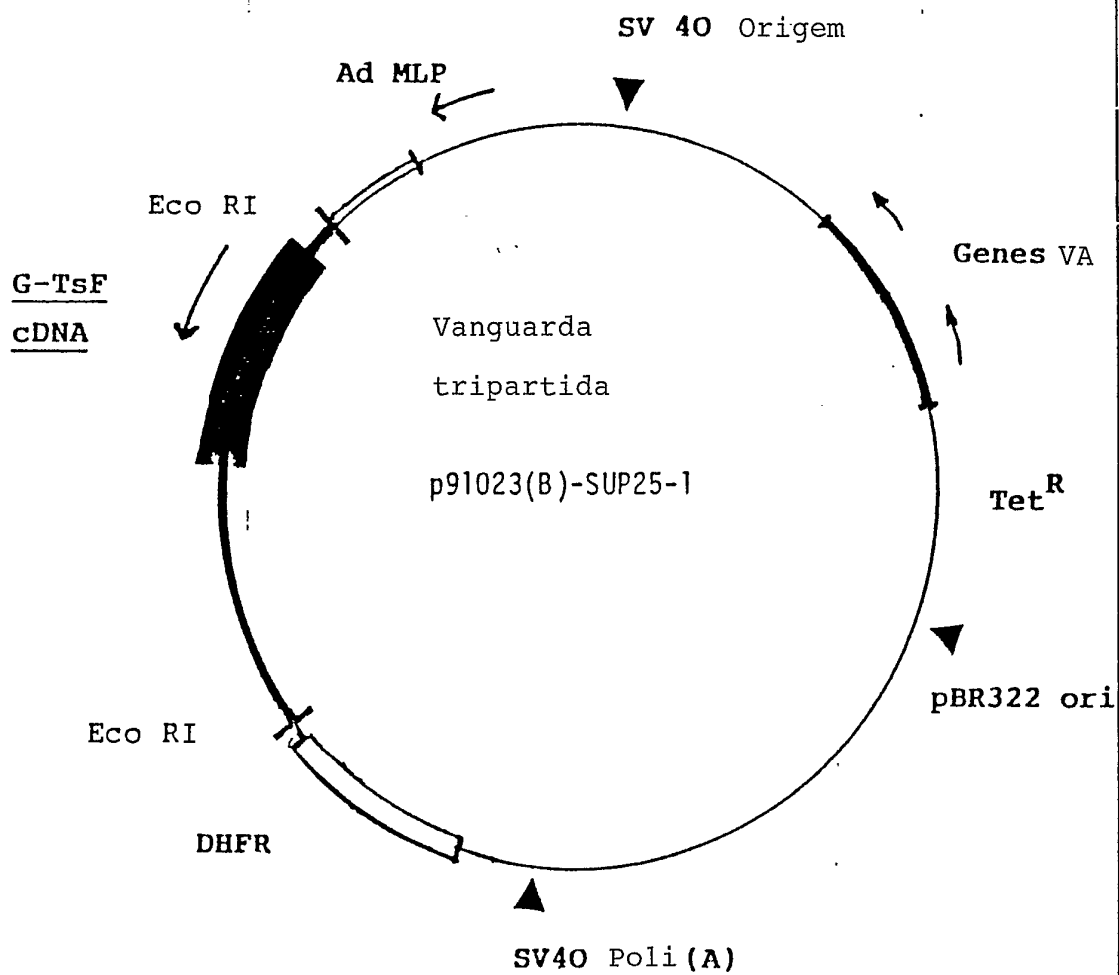
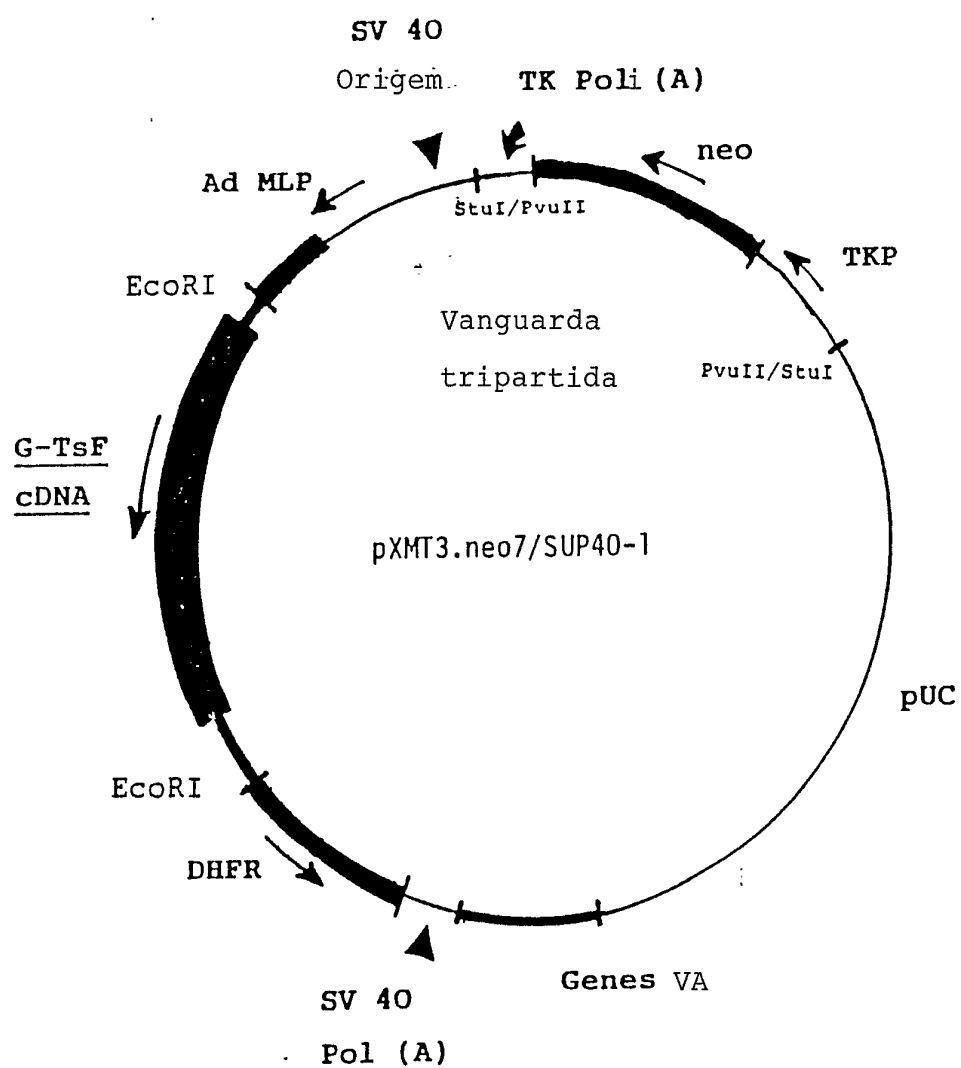


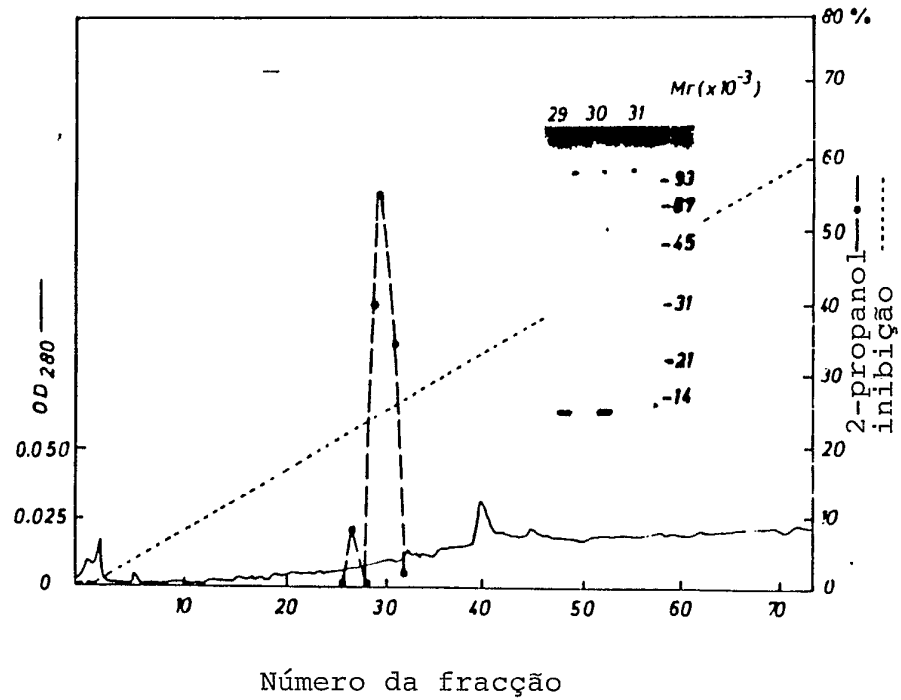
Figura 3b: Plasmídio de expressão para as células de CHO  
e COS com cDNA SUP40



*Unifama*

73

Figura 4: Fase final de purificação para o G-TsF a partir de 308 células de glioblastoma de 1 l de sobrenadante de glioblastoma sobre Pro-RPC<sup>TM</sup> com ácido trifluoracético/isopropanol



*Wifaria*

Figura 5: Actividade do G-TsF puro humano

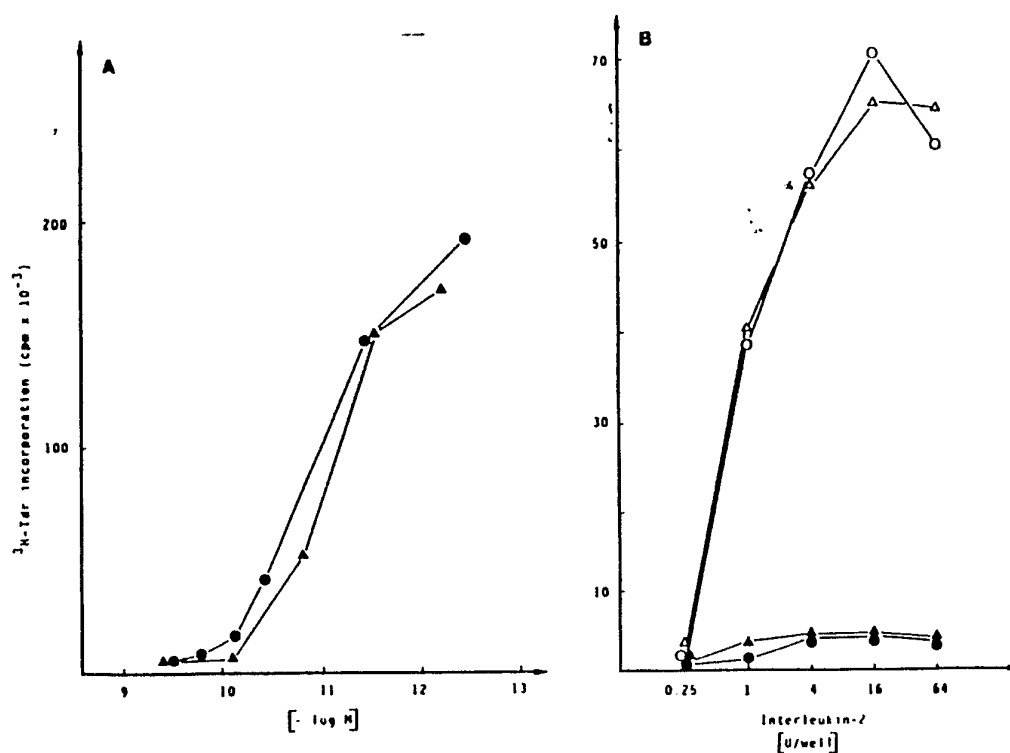


Figura 6: Purificação final do G-TsF a partir de 10 de  
sobrenatante de glioblastoma sobre Pro-RPC<sup>TM</sup> com  
TFA/isopropanol

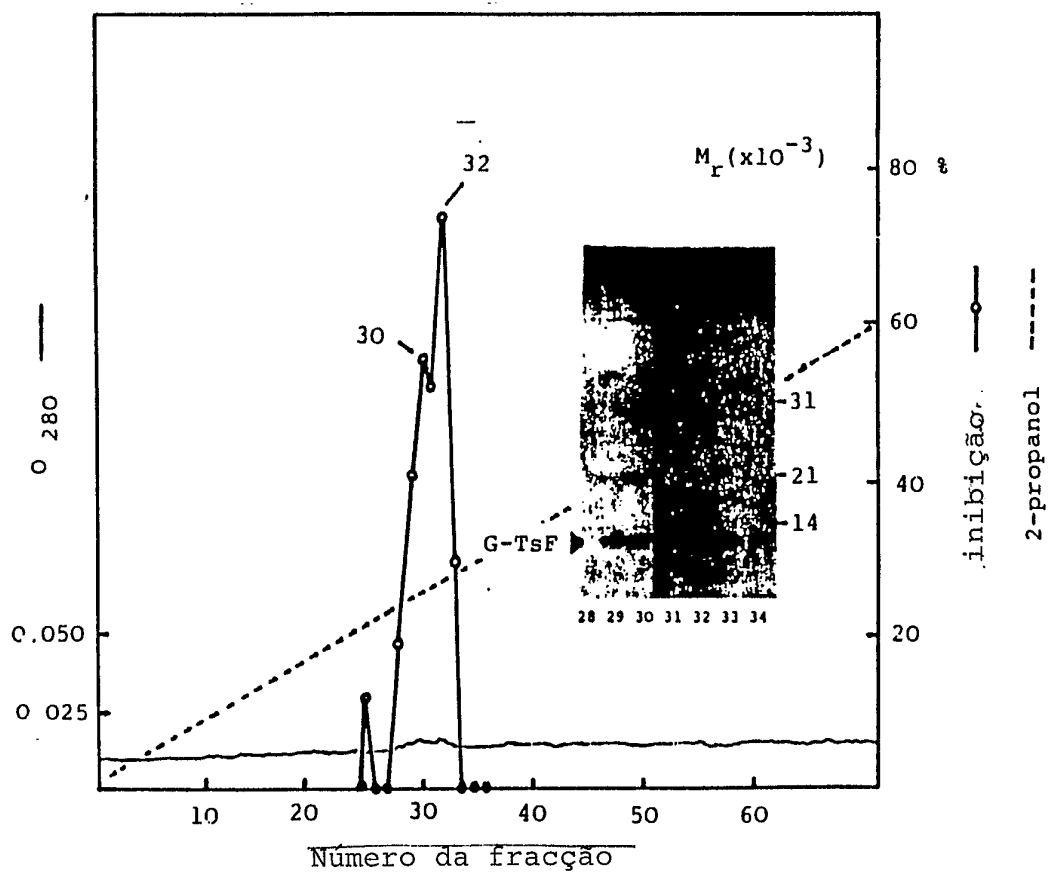


Figura 7a: Plasmidio para a expressão de G-TsF em E. coli  
com base no promotor lambda

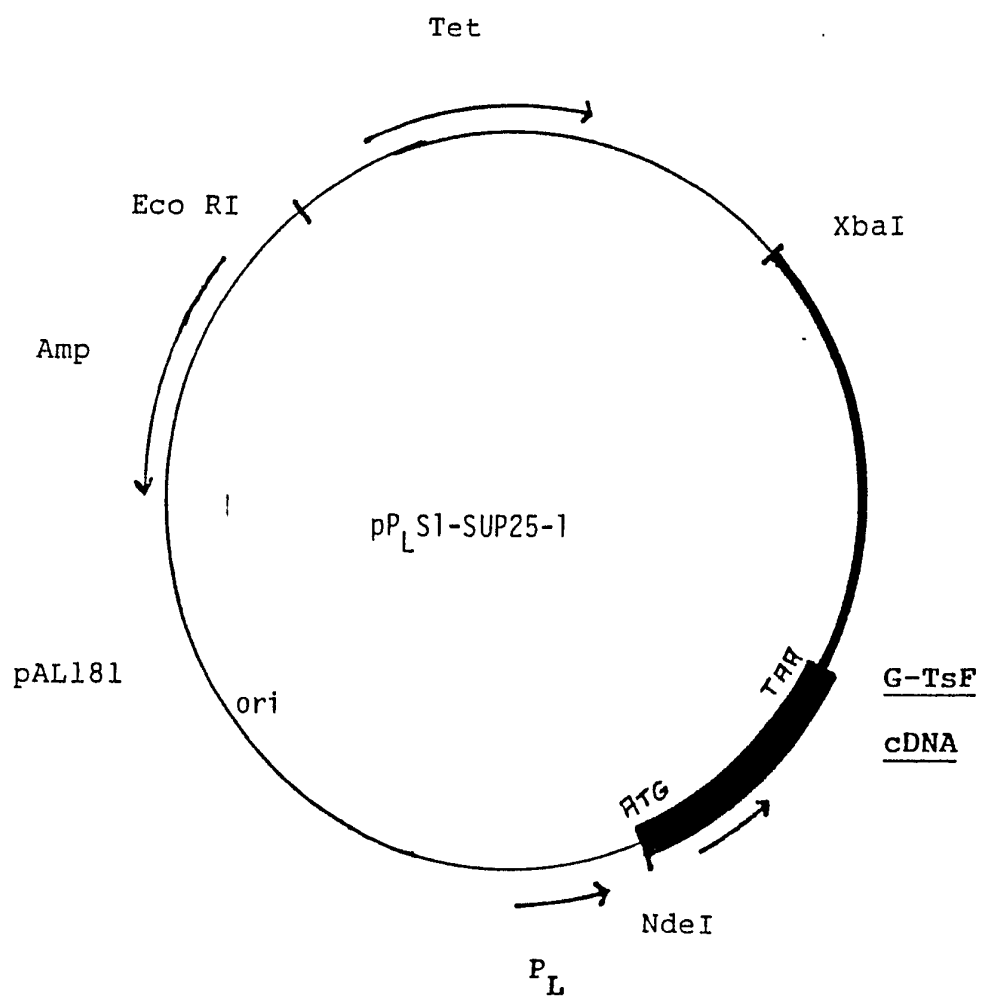
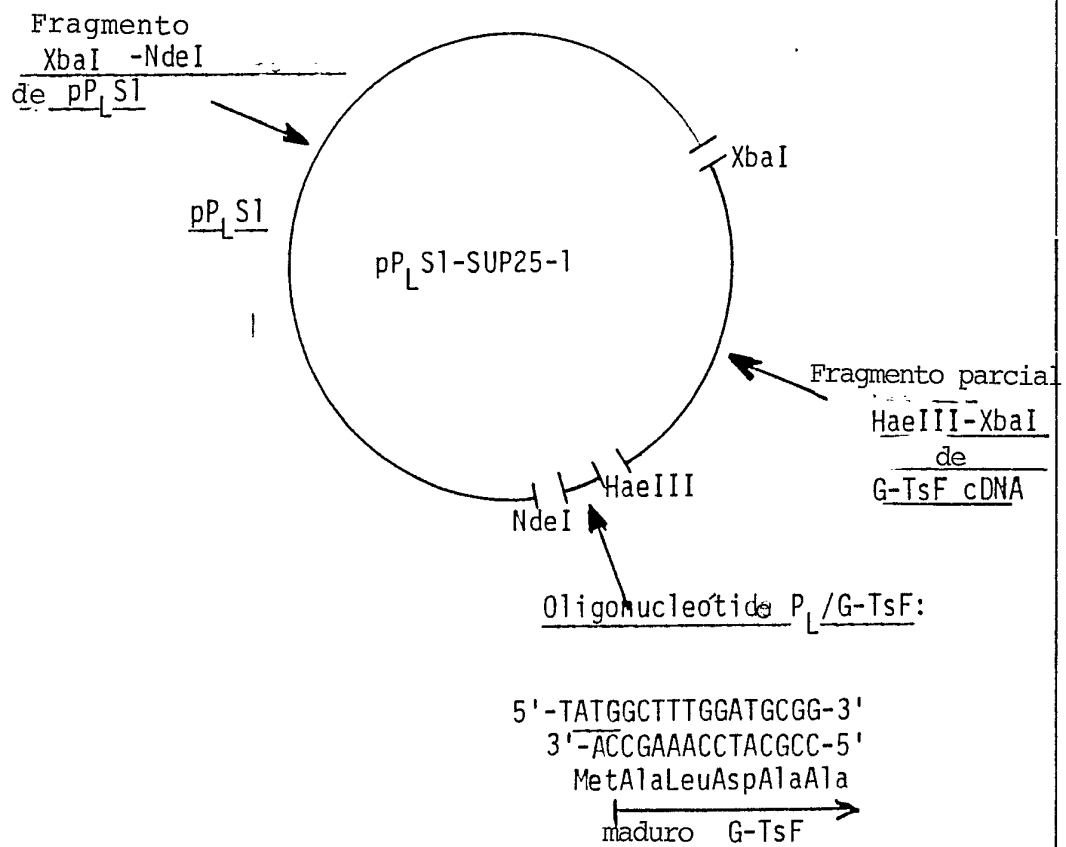
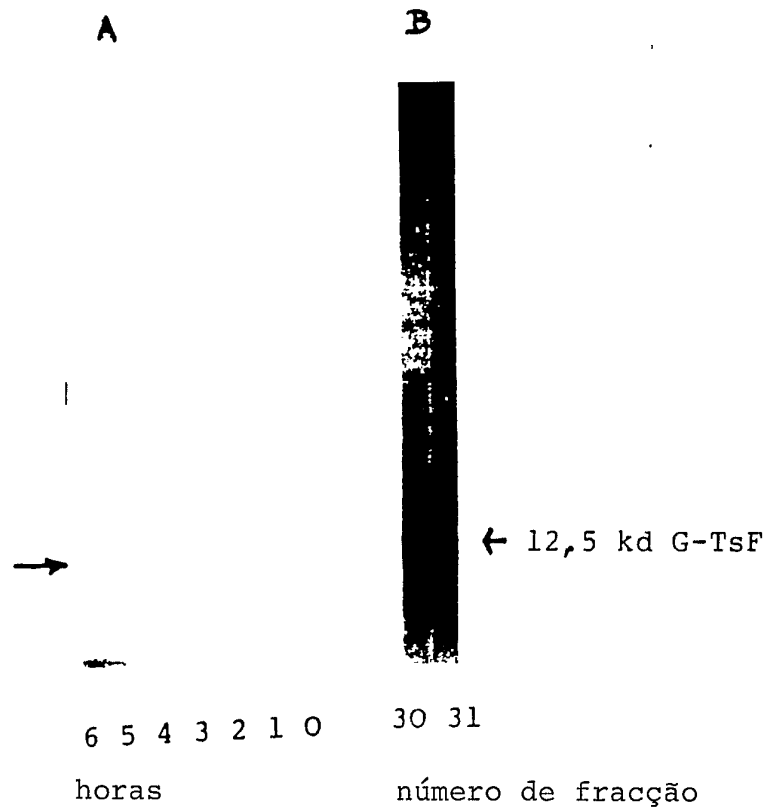


Figura 7b: Construção do plasmídeo de expressão pP<sub>L</sub>S1-SUP25-1



*W. F. A. M.*

Figura 8: Expressão e purificação do G-TsF recombinante de  
E. coli



*Wifaria*

Figura 9: Inibição da proliferação de timócitos por G-TsF  
recombinante de E. coli

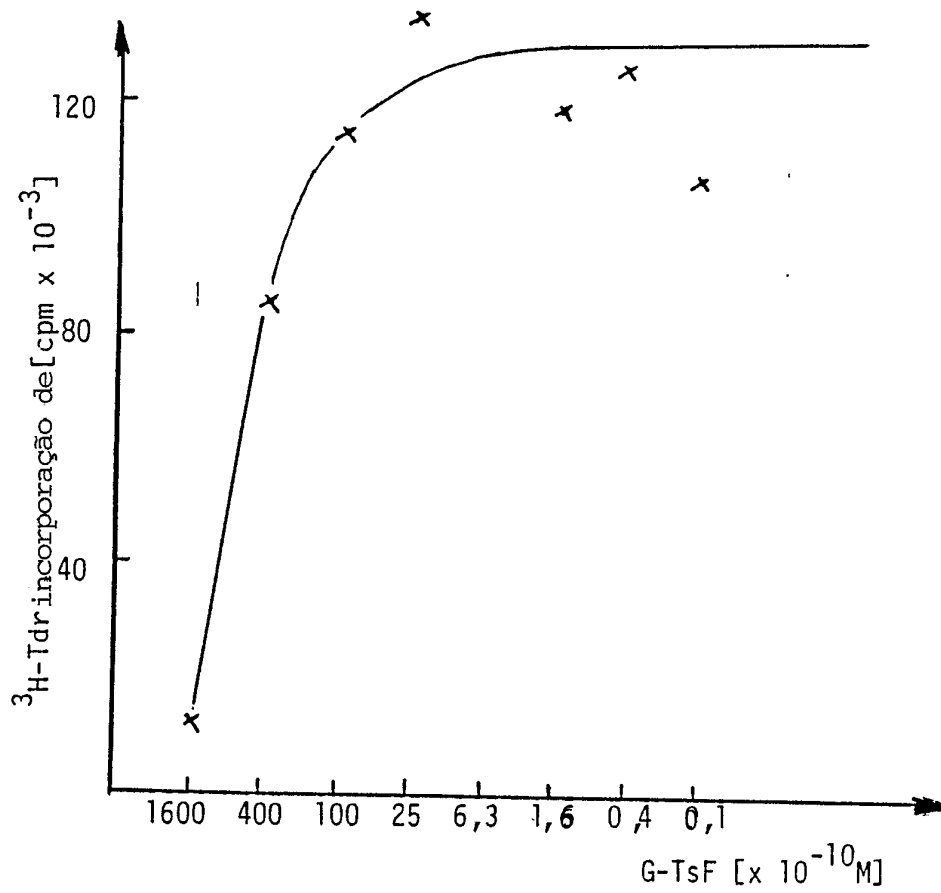


Figura 10: Demonstração da expressão de G-TsF por células  
de CHO

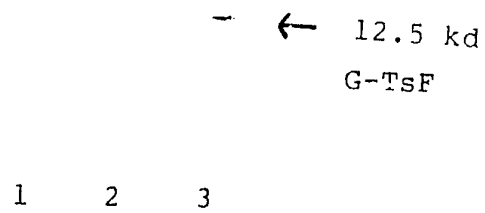
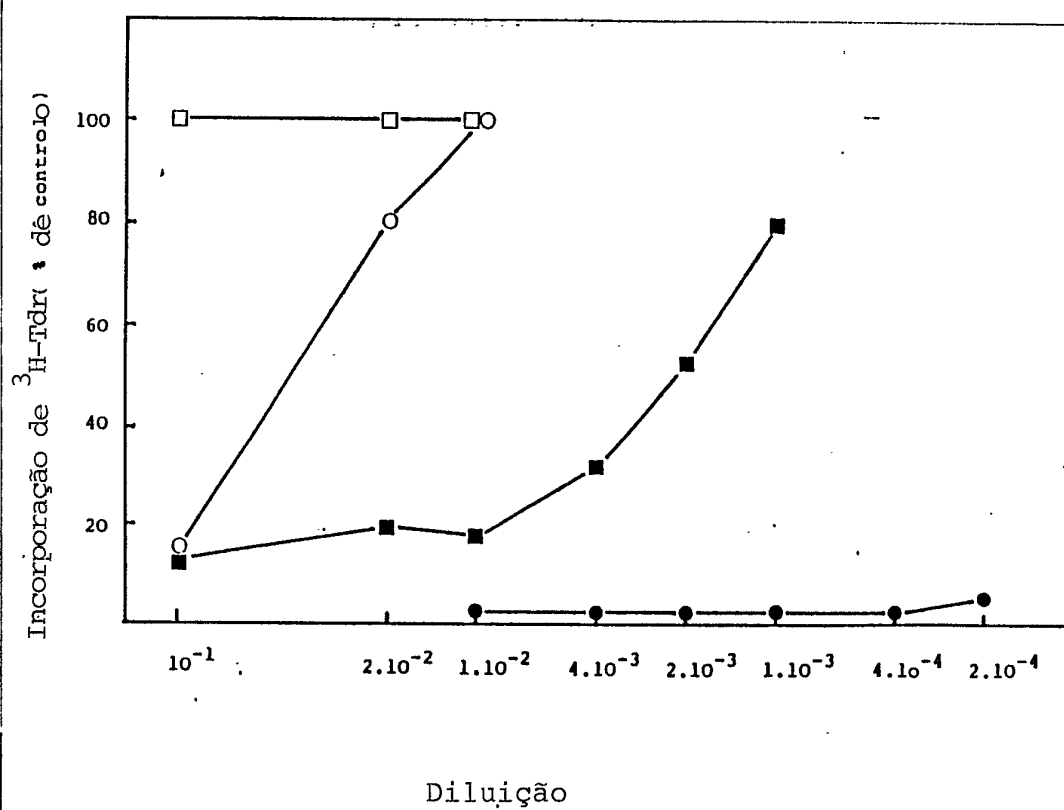


Figura 11: Inibição da proliferação de timócitos com G-TsF  
recombinante de células de CHO





## REIVINDICAÇÕES

1ª - Processo para a preparação duma proteína tendo actividade semelhante a factor G-TsF (factor supressor de células T de glioblastomas) humano sob forma substancialmente pura, caracterizado pelo facto de se recuperar a proteína de uma fonte natural ou de uma fonte obtida por técnicas de DNA recombinante.

2ª - Processo para a preparação de factor G-TsF humano substancialmente puro, caracterizado pelo facto de se recuperar a proteína de uma fonte natural ou de uma fonte obtida por técnicas de DNA recombinante.

3ª - Processo para a preparação dum novo factor supressor de células T sob uma forma substancialmente pura por técnicas de DNA recombinante, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo facto de se recuperar a proteína segregada por uma célula hospedeira transformada com um gene que codifica para essa proteína.

4ª - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de a proteína obtida sob a forma substancialmente pura ter uma actividade semelhante a factor supressor de células T derivado de glioblastomas (G-TsF) humano.

5ª - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de a proteína obtida ser G-TsF humano



— substancialmente puro.

6ª - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se obter G-TsF recombinante.

7ª - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se obter G-TsF recombinante de mamíferos.

8ª - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se obter G-TsF recombinante humano.

9ª - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se obter um precursor de G-TsF recombinante.

10ª - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se obter uma parte de precursor de G-TsF recombinante.

11ª - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se obter G-TsF maduro recombinante.

12ª - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de a sequência completa de amino-ácidos da proteína recuperada ser a seguinte

*Wifan*

10 20 30 40 50 60 70  
CAAGCAGGAT ACGTTTTTCT GTTGGGCAIT GACTAGATTG TTTCAAAAG TTTCGCATCA AAAACAAACA

80 90 100 110 120 130 140  
ACAACAACAA AAAACCAAC AACTCTCCTT GATCTATACT TTGAGAATTG TTGATTTCTT TTTTTTATT

150 160 170 180 196  
CTGACTTTTA AAAACAACCT TTTTTCAC TTTTAAAAA ATG CAC TAC TGT GTG CTG AGC GCT  
MET His Tyr Cys Val Leu Ser Ala

211 226 241 256  
TTT CTG ATC CTG CAT CTG GTC ACG GTC GCG CTC AGC CTG TCT ACC TGC AGC ACA CTC  
Phe Leu Ile Leu His Leu Val Thr Val Ala Leu Ser Leu Ser Thr Cys Ser Thr Leu

271 286 301 316  
GAT ATG GAC CAG TTC ATG CGC AAG AGG ATC GAG GCG ATC CGC GGG CAG ATC CTG AGC  
Asp Met Asp Gln Phe Met Arg Lys Arg Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser

331 346 361 376  
AAG CTG AAG CTC ACC AGT CCC CCA GAA GAC TAT CCT GAG CCC GAG GAA GTC CCC CCG  
Lys Leu Lys Leu Thr Ser Pro Pro Glu Asp Tyr Pro Glu Pro Glu Glu Val Pro Pro

391 406 421  
GAG GTG ATT TCC ATC TAC AAC AGC ACC AGG GAC TTG CTC CAG GAG AAG GCG AGC CCG  
Glu Val Ile Ser Ile Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Leu Leu Gln Glu Lys Ala Ser Arg

436 451 466 481  
AGG GCG GCC GCC TGC GAG CGC GAG AGG AGC GAC GAA GAG TAC TAC GCC AAG GAG GTT  
Arg Ala Ala Ala Cys Glu Arg Glu Arg Ser Asp Glu Glu Tyr Tyr Ala Lys Glu Val

496 511 526 541  
TAC AAA ATA GAC ATG CCG CCC TTC TTC CCC TCC GAA AAT GCC ATC CCG CCC ACT TTC  
Tyr Lys Ile Asp Met Pro Pro Phe Phe Pro Ser Glu Asn Ala Ile Pro Pro Thr Phe

556 571 586 601  
TAC AGA CCC TAC TTC AGA ATT GTT CGA TTT GAC GTC TCA CCA ATG GAG AAG AAT GCT  
Tyr Arg Pro Tyr Phe Arg Ile Val Arg Phe Asp Val Ser Ala Met Glu Lys Asn Ala

616 631 646 661  
TCC AAT TTG GTG AAA GCA GAG TTC AGA GTC TTT CGT TTG CAG AAC CCA AAA GCC AGA  
Ser Asn Leu Val Lys Ala Glu Phe Arg Val Phe Arg Leu Gln Asn Pro Lys Ala Arg

676 691 706  
GTG CCT GAA CAA CGG ATT GAG CTA TAT CAG ATT CTC AAG TCC AAA GAT TTA ACA TCT  
Val Pro Glu Gln Arg Ile Glu Leu Tyr Gln Ile Leu Lys Ser Lys Asp Leu Thr Ser

721 736 751 766  
CCA ACC CAG CGC TAC ATC GAC AGC AAA GTT GTG AAA ACA AGA GCA GAA GGC GAA TGG  
Pro Thr Gln Arg Tyr Ile Asp Ser Lys Val Val Lys Thr Arg Ala Glu Gly Glu Trp

781 796 811 826  
CTC TCC TTC GAT GTA ACT GAT GCT GTT CAT GAA TGG CTT CAC CAT AAA GAC AGG AAC  
Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Ala Val His Glu Trp Leu His His Lys Asp Arg Asn

841 856 871 886  
CTG GGA TTT AAA ATA AGC TTA CAC TGT CCC TGC TGC ACT TTT GTA CCA TCT AAT AAT  
Leu Gly Phe Lys Ile Ser Leu His Cys Pro Cys Cys Thr Phe Val Pro Ser Asn Asn

901 916 931 946  
TAC ATC ATC CCA AAT AAA AGT GAA GAA CTA GAA GCA AGA TTT GCA GGT ATT GAT GGC  
Tyr Ile Ile Pro Asn Lys Ser Glu Glu Leu Glu Ala Arg Phe Ala Gly Ile Asp Gly

961 976 991  
ACC TCC ACA TAT ACC AGT GGT GAT CAG AAA ACT ATA AAG TCC ACT AGG AAA AAA AAC  
Thr Ser Thr Tyr Thr Ser Gly Asp Gln Lys Thr Ile Lys Ser Thr Arg Lys Lys Asn

1006 1021 1036 1051  
AGT GGG AAG ACC CCA CAT CTC CTG CTA ATG TTA TTG CCC TCC TAC AGA CTT GAG TCA  
Ser Gly Lys Thr Pro His Leu Leu Leu Met Leu Leu Pro Ser Tyr Arg Leu Glu Ser

1066 1081 1096 1111  
CAA CAG ACC AAC CGG CGG AAG AAG CGT GCT TTG GAT GCG GCC TAT TGC TTT AGA AAT  
Gln Gln Thr Asn Arg Arg Lys Lys Arg Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn

*Winfame*

1176 1181 1186 1191  
 GTG CAG CAT AAT TGC TGC CTA CGT CCA CTT TAC ATT GAT TTC AAG AAG GAT CTA GGG  
 Val Gln Asp Asn Cys Cys Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly

1196 1201 1206 1211  
 TGG AAA TGG ATA CAC GAA CCC AAA GGG TAC AAT GCC AAC TTC TGT GGT GGA GCA TGC  
 Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys

1216 1221 1226 1231  
 CCG TAT TTA TGG AGT TCA GAC ACT CAG CAC AGC AGC GTC CTG AGC TTA TAT AAT ACC  
 Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu Tyr Asn Thr

1236 1241 1246 1251  
 ATA AAT CCA GAA GCA TCT GGT TCT CCT TGC TGC GTG TCC CAA GAT TTA GAA CCT CTA  
 Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu

1256 1261 1266 1271  
 ACC ATT CTC TAC TAC ATT GGC AAA ACA CCC AAG ATT GAA CAG CTT TCT AAT ATG ATT  
 Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile

1276 1281 1286 1291  
 GTA AAG TGT TGC AAA TGC AGC TAA AATTCTTGA AAGTGGCAA GACCAAAATG ACAAATGATG  
 Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser

1296 1301 1306 1311  
 TGATAATGAT GATGAGGACG ACAACGATGA TCTTGTAAAC AAGAAAACAT AAGAGAGCCT TGTTCATCA

1316 1321 1326 1331  
 GTGTAAAAA ATTTTGAAG AAGCGTACT AGTCAGACA CTTTGAAGT TTGTCTCTG TTTTAAAAA

1336 1341 1346 1351  
 CTGGCATCTG ACACAAAAA AGTTGAAGG CTTATCTAC ATTACCTA CTTTGAAGT GAGAGAGACA

1356 1361 1366 1371  
 AGAAGCAAT TTTTAAAA

13ª - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de a proteína obtida ter a sequência de aminoácidos indicada na reivindicação 12 antes da seta.

14ª - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de a proteína obtida ter a sequência de aminoácidos indicada na reivindicação 12 depois da seta.

15ª - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de a proteína obtida ser uma



forma alélica ou uma forma variante de uma proteína de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 14.

16ª - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se obter uma variante alélica ou uma variante resultante duma mutação pontual ou de modificações maiores para intensificar a actividade ou a produção sem modificar as principais propriedades funcionais e estruturais duma proteína de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 14.

17ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 14, caracterizado pelo facto de se obter uma mutante por anulação, inserção ou substituição duma proteína de acordo com as reivindicações 3 a 14.

18ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 17, caracterizado pelo facto de se obter a proteína sob a forma glicosilada.

19ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 17, caracterizado pelo facto de se obter uma proteína sob a forma não glicosilada.

20ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 19, caracterizado pelo facto de se obter a proteína sob a forma dimérica.

*Winfance*

87

21ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 12 ou 14, caracterizado pelo facto de se obter uma proteína que tem na posição 16 da sequência de aminoácidos a contar do principio da sequência Ile em vez de Cis e/ou Val em vez de Lis na posição 25.

22ª - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se obter G-TsF maduro recombinante usando a parte precursora de G-TsF.

23ª - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se obter uma proteína de G-TsF maduro precedida por resíduo de metionina.

24ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 23, caracterizado pelo facto de se obter uma proteína que tem um peso molecular da unidade monomérica madura de 12 320 dalton, desprezando qualquer glicosilação.

25ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 23, caracterizado pelo facto de se obter um precursor monomérico de 45 540 dalton, desprezando qualquer glicosilação.

26ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 25, caracterizado pelo facto de se obter uma proteína que, de acordo com o ensaio de proliferação de timócitos, tem uma actividade específica igual e pelo menos  $5 \times 10^7$  unidades/mg.



27ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 26, caracterizado pelo facto de se obter uma proteína madura que tem mais de 71% de semelhança da sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos referida na reivindicação 12 depois da seta.

28ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 26, caracterizado pelo facto de se obter uma proteína precursora que tem mais de 30% de semelhança da sequência de aminoácidos com a sequência completa de aminoácidos mencionados na reivindicação 12.

29ª - Processo para a preparação duma proteína com actividade semelhante a G-TsF, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender

- a) a construção dum vector que inclui ácido nucleico que codifica essa substância,
- b) a transformação duma célula hospedeira heteróloga com o vector,
- c) a cultura da célula hospedeira transformada e
- d) a recuperação a partir da cultura da proteína segregada.

30ª - Processo para a preparação de factor supresor de células T derivado de glioblastomas (G-TsF) dimérico bioactivo, caracterizado pelo facto de se efectuar previamente a síntese do precursor de G-TsF ou de partes do precursor de G-TsF essencial no processamento de transposição e proteolítico.



31ª - Processo de acordo com as reivindicações 4 ou 5, caracterizado pelo facto de compreender uma operação de cromatografia com permuta de catiões, preferivelmente, em resina sulfónica permutadora de catiões (Mono-S).

32ª - Processo de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo facto de compreender a cromatografia em hidroxilapatite e meio para cromatografia em fase inversa à base de sílica contendo  $\text{Cl}^-$  e cadeias de alquilo em  $\text{C}_8$  (Pro-RPC), cromatografia com permuta de catiões em resina sulfónica permutadora de catiões (Mono-S) e cromatografia em fase inversa sobre meio para cromatografia em fase inversa à base de sílica contendo  $\text{Cl}^-$  e cadeias de alquilo em  $\text{C}_8$  (Pro-RPC).

33ª - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo facto de compreender

- a) a concentração e a diafiltração de sobrenadantes de células duma fonte natural de G-TsF como, por exemplo, células de glioblastoma,
- b) cromatografia em hidroxilapatite,
- c) cromatografia em fase inversa sobre o meio para cromatografia em fase inversa à base de sílica contendo  $\text{Cl}^-$  e cadeias de alquilo em  $\text{C}_8$  (Pro-RPC) usando ácido trifluoracético/acetonitrilo (2x) como agente eluente,
- d) cromatografia com a permuta de catiões, preferivelmente sobre resina sulfónica permutadora de catiões (Mono-S) e
- e) cromatografia em fase inversa sobre o meio para cromatografia em fase inversa à base de sílica contendo  $\text{Cl}^-$  e cadeias de alquilo em  $\text{C}_8$  (Pro-RPC), usando ácido trifluoracético/2-propanol como agente eluente.



34ª - Processo para a preparação dum cDNA (complemento de ácido deoxirribonucleico) que codifica para uma proteína de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 28.

35ª - Processo de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo facto de se obter um cDNA tendo a sequência de nucleótidos indicada na reivindicação 12.

36ª - Processo de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo facto de se obter um cDNA tendo a sequência indicada na reivindicação 12 antes da seta.

37ª - Processo de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo facto de se obter um cDNA tendo a sequência indicada na reivindicação 12 depois da seta.

38ª - Processo para a preparação de um cDNA capaz de se hibridizar com um ácido nucleico de acordo com qualquer das reivindicações 34 a 37 e codificar para uma proteína que tem uma actividade semelhante a G-TsF ou de cDNA capaz de se hibridizar com o conjunto complementar desse ácido nucleico.

39ª - Processo para a preparação dum vector para a expressão duma proteína recombinante de acordo com qualquer das reivindicações 5 a 28 que inclui ácido nucleico que codifica essa proteína.



40ª - Processo de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo facto de o vector provocar a expressão eucariótica.

41ª - Processo de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo facto de o vector provocar a expressão em células de ovário de criceto chinês (CHO).

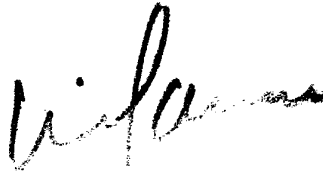
42ª - Processo de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo facto de o vector ser p91023(B)-SUP25-1.

43ª - Processo de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo facto de o vector ser pXMT3.neo7/SUP/O-1.

44ª - Processo de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo facto de o vector provocar a expressão procariótica.

45ª - Processo de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo facto de o vector provocar a expressão em E.coli.

46ª - Processo de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo facto de o vector obtido ser  $P_L^{P_{L1}}$ -SUP25-1.



47ª - Processo para a preparação duma linha de células transformadas com ácido nucleico que codifica para uma proteína de acordo com qualquer das reivindicações 5 a 28, caracterizado pelo facto de se inserir um vector de acordo com qualquer das reivindicações 39 a 43.

48ª - Processo de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo facto de se obter uma linha de células CHO.

49ª - Processo de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo facto de se obter a linha de células CHO/SP40-1/10MTX.

50ª - Processo para a preparação de composições farmaceuticas, caracterizado pelo facto de se misturar uma proteína de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 33 com veiculo ou um diluente farmaceuticamente aceitável.

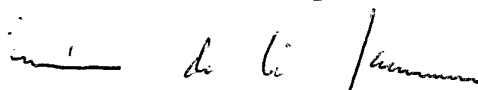
51ª - Método para o tratamento terapêutico de pacientes que necessitam de ser submetidos a imunossupressão, à cicatrização de feridas, à formação de tecido ósseo, ou foram submetidos a transplantes de órgãos ou sofrem de condições auto-imunes, que sofrem de osteoporose ou sofrem de condições de danificação de tecidos, que necessitam de tratamento de lesões da pele provocadas por traumas, queimaduras, operações cirúrgicas ou senilidade ou de terapia do cancro, caracterizado pelo facto de se administrar a animais que precisam o referido tratamento uma dosagem diária de G-TsF na forma madura de preferência compreendida entre cerca de 0,3 micrograma e cerca de 15 microgramas por kg de peso corporal e

a seres humanos cerca de 50 a cerca de 500 microgramas, dividida por até quatro doses por dia, por via tópica ou por meio de injeções parentéricas ou de infusões.

52ª - Processo para a preparação de derivados de G-TsF caracterizado pelo facto de se usar ou uma proteína de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 33, ou com cDNA de acordo com qualquer das reivindicações 34 a 38 ou dum vector de acordo com qualquer das reivindicações 39 a 46 ou duma linha de células de acordo com as reivindicações 47 a 49.

Lisboa, 16 de Novembro de 1987

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



**AMÉRICO DA SILVA CARVALHO**

Agente Oficial da Propriedade Industrial

Rua Castilho, 201, 3.º-E.

1000 LISBOA