

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 98.048

REQUERENTE: MERCK & CO., INC., norte-americana, industrial
Rahway, New Jersey 07065-0906, Estados Unidos
da América do Norte

EPÍGRAFE: "MÉTODO DE TRATAMENTO DE CÉLULAS CANCEROSAS
DA BEXIGA UTILIZANDO PROTEÍNAS HÍBRIDAS,
NOMEADAMENTE PE₄₀ MODIFICADO LIGADO A
TGF-ALFA"

INVENTORES: JANET AHERN, DAVID C. HEIMBROOK, ALLEN I.
OLIFF e STEVEN M. STIRDIVANT

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

21 de Junho de 1990 e 14 de Março de 1991 Nos. 542,281
e 669,269, nos Estados Unidos da América do Norte

98.048



MERCK & CO, INC.,

**"MÉTODO DE TRATAMENTO DE CÉLULAS CANCEROSAS DA BEXIGA UTILIZANDO
PROTEÍNAS HÍBRIDAS, NOMEADAMENTE PE₄₀ MODIFICADO LIGADO A
TGF-ALFA"**

MEMORIA DESCRITIVA

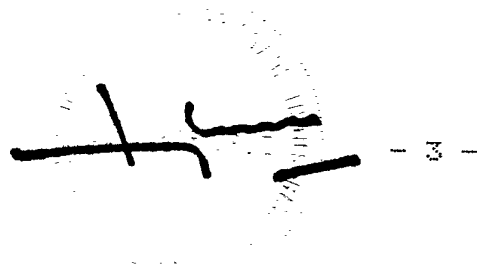
RESUMO

O presente diz respeito a um método de modificação de toxina PE₄₀ através da remoção de pelo menos dois dos seus quatro resíduos de amino ácidos de cisteína e formação de moléculas híbridas, que contêm PE₄₀ modificado ligado a TGE-alfa. Descobriu-se que estas moléculas híbridas têm utilidade na morte de células cancerosas da bexiga.

Mais concretamente o invento diz respeito a um método para o tratamento de células cancerosas da bexiga, que consiste no contacto das células cancerosas da bexiga com uma quantidade de uma proteína híbrida, que compreende um agente que tem por

alvo as células seleccionado a partir de um membro da família EGF de hormonas peptídicas que se liga ao receptor de EGF das células do tumor da bexiga, e uma toxina de célula seleccionada a partir dos membros da classe da ribosilação de ADF de venenos de células de mamíferos, sendo a quantidade de proteína híbrida eficaz para matar as células concerosas da bexiga.

É também referido o processo para a preparação de composições utilizadas no método anteriormente referido.

 - 3 -

APLICAÇÕES RELACIONADAS

Esta aplicação de patente é uma continuação em parte da aplicação da patente com o no. de série 07/542.281, datada de Junho 21, 1990.

ANTECEDENTES DO INVENTO

A quimioterapia de cancro tradicional depende da capacidade que as drogas têm de matar as células do tumor, em pacientes com cancro. Infelizmente, estas mesmas drogas frequentemente matam células normais, assim como as células do tumor. O alcance que uma droga de cancro tem de matar células do tumor em vez de células normais, é uma indicação do grau de selectividade do composto para as células do tumor. Um método para aumentar a selectividade das drogas de cancro em relação às células do tumor é a distribuição das drogas preferencialmente às células do tumor, enquanto que evitam as populações de células normais. Um outro termo para a distribuição selectiva de agentes quimioterapêuticos a populações específicas de células é o "alvo". Drogas alvo para células de tumor podem ser conseguidas em vários dias. Um método engloba a presença de moléculas de receptor específicas encontradas na superfície das células do tumor. Outras moléculas, referidas como "agentes alvo", podem reconhecer e ligarem-se a esses receptores de superfície das células. Estes "agentes alvo" incluem, e.g., anti-corpos, factores de crescimento, ou hormonas. "Agentes alvo" que reconhecem e se ligam aos receptores de superfície das células específicas, são referidos como o alvo das células que possuem aqueles receptores. Por exemplo, células do tumor da bexiga possuem uma proteína nas suas superfícies chamada

receptor do factor de crescimento epidérmico. Factor-alfa de transformação do crescimento (TGF-alfa) reconhece e liga-se ao receptor EGF nas células do tumor da bexiga. TGF-alfa é por conseguinte, um "agente alvo" para estas células de tumor.

"Agentes alvo" por eles próprios não matam as células do tumor. Outras moléculas que incluem venenos celulares ou toxinas podem ser ligadas aos "agentes alvo" de modo a criar moléculas híbridas que possuem ambas células alvo de tumor e toxinas celulares dominantes. Estas moléculas híbridas actuam como venenos selectivos de células de tumor, devido às suas capacidades para alvejar as células do tumor e depois matar aquelas células por via do seu componente de toxina. Alguns dos venenos celulares mais potentes usados na construção destas moléculas híbridas são toxinas bacterianas, que inibem a síntese de proteína em células de mamíferos. Exotoxina A de pseudomonas é uma destas destas toxinas bacterianas, e tem sido usada para a construção de moléculas "alvo-toxina" híbridas (Patente dos E.U. 4.545.985).

Exotoxina A de pseudomonas intoxica células de mamíferos por, em primeiro lugar, ligação à superfície das células, depois entram no citoplasma das células e inactivam o factor de elongação 2, que é uma proteína celular necessária para a síntese de proteínas. Exotoxina A de pseudomonas tem sido usada para a construção de moléculas híbridas anti-cancerosas usando anti-corpos monoclonais e hormonas de proteínas. Contudo, um problema com estas moléculas híbridas é a exibição de toxicidade em relação às células normais. Pelo menos parte da toxicidade associada com as moléculas híbridas, que contêm exotoxina A de pseudomonas, é devido à capacidade da exotoxina A de pseudomonas por ela própria, de ligação a e de entrar em muitos tipos de células de mamíferos. Por conseguinte, as moléculas de híbridos formadas entre

exotoxina A de pseudomonas e os "agentes alvo" específicos podem-se ligar a muitas células normais, em adição às células que reconhecem com o "agente alvo". Um método de lidar com este problema é modificar as exotoxinas A de pseudomonas de modo que já não sejam capazes de ligação a células normais. Isto pode ser conseguido através da remoção daquela porção de molécula de pseudomonas de exotoxina A que é responsável por esta actividade de ligação. Uma forma truncada da molécula de pseudomonas de exotoxina A foi preparada, que retém a capacidade de inactivação do factor de elongação 2, mas já não é capaz de ligação a células de mamíferos. Esta molécula de exotoxina A de pseudomonas modificada é chamada exotoxina de pseudomonas - 40 ou PE₄₀ (Hwang, et al., Cell 48: 129 - 136 1987).

PE₄₀ tem sido ligado a várias moléculas alvo incluindo TGF - alfa (Chaudhary, et al., PNAS USA 84: 4533 - 4542 1987). No caso de TGF-alfa, moléculas híbridas que contêm PE₄₀ e TGF-alfa dominantes são capazes de ligação específica às células do tumor que possuem receptores EGF e que intoxicam estas células via inibição de síntese de proteína. De modo que, para que esta molécula híbrida eficientemente se ligue ao receptor EGF ela deve assumir a configuração apropriada. A ligação do receptor eficaz é também dependente em ter o "domínio alvo" apropriadamente exposto, de modo que seja acessível para ligação. Quando moléculas híbridas TGF-alfa e PE₄₀ são produzidas como uma função de proteína em bactérias usando técnicas de ADN recombinante, a maioria das moléculas híbridas exibem uma actividade de ligação ao receptor EGF, pobre.

DESCRIÇÃO DAS PUBLICAÇÕES

1. Patente dos E.U. 4.545.985 ensina que as exotoxinas A de pseudomonas podem ser quimicamente conjugadas a um anti-corpo ou ao factor de crescimento epidérmico. Enquanto que esta patente ainda ensina que estes conjugados podem ser usados para matar células de tumores humanos, estas toxinas quimicamente ligadas tem-se mostrado como tendo níveis indesejáveis, específicos de actividade.
2. Patente dos E.U. 4.664.911 ensina que anticorpos podem ser conjugados à cadeia A ou à cadeia B da ricina, que é uma toxina obtida a partir das plantas. A Patente 4.664.911 ainda ensina que estes conjugados podem ser usados para matar células de tumor humano.
3. Patente dos E.U. 4.675.382 ensina que hormonas como a hormona que estimula o melanócito (HEM) pode ser ligada a uma porção de proteína de toxina diptéria via ligação peptídica. A Patente 4.675.382 ainda ensina que os genes que codificam estas proteínas podem ser unidos em conjunto através de a síntese directa de uma proteína de função híbrida usando técnicas de ADN recombinante. Esta função protéica tem a capacidade de ligação de células que possuem receptores HEM.
4. Murphy. et al., PNAS USA 83: 8258 - 8262 1986, Construção genética, expressão, e melanomaselectividade de citotoxicidade de uma proteína de fusão hormonal que estimula o alfa-melanócito, relacionada com toxina diptéria. Este artigo ensina que uma proteína de função híbrida produzida em bactérias usando tecnologia de ADN recombinante e que consiste numa porção

de proteína de toxina diptéria junta a hormona de estimulação de alfa-melanócito, ligar-se-á e matará células de melanoma humano.

5. Allured. et al., PNAS 83: 1320 - 1324 1986, Estrutura de exotoxina A de Pseudomonas de aeruginosa a 3,0 Angstrom. Este artigo ensina a estrutura a três dimensões de proteína da exotoxina A de pseudomonas.

6. Hwang. et al., Cell 48: 129 - 136 1987, Domínio funcional de Exotoxina de Pseudomonas identificado por Análise Deletion do Gene expresso em E. coli. Este artigo ensina que a proteína de exotoxina A de pseudomonas pode ser dividida em três domínios funcionais distintos responsáveis por: ligação a células de mamíferos, translocação de membranas lisomonais ao longo da proteína de toxina, e ribolisação de ADP do factor de elongação 2 nas células de mamíferos. Este artigo ainda ensina que estes domínios funcionais correspondem a regiões distintas da proteína de exotoxina A de pseudomonas.

7. Chaudhary. et al., PNAS USA 84: 4538 - 4542 1987, Actividade de uma proteína de fusão recombinante entre o factor de transformação do crescimento tipo alfa e a toxina de Pseudomonas. Este artigo ensina que as proteínas de fusão híbrida formadas entre PE-40 e factor alfa de transformação do crescimento e produzida em bactérias usando técnicas de ADN recombinante, ligar-se-á e matará células de tumor humano que possuem receptores de crescimento epidérmico.

8. Aplicação da Patente Europeia 0 261 671 publicada em 30 Março 1988, ensina que uma porção de proteína de exotoxina A de pseudomonas, que tem falta da função de ligação celular em toda a proteína de exotoxina A de pseudomonas, mas possui a translocação e as funções de ribosilação de ADP em toda a

protéina de exotoxina A de pseudomonas, pode ser produzida. A porção que retém a translocação e as funções de ribosilação de ADP em toda a protéina de exotoxina A de pseudomonas é chamada exotoxina de pseudomonas - 40 ou PE-40. O PE-40 consiste nos resíduos de amino ácidos 252 - 613 de toda a protéina de exotoxina A de pseudomonas, como definido por Gray, et al., PNAS USA 81: 2645 - 2649 1984. Esta aplicação da patente ainda ensina que o PE-40 pode ser ligado ao factor-alfa de transformação do crescimento, para a formação de uma protéina de fusão híbrida produzida em bactérias, usando técnicas de ADN recombinante.

9. Kelley et al., PNAS USA 85: 3980 - 3984 1988, Protéina de fusão de toxina diftéria e de interleucina 2 pode abolir a imunidade induzida pela célula in vivo. Este artigo ensina que uma protéina de fusão híbrida produzida em bactérias usando tecnologia de ADN recombinante e que consiste numa porção de protéina de toxina diftéria, junta as funções da interleucina 2 em ratos, para a supressão de imunidade induzida pelas células.

10. Bailon, Biotechnology, pp. 1326 - 1329 Nov. 1988. Purificação e Caracterização Parcial da protéina de exotoxina de Pseudomonas e de Interleucina 2. Este artigo ensina que as proteínas de fusão híbridas formadas entre PE-40 e interleucina 2 e produzidas em bactérias usando técnicas de ADN recombinante ligar-se-ão a e matarão células humanas que possuem receptores de interleucina 2.

11. Edwards. et al., Mol. Cell. Biol. 9: 2860 - 2867 1989 descreve a preparação de moléculas híbridas TGE-alfa - PE₄₀ modificadas que têm sido encontradas como tendo utilidade no tratamento de células de tumor da bexiga.

12. Heimbrook, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4697 - 4701 1990 descreve a eficácia in vivo de TGF-alfa - PE₄₀ modificado em significativamente prolongar a sobrevivência de ratos, que contêm xenógrafos de células de tumores humanos.

OBJECTIVOS DO INVENTO

É um objectivo do presente invento fornecer modificações de PE₄₀ que permitam uma ligação eficiente das moléculas híbridas formadas a partir de TGF-alfa e PE₄₀ modificado a receptores celulares em células de tumor da bexiga, que reconheçam o "agente alvo" de TGF-alfa. É um outro objectivo deste invento fornecer um método para matar selectivamente células de tumor da bexiga. Um outro objectivo é fornecer uma molécula híbrida que aumente a potência entre TGF-alfa e as moléculas de PE₄₀ modificadas. Um outro objectivo do invento é fornecer composições farmacêuticas que contêm como ingrediente activo uma molécula híbrida que contém um domínio de PE₄₀ (ou região) em que o domínio de PE₄₀ foi modificado de modo a melhorar a proteína híbrida do receptor de crescimento epidérmico, em células de tumor da bexiga. Estes e outros objectivos do presente invento serão aparentes a partir da descrição seguinte.

SUMARIO DO INVENTO

O presente invento fornece uma molécula híbrida que compreende um domínio de PE₄₀ modificado ligado a um domínio alvo TGF-alfa. O domínio de PE₄₀ modificado melhora a actividade de ligação do receptor desta molécula de híbrido. A substituição de

outros amino ácidos neutros como, e.g., alanina, por exemplo resíduos de cisteína em PE_{40} , ou destruição de resíduos de cisteína, melhora a ligação de moléculas híbridas aos receptores reconhecidos pelo domínio alvo. As moléculas híbridas do presente invento ligam-se mais eficazmente aos receptores alvo em células de tumor humano, do que as moléculas híbridas que têm PE_{40} não modificado, e têm utilidade na morte de células de tumor da bexiga.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Moléculas híbridas formadas entre TGF-alfa e PE_{40} são caracterizadas por três sistemas de ensaio primários. Estes ensaios incluem: 1 - ribosilação de ADP do factor de elongação 2, que mede a actividade enzimática de TGF-alfa - PE_{40} , que inibe a síntese de proteína de células em mamíferos, 2 - inibição de EGF radiomarcado ligado ao receptor de EGF em membranas de vesículas de células A431, que mede a actividade de ligação do receptor de EGF de TGF-alfa - PE_{40} , e 3 - poliferação de células assim ensaiadas por converção de brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a formazano, que é usado na medição da sobrevivência de células de tumor seguido pela exposição de TGF-alfa - PE_{40} . Estes ensaios são realizados como previamente descrito (Dominic, et al., Infection and Immunity 16: 832 - 841 1977, Cohen, et al., J. Biol. Chem. 257: 1523 - 1531 1982, Riemen, et al., Peptides 8: 877 - 885 1987, Mosmann J. Immunol. Methods 65: 55 - 63 1983).

Para criar novas moléculas híbridas de TGF-alfa - PE_{40} com características de ligação de receptor superior, em primeiro lugar, produziu-se uma série de moléculas de ADN recombinante que

codificam ambos TGF-alfa - PE₄₀ ou versões especificamente modificadas de TGF-alfa - PE₄₀. O gene TGF-alfa - PE₄₀ original ou parenteral foi clonado molecularmente no vector plasmideo de expressão TAC (pTAC TGF57 - PE40) usando segmentos distintos de ADN clonado, como descrito no Exemplo 1. O clone pTAC TGF57 - PE40 foi usado como agente de partida para a construção de versões especificamente modificadas de TGF-alfa - PE₄₀ ADN. As modificações específicas de pTAC TGF57 - PE40 ADN que envolvem mutações em sítios específicos na sequência de código de ADN, necessitam da substituição de dois ou quatro codons de cisteína no domínio de PE₄₀ de pTAC TGF57 - PE40 ADN com codons para outros amino ácidos. Em alternativa, as mutações de sítios específicos podem ser realizadas de modo a remover dois ou quatro dos codons de cisteína, no domínio de PE40 de pTAC TGF57 - PE40. As mutações de sítios específicos em pTAC TGF57 - PE40 ADN foram construídas usando os métodos de Winter, *et al.*, Nature 299: 756 - 758 1982. Exemplos específicos de pTAC TGF57 - PE40 ADN mutados são apresentados no Exemplo 3. A sequência de amino ácidos da proteína híbrida codificada por pTAC TGF57 - PE40 ADN é apresentada no Quadro 3. Os quatro resíduos de cisteína no domínio de PE₄₀ de proteína híbrida TGF-alfa - PE₄₀ parenteral são designados por resíduos Cys²⁶⁵, Cys²⁸⁷, Cys³⁷² e Cys³⁷⁹ (quadro 3). Os resíduos de amino ácidos no domínio de PE₄₀ são numerados como definido em Gray, *et al.*, PNAS USA 81: 2645 - 2649 (1984). As proteínas híbridas TGF-alfa - PE₄₀ modificadas geradas a partir de pTAC TGF57 - PE40 ADN especificamente mutadas contêm substituições ou remoção de dois resíduos de PE₄₀ com N terminal [Cys²⁶⁵ e Cys²⁸⁷] ou dois resíduos com C terminal [Cys³⁷² e Cys³⁷⁹], ou ambos [Cys²⁶⁵, Cys²⁸⁷, Cys³⁷² e Cys³⁷⁹]. Para simplificar a nomenclatura para a descrição das proteínas híbridas modificadas produzidas a partir destes pTAC TGF57 - PE40 ADN mutados foram designados os resíduos de amino ácidos nas posições N terminal de locus "A" e os resíduos nas posições C terminal de

locus "B". Quando os resíduos de cisteína estão presentes nas duas posições de PE_{40} N terminal, como na molécula híbrida TGF-alfa - PE_{40} parenteral, o locus é capitalizado (i.e. "A"). Quando estas cisteínas estão substituídas com outros amino ácidos neutros como, por exemplo, glicina, alanina, fenilalanina, valina, leucina, isoleucina, tirosina, histidina, triptofano, serina, treonina ou metionina, ou remoção das posições N terminal, o locus é representado por um caso inferior "a". Identicamente, se os resíduos de amino ácido nas duas posições C terminal são cisteínas, o locus é representado por um caso superior "B", enquanto que um caso inferior "b" representa este locus quando os resíduos de amino ácido nestas posições estão substituídos com outros amino ácidos ou estão removidos. Assim quando todos os quatros resíduos de cisteína no domínio de PE_{40} de TGF-alfa - PE_{40} estão substituídos com alaninas, a proteína híbrida modificada é designada TGF-alfa - PE_{40} ab. De um modo similar a proteína híbrida TGF-alfa - PE_{40} parenteral com cisteínas nas posições de resíduo amino ácido 265, 287, 372 e 379 pode ser designada por TGF-alfa - PE_{40} AB.

Ambas proteínas TGF-alfa - PE_{40} AB e as proteínas híbridas TGF-alfa - PE_{40} modificadas são produzidas em E. coli usando o sistema de vector de expressão TAC, descrito por Linemeyer, *et al.*, Bio-Technology 5: 960 - 965 1987. As proteínas híbridas recombinantes produzidas nestas bactérias são colhidas e purificadas por dissolução de tecidos de bactérias em hidrocloreto de guanidina, seguido por adição de sulfureto de sódio e de tetracionato de sódio. Esta mistura reaccional sofre subsequentemente diálise e ureia é adicionada para solubilizar as proteínas que precipitaram da solução. A mistura é a seguir centrifugada para a remoção de proteínas e as proteínas TGF-alfa - PE_{40} híbridas recombinantes são separadas usando cromatografia de permuta iónica, seguido por cromatografia de exclusão

dimensional, seguido novamente uma vez por cromatografia de permuta iónica. As proteínas híbridas TGF-alfa - PE₄₀ purificadas são a seguir expostas a agentes de redução, como betamercapto-etanol, de modo a permitir a formação de ligações de dissulfureto na proteína híbrida entre pares de resíduos de cisteína. Finalmente, as proteínas híbridas refeitas são sujeitas a cromatografia de exclusão por dimensão e de permuta iónica para o isolamento de proteína TGF-alfa - PE₄₀ altamente pura. Para precisar detalhes, este esquema de purificação está descrito no Exemplo 4. Uma vez purificada e refeita a actividade biológica destas proteínas híbridas, podem ser caracterizadas usando os ensaios de ribosilação de ADP, ligação do receptor de EGF, e proliferação de células, como descrito acima.

Em alternativa, e preferencialmente, as proteínas híbridas TGF-alfa - PE₄₀ AB, TGF-alfa - PE₄₀ Ab, TGF-alfa - PE₄₀ aB e TGF-alfa - PE₄₀ ab são produzidas em bactérias transformadas. As bactérias são cultivadas e a pasta de células sofre dissolução de tecidos e é tratada, preferencialmente por centrifugação, para a remoção dos escombros e de proteínas indesejáveis. A proteína híbrida desejada depois é precipitada por adição de um sal de sulfato, preferencialmente (NH₄)₂SO₄, ao líquido sobrenadante. O precipitado é sulfitolizado, refeito por adição de excesso de β-mercaptop-etanol, concentrado e separado por cromatografia de permuta iónica e cromatografia de quelação metálica. Detalhes específicos estão descritos no Exemplo 5.

Uma utilidade importante de PE₄₀ modificado TGF-alfa situa-se na sua capacidade de ligação a e de matar células de tumor da bexiga humana. As proteínas anti-cancerosas descritas aqui, têm utilidade em matar células de cancro da bexiga e são usadas para este fim com a formação de uma solução ou suspensão num líquido fisiologicamente aceitável como, por exemplo, água

esterelizada, água para injeção, solução salina ou, preferencialmente, solução salina tamponizada ou solução salina tamponizada contendo uma proteína de suporte como, por exemplo, albumina de soro humano, e.g. solução salina tamponizada com fosfato ou PBS que contém albumina de soro humano. A solução ou suspensão contém desde cerca de 0,1 mg a cerca de 10 mg de proteína híbrida anti-cancerosa por 60 ml de líquido fisiologicamente aceitável. Mais preferencialmente, contém desde cerca de 0,5 mg a cerca de 5 mg por 60 ml, e mais preferencialmente, contém desde cerca de 2 mg a cerca de 4 mg por 60 ml de líquido fisiologicamente aceitável.

O método do presente invento consiste no contacto de células de cancro da bexiga com a solução ou suspensão que contém as proteínas anti-cancerosas descritas aqui, durante um período desde menos do que uma hora, por exemplo, cerca de 30 minutos, a um período de várias horas, por exemplo, até quatro horas, à temperatura ambiente. No caso de animais de laboratório a solução ou suspensão é administrada via um cateter trans-uretra.

Enquanto que a utilização de moléculas híbridas de PE₄₀ modificado TGF-alfa é descrita aqui e nos exemplos seguintes, deve ser entendido que o âmbito do presente invento inclui como agentes alvo TGF-alfa, EGF, outros membros da família EGF de hormonas peptídeas que se ligam ao receptor de EGF nas células de tumor da bexiga, factor de crescimento do virus fibroma Shope, e factor de crescimento do virus vaccinia e que a toxina à qual o agente alvo está acoplado também inclui PE₄₀, toxina diptéria, toxina de ricino ou outros membros da classe de ribosilação de ADP de venenos de células em mamíferos.

Os exemplos seguintes ilustram o presente invento sem, contudo, limitarem o mesmo. Todas as reacções enzimáticas que

necessitam de manipulações biológicas moleculares, a menos que de outro modo seja indicado, foram realizadas como descrito em Maniatis, et al. (1982) Em: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press.

Exemplo 1

Construção de clones de ADN recombinante que contém TGF-alfa - PE₄₀ ADN

O segmento de TGF-alfa ADN foi construído usando três partes de oligonucleotídeos sintéticos, como descrito por Defeo-Jones, et al., Molecular and Cellular Biology 8: 2999 - 3007 1988. Este gene TGF-alfa sintético foi clonado em pUC-19. ADN do clone pUC-19 que contém TGF-alfa humano recombinante, foi digerido com Sph I e Eco RI. A digestão gerou um fragmento 2.8 kb ADN que contém todas as porções pUC-19 e 5' de TGF-alfa. O fragmento 2.8 kb foi purificado e isolado por electroforese em gel. Uma Eco RI para a cassette de oligonucleotídeo de Sph I foi sintetizada. Esta cassette sintética tinha a sequência indicada a seguir:

5'-CGGACCTCCTGGCTGCGCATCTAGG-3'
3'-GTACGCCTGGAGGACCGACGCGTAGATCCTTAA-5'

Por conveniência, esta cassette de oligonucleotídeo foi nomeada por 57. A cassette 57 foi anelada e ligada a TGF-alfa que contém o fragmento 2.8 kb, formando um plasmídeo circularizado. Clones que continham a cassette foram identificados por hibridização à cassette radiomarcada 57 ADN. A presença de TGF-alfa humano foi confirmado pela sequência de ADN. A sequência também foi

confirmada pela presença de um sítio Fsp I novamente introduzido na extremidade 3' da sequência TGF-alfa. Este plasmídeo, nomeado por TGF-alfa - 57/pUC-19, foi digerido com Hind III e Fsp I que gerou um fragmento 168 bp que contém um gene TGF-alfa (TGF-alfa-57). Uma preparação em separado de pUC-19 foi digerida com Hind III e Eco RI que gerou um vector 2.68 kb pUC-19 ADN. O PE₄₀ ADN foi isolado do plasmídeo pVC 8 (Chaudhary, et al., PNAS USA 84: 4538 - 4542 1987). O pVC 8 foi digerido usando Nde I. Uma extremidade nivelada foi depois gerada neste ADN através da utilização de condições padrão da reacção de Klenow (Maniatis, et al., supra, p. 113). O ADN de extremidade nivelada foi depois sujeito a uma segunda digestão com Eco RI para gerar um fragmento 1.3 kb Eco RI a Nde I (com extremidade nivelada) que contém PE₄₀. O TGF-alfa-57 Hind III ao fragmento Fsp I (168 bp) foi ligado ao vector 2.68 kb pUC-19. Seguindo a incubação durante a noite, o fragmento 1.3 kb Eco RI a Nde I (com extremidade nivelada) PE₄₀ ADN foi adicionado à mistura de ligação. Este segundo produto de ligação foi depois usado para a transformação de células JM 109. Clones contendo TGF-alfa-57 PE₄₀ em pUC-19 foram identificados por hibridização a TGF-alfa-57 PE₄₀ ADN radiomarcado e o ADN deste clone foi isolado. O TGF-alfa-57 PE₄₀ foi removido a partir do vector pUC-19 e transferido para um sistema de vector TAC descrito por Linemeyer, et al., Bio-Technology 5: 960 - 965 1987). O TGF-alfa-57 PE₄₀ em pUC-19 foi digerido com Hind III e com Eco RI para gerar um fragmento 1.5 kb que contém TGF-alfa-57 PE₄₀. Uma extremidade nivelada foi gerada neste fragmento de ADN usando condições reaccionais padrão Klenow (Maniatis, et al., loc. cit.). O vector TAC foi digerido com Hind III e com Eco RI. Uma extremidade nivelada foi gerada no vector TAC digerido de ADN usando condições reaccionais padrão Klenow (Maniatis, et al., loc. cit.). O vector de extremidade nivelada 2.7 kb foi isolado usando electroforese em gel. O fragmento TGF-alfa-57 PE₄₀ de extremidade nivelada foi depois ligado ao vector TAC de

extremidade nivelada. O plasmídeo gerado por esta ligação foi usado para a transformação de células JM 109. Clones candidatos que contêm TGF-alfa-57 PE₄₀ foram identificados por hibridização como indicado acima e sequenciados. O clone contendo a construção desejada foi nomeado por pTAC TGF57- PE40. O plasmídeo gerado por estas manipulações está descrito no Quadro 1. A sequência nucleofílica de codons de amino ácido de proteína fundida TGF-alfa - PE₄₀ codificada em pTAC TGF-57-PE40 ADN está descrita no Quadro 2. A sequência de amino ácido codificada pelo gene TGF-57-PE40 está indicada no Quadro 3.

Exemplo 2

Construção de Versões Modificadas de TGF-alfa - PR₄₀ recombinante que contém clones de ADN: Substituição de Alaninas por Cisteínas

TGF-alfa - PE₄₀ aB:

O clone pTAC TGF57-PE40 foi digerido com SphI e BamHI e o fragmento 748 bp SphI-BamHI (especificando os amino ácido com C terminal de TGF-alfa, o amino ácido 4 ligante e os amino ácidos 240 com N terminal de PE₄₀) foi isolado. O vector M13 mp19 de ADN foi cortado com SphI e BamHI e o vector de ADN foi isolado. O fragmento 748 bp SphI-BamHI TGF-alfa - PE₄₀ foi ligado ao vector M13 de ADN durante a noite aos 15°C. Células hospedeiras bacterianas foram transformadas com esta mistura de ligação, clones candidatos foram isolados e o seu plasmídeo de ADN foi sequenciado para assegurar que estes clones continham os ADNs recombinantes apropriados. ADN de cadeia simples foi preparado para mutagenese.

Um oligonucleotídeo (oligo #132) foi sintetizado e usado na mutagênese directa em sítio para a introdução de um sítio HpaI em TGF-alfa - PE₄₀ de ADN na posição 272 no amino ácido de PE₄₀:

5' CTGGAGCGTTAACCCGTC 3' (oligo #132)

Uma consequência desta mutagênese directa em sítio foi a conversão do resíduo número 272 em PE₄₀ a partir de fenilalanina a leucina. A mutagênese foi realizada como descrito por Winter *et al.*, Nature, 299: 756 - 758 1982.

Um clone candidato que contém um sítio HpaI criado agora foi isolado e sequenciado para avaliar a presença de sequência genética mutada. Este clone foi depois cortado com SphI e SalI. Um fragmento 198 bp especificando o amino ácido 5 com C terminal de TGF-alfa e os amino ácidos 61 com N terminal de PE₄₀ e contendo o sítio HpaI introduzido agora foi isolado e subclonado novamente no plasmídeo pTAC TGF57 - PE₄₀ nos sítios SphI-SphI. Células hospedeiras bacterianas foram transformadas, um clone candidato foi isolado e o seu plasmídeo de ADN foi sequenciado para assegurar que este clone continha o ADN recombinante apropriado. Por conveniência este clone foi nomeado por pTAC TGF57 - PE₄₀-132. pTAC TGF57-PE₄₀-132 foi digerido com SphI e HpaI e um fragmento 3.96 Kb de ADN foi isolado. Uma cassette de oligonucleotídeo sintético (oligo #153) que contém os amino ácidos 5 com C terminal de TGF-alfa e os amino ácidos 32 com N terminal de PE₄₀ e que contém extremidades compatíveis SphI e HpaI foi sintetizado e ligado a pTAC TGF57-PE₄₀-132 digerido:

5' CCGACCTCCTG6CCATG6CCGAAAGAG6GCG6CAGCCTG6CCGCTGACC6C6CA
3' GTAC6CCTG6ACC6GTACC6GCTTCTCCC6CCGTC6GACC6GCG6CACTG6C6C6T

CCAG6CTG6CACACCTG6CCGT6GAGAC6TT 3'
GGTCCGAC6TGT6GAC6GCGACCTCTGAA 5' (oligo #153)

Esta cassette de oligonucleotídeo incorpora uma variação no TGF-alfa - PE₄₀ ADN de modo que o codon que especifica a alanina no resíduo 51 foi eliminado e o codon que especifica cisteína no resíduo 264 de PE₄₀ agora especifica alanina. Por conveniência, este plasmídeo de ADN foi chamado pTAC TGF57-PE40-132,153. Células hospedeiras bacterianas foram transformadas com pTAC TGF57-PE40-132,153 ADN. Clones candidatos foram identificados por hibridação e o seu plasmídeo de ADN foi sequenciado para assegurar que continha o ADN recombinante apropriado.

pTAC TGF57-PE40-132,153 ADN foi digerido com HpaI e SalI e um vector 3.95 kb de ADN foi isolado. Uma cassette de oligonucleotídeo sintético (oligo #142) que contém os resíduos de amino ácido 272 a 309 de PE₄₀ e contém extremidades HpaI e SalI compatíveis foi sintetizado e ligado a 3.95 Kb pTAC TGF/PE40 132,153 de ADN.

5' AACCCGTCATCGCCAGCCGCGCG6CTG6GAAACAACCTGGAGCAG6CTG6CTATCCG6T6C
3' TT6G6CAGTAGCG6TCG6GCGCGCCGACCCTT6TTGACCTCGTCCGACCGATAG6CCACG

AGCG6CTG6TCGCCCTCTACCTG6CG6GCG6GCTGTCGTG6GAACCA6G 3'
TCGCCGACCAGCG6GAGATGGACC6CCGCGCCGACAGCACCTT6GTCCAGCT 5' (oligo #
142)

Esta cassette de oligonucleotídeo modificou o codon específico da cisteína no resíduo 287 de modo que este codon

especifica agora alanina. Por conveniência este plasmídeo de ADN mutado foi chamado pTAC TGF57- PE40-132,153,142. Células hospedeiras bacterianas foram transformadas com este plasmídeo e clones candidatos foram identificados por hibridação. Estes clones foram isolados e o seu plasmídeo de ADN foi sequenciado para assegurar que continha o ADN recombinante apropriado. O plasmídeo pTAC TGF57-PE40-132,153,142 codifica a variante TGF-alfa - PE₄₀ de cisteínas com N terminal no locus "A" substituídas por alaninas. Por conseguinte, seguindo a nomenclatura descrita previamente esta versão modificada de TGF-alfa - PE₄₀ é chamada TGF-alfa - PE₄₀ aB. A sequência de amino ácido codificada pelo gene TGF-alfa - PE₄₀ aB é indicado no Quadro 4.

TGF-alfa - PE₄₀ Ab:

O clone pTAC TGF57-PE40 foi digerido com SphI e BamHI e o fragmento 748 bp SphI-BamHI (especificando os amino ácidos 4 com C terminal do amino ácido 4 ligante TGF-alfa e os amino ácidos 240 com N terminal de PE₄₀) foi isolado. O vector M13 mp19 de ADN foi cortado com SphI e BamHI e o vector de ADN foi isolado. O fragmento 748 bp SphI-BamHI TGF-alfa - PE₄₀ foi ligado ao vector M13 de ADN durante a noite aos 15°C. Células hospedeiras bacterianas foram transformadas com esta mistura de ligação, clones candidatos foram isolados e o seu plasmídeo de ADN foi sequenciado para assegurar que estes clones continham os ADNs recombinantes apropriados. ADNs de cadeia simples foram preparados por mutagénise.

Um oligonucleotídeo (oligo #133) foi sintetizado e usado em mutagénise directa em sítio para a introdução de um sítio BstEII em TGF-alfa - PE₄₀ ADN na posição do amino ácido 369 de PE₄₀:

5' GACGTGGTGACCCTGAC 3' (oligo #133)

Uma consequência desta mutagênese foi a conversão do resíduo de serina na posição 369 de PE₄₀ a uma treonina.

Um clone de ADN que contém um sítio Bst⁺II criado agora foi identificado, isolado e sequenciado para assegurar a presença do ADN recombinante apropriado. Este clone foi a seguir digerido com enzimas de restrição ApaI e SalI. Um fragmento de 120 bp inserido em ADN que contém o sítio Bst⁺II agora criado foi isolado e ligado a pTAC TGF57- PE₄₀, que também foi digerido com ApaI e SalI. Células hospedeiras bacterianas foram transformadas, e um clone candidato foi isolado e sequenciado para assegurar que o ADN recombinante apropriado estava presente. Este plasmídeo de ADN agora criado foi chamado pTAC TGF57-PE40-133. Foi digerido com Bst⁺II e ApaI e o fragmento do vector 2.65 Kb de ADN foi isolado.

Uma cassette de oligonucleotídeo Bst⁺II a ApaI (oligo #155) foi sintetizada que continha a região de TGF-alfa - PE₄₀ foi apagada do clone pTAC TGF57-PE40-133, digerida com enzimas de restrição Bst⁺II e ApaI. Esta cassette também especificava a sequência nucleotídica para as extremidades compatíveis Bst⁺II e ApaI.

5' GTGACCCTGACC6CGCCGGTCGCCGCCGGTGAAGCTGCGGGCC 3'
3' GGAATGGCGCGGCCAGCGGGCGGCCACTTCGACGC 5' (oligo #155)

Esta cassette oligonucleotídica mudou os codons da cisteína nos resíduos 372 e 379 de PE₄₀ para os codons que especificam alaninas. Cassete oligonucleotídica #155 foi ligada ao fragmento do vector 2.65 Kb de ADN. Células hospedeiras bacterianas foram transformadas e os clones candidatos foram

isolados e sequenciados para assegurar que o ADN recombinante apropriado estava presente. Este clone de ADN agora criado foi chamado pTAC TGF57-PE40-133,155. Isto codifica a variante TGF-alfa - PE₄₀ com ambas cisteínas no locus "B" substituídas por alaninas. Por conseguinte, seguindo a nomenclatura descrita previamente esta versão modificada de TGF-alfa - PE₄₀ é chamada TGF-alfa - PE₄₀ Ab. A sequência de amino ácido codificada pelo gene TGF-alfa - PE₄₀ Ab está indicada no Quadro 5.

TGF-alfa - PE₄₀ ab:

O plasmídeo pTAC-TGF57-PE40-132,153,142 que codifica TGF-alfa - PE₄₀ ab foi digerido com Sall e Apal e o fragmento de ADN do vector 3.8.Kb foi isolado. O plasmídeo pTAC TGF57-PE40-133,155 que codifica TGF-alfa - PE₄₀ foi também digerido com Sall e Apal e o fragmento de ADN 140 bp que contém as variações de cisteína e alanina nos resíduos de amino ácidos 372 e 379 de PE₄₀ foi isolado. Estes dois ADNs foram ligados em conjunto e usados para a transformação de células hospedeiras bacterianas. Clones candidatos foram identificados por hibridação com um 140 bp ADN radiomarcado a partir de pTAC TGF57-PE40-133,155. Plasmídeo de ADN dos clones candidatos foi isolado e sequenciado para assegurar a presença do ADN recombinante apropriado. Este clone de ADN agora criado foi chamado pTAC TGF57-PE40-132,153,142,133,-155. Este plasmídeo codifica a variante TGF-alfa - PE₄₀ com todas as quatro cisteínas no loci "A" e "B" substituídas por alaninas. Por conseguinte, seguindo a nomenclatura descrita previamente, esta versão de TGF-alfa - PE₄₀ é chamada TGF-alfa - PE₄₀ ab. A sequência de amino ácido codificada pelo gene TGF-alfa - PE₄₀ ab está indicada no Quadro 6.

Exemplo 3

Construção de versões modificadas de TGF-alfa - PE₄₀ recombinante que contém clones de ADN: Remoção dos resíduos de cisteína

TGF-alfa - PE₄₀ aB, TGF-alfa - PE₄₀ Ab, e TGF-alfa - PE₄₀ ab podem ser também construídos por remoção dos resíduos de cisteína no locus "A" e/ou locus "B". A construção destas versões de TGF-alfa-PE₄₀ foi conseguida identicamente como descrito no Exemplo 3 à excepção de que: para o oligonucleotídeo TGF-alfa - PE₄₀ aB, a cassette é modificada de tal modo que o codon de alanina pretendida para a posição 265 é removida e a cassette oligonucleotídica 142 é modificada de tal modo que o codon de alanina pretendida para a posição 287 é removida. Para o oligonucleotídeo TGF-alfa-PE₄₀ Ab, a cassette 155 é modificada de tal modo que os codons de alanina pretendidos para o resíduo 372 e 379 são removidos. Para TGF-alfa-PE₄₀ ab os fragmentos de ADN usados para a construção deste gene recombinante são retirados do gene TGF-alfa-PE₄₀ aB e do gene TGF-alfa-PE₄₀ Ab descritos neste exemplo.

Exemplo 4

Produção e isolamento de proteínas de fusão TGF-alfa - PE₄₀ recombinante

Produção da proteína de fusão

Células de E. coli JM-109 foram cultivadas em frascos de agitação de 1 L em 500 ml de sopa LB, na presença de 100 mg/ml de ampicilina aos 37°C. Depois do valor de absorvância espectrofotométrica A₆₀₀ ter atingido 0,6, B-D-tio-galactopiranosido de isopropilo foi adicionado até uma concentração final de 1 mM. Depois de 2 horas, as células foram colhidas por centrifugação.

S-Sulfonação da proteína de fusão

As células sofreram dissolução dos tecidos em hidrocloreto de guanidina a 8 M, Tris 50 mM de pH 8, EDTA 1 mM por agitação à temperatura ambiente, durante 2 horas. A mistura dos tecidos dissolvidos foi levada a sulfureto de sódio 0,4 M e a tetracionato de sódio 0,1 M por adição de reagentes sólidos e o pH foi ajustado a 9,0 com NaOH. A reação foi deixada à temperatura ambiente durante 16 horas.

Preparação para cromatografia

A solução de proteína sofreu diálise contra um volume em excesso de 10.000 vezes de EDTA 1 mM, aos 4°C. A mistura foi depois levada a ureia 6M, Tris 50 mM de pH 8,0, NaCl 50 mM à temperatura ambiente e agitada durante 2 horas. Qualquer material não dissolvido foi removido por centrifugação a 32.000 x g durante 30 minutos.

Cromatografia DEAE F.F. Sepharose

O sobrenadante límpido do passo anterior foi aplicado a uma coluna 26 x 40 cm DEAE Fast Flow (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) equilibrada com ureia 6M, Tris 50 mM a pH 8,0, NaCl 50 mM a uma velocidade de refluxo de 1 ml/minuto. A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio até que os materiais não absorvidos foram removidos como evidenciado por uma absorvância espectrofotométrica de UV 280 inferior a 0,1 no tampão de equilíbrio, como existe a coluna. A proteína de fusão absorvida foi eluída da coluna com uns 1000 ml de um gradiente de NaCl 50 - 350 mM e depois com concentrador Amicon de célula agitado, adaptado com uma membrana YM-30.

Sephacryl S-300

A proteína de fusão concentrada (8 ml) foi aplicada a uma coluna 2,6 x 100 cm Sephacryl S-300 (Pharmacia LKB

Biotechnology Inc.) equilibrada com ureia 6M, Tris 50 mM a pH 8,0, NaCl 50 mM a uma velocidade de fluxo de 0,25 ml/minuto. A coluna foi eluída com tampão de equilíbrio adicional e 3 ml de fracções recolhidas. Fracções contendo actividade de TGF-alfa- PE_{40} foram juntas.

Cromatografia Q-sepharose

As fracções juntas obtidas da coluna S-300 foram aplicadas a uma coluna 1,6 x 40 cm Q-Sepharose (Pharmacia LKB Biotechnology, Inc.) equilibrada com ureia 6M, Tris 50 mM a pH 8,0, NaCl 50 mM a uma velocidade de fluxo de 0,7 ml/minuto. A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio e depois eluída com um 600 ml de um gradiente de NaCl 50 - 450 mM. As fracções contendo a actividade de TGF-alfa - PE_{40} foram juntas e depois sofreram diálise contra glicina 50 mM a pH 9,0 e armazenadas a -20°C.

Refazer da proteína

Uma amostra de proteína foi aquecida e diluída a uma absorvância espectrofotométrica a UV A280 = 0,1 em glicina 50 mM a pH 10,5. Beta-mercaptoetanol foi adicionado para originar uma razão molar 4:1 do número teórico de grupos S-sulfonados presentes na amostra de proteína. A reacção foi deixada decorrer durante 16 horas aos 4°C, depois dos quais a solução sofreu diálise contra um excesso de 10.000 vezes de solução salina fisiologicamente tamponizada e foi armazenada aos -20°C.

Exemplo 5

Produção e Isolamento de Proteínas de Fusão TGF-alfa - PE₄₀ Recombinante

E. coli da estirpe JM-109, que contém o plasmídeo TGF-alfa - PE₄₀ apropriado, foi cultivado aos 37°C em meio complexo (Bauer, et al., *Biotechnology e Bioengineering* 16 933-41 (1974)) com antibiótico a 100 mg/ml. A expressão TGF-PE₄₀ foi induzida após adição de isopropiltiogalactosídeo 1 mM, depois a cultura atingiu uma absorvância a 600 nm de 2,5. A cultura foi colhida por filtração de fluxo cruzado seguido por um período de indução de nove horas, e foi congelada aos -70°C.

A pasta de células foi aquecida em gelo em 4 volumes de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, para a formação de uma suspensão que passou através de 4 camadas de tecido poroso e depois duas vezes através de uma prensa Martin-Guilin aos 9.000 psi. A suspensão filtrada foi centrifugada num rotor Sorvall GS-3 a 9000 rpm (13.000 x g) durante 30 minutos para a remoção de escombros. Solução de sulfato de amônio saturado foi adicionado ao líquido sobrenadante gota a gota com agitação até 20 % de saturação (250 ml/L) à temperatura ambiente. A suspensão foi agitada aos 4°C durante 0,5 - 1 hora e depois foi centrifugada no rotor GS-3 a 9000 rpm (13.000 x g) durante 20 minutos.

Sulfato de amônio saturado foi adicionado ao líquido sobrenadante com agitação até uma concentração de 35 % (230 ml/l de sobrenadante). O sulfato de amônio contendo a solução foi agitado aos 4°C durante 0,5 - 1 hora e depois centrifugado como anteriormente. O pelete foi resuspenso em fosfato de sódio 50 mM,

NH_4SO_4 a 50 %, pH 7,5 a 1/4 do volume de partida, agitado como anteriormente e centrifugado no Sorvall SA-600 a 5.000 rpm (3.600 x g) durante 15 minutos, em tubos de polipropileno. O sobrenadante líquido foi descarregado e o pelete ressuspenso a 10 mg de proteína/ml em Tris 50 mM, guadinina-HCl 6M, pH 9,0 à temperatura ambiente.

Na_2SO_3 foi adicionado até uma concentração de 0,4 M e $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ foi adicionado até uma concentração de 0,1 M. O pH foi verificado; se não for 9,0, um ajustamento apropriado é feito com HCl ou NaOH. Depois de agitação durante a noite à temperatura ambiente, a proteína sulfitolizada sofreu diálise exaustiva contra Gly-Cl 50 mM, pH 9,0 aos 4°C.

A proteína foi depois diluída a 0,1 mg/ml em Gly-Cl 50 mM, pH 10,5 e um excesso molar de 40 vezes de β -mercaptoetanol (87 mM de β -Me a 0,1 mg/ml) foi adicionado. A mistura foi agitada aos 4°C durante cerca de 15 horas, e a proteína reconstruída sofreu diálise durante cerca de 15 horas aos 4°C contra Tris-Cl 20 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0. A proteína foi depois carregar uma coluna de Q-Sepharose pré-equilibrada em Tris-Cl 20 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0 aos 4°C, usando cerca de 0,3 ml de resina/mg de proteína e eluição com um gradiente linear sal de NaCl desde 50 mM a 500 mM em Tris-Cl 20 mM, pH 8,0 (dimensão do gradiente = 6 - 10 volumes de coluna).

As fracções da coluna foram analisadas e juntas por absorção de UV A_{280} , electroforese de gel e por manchas Western. Uma coluna de quelação metálica foi preparada por tratamento de quelação Sepharose 4B com CuSO_4 usando 0,3 a 1 ml de resina/mg de proteína. A coluna foi equilibrada com Tris-acetato 50 mM, NaCl 1M, pH 7,0. Para assegurar que nenhum Cu^{+2} foi eluido, uma

segunda coluna livre de metal de quelação de Sepharose 4B foi instalada na descarga da coluna de carga de Cu^{+2} .

A amostra de Q-Sepharose junta foi diluída 1:2 em Tris-acetato 50 mM, NaCl 1M, pH 7,0, e foi carregar a coluna de quelação metálica à temperatura ambiente. A coluna foi lavada com um volume de coluna de tampão de equilíbrio, e a proteína foi eluída com um gradiente linear de imidazole desde 0 a 70 mM, mantendo o pH 7,0, no tampão de equilíbrio (dimensão do gradiente 10 a 40 volumes de coluna).

As fracções de coluna foram analisadas e juntas por absorção UV A_{280} , electroforese gel e por manchas Western.

Exemplo 6

Dito linhas de células de carcinoma da bexiga humana foram obtidas em American Type Culture Collection (ATCC) em ampolas congeladas. Elas foram imediatamente cultivadas e passadas através de monocamadas de acordo com as instruções fornecidas por ATCC. Depois de caracterização da velocidade de crescimento de cada linha de células, as células foram colocadas em pratos de 96 de fundo com a diluição apropriada para a formação de camadas sub-confluentes em fundos controlados no fim do ensaio. No dia seguinte estas culturas sub-confluentes, que mantinham ou um meio MEM-a livre de soro, PRMI 1640 ou um meio McCoy 5A, foram utilizadas num ensaio de morte de células padrão (Mosmann, J. Immunol. Methods 65: 55 - 63, 1983; Edwards et al., Mol. Cell. Biol. 9: 2860 - 2867). Cada linha de células foram semeadas em pratos de 96 de fundo a 10.000 células viáveis por fundo. Vinte e quatro horas depois, as células foram lavadas e colocadas em meio livre

de soro que contém o composto teste sob estudo. Quarenta e oito horas depois, o número de células sobreviventes foi quantificado por utilização de ensaio de MTT [brometo de 3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] como descrito por Mosmann, supra. A actividade da toxina contra cada linha de células foi ensaiada, e os dados estão sumarizados no quadro seguinte, com actividade contra células A431 (carcinoma vulva) apresentadas para comparação.

Actividade de TGF-alfa-PE40 (EX 5) contra Linhas de Células de Carcinoma da Bexiga Humana

<u>Linha de Células</u>	<u>CE₅₀ (pM)*</u>
J-B2	130
RT-4	180
5637	180
SCaBER	230
UMUC-3	830
T-24	840
TCCSUP	7.000
HT1197	11.000
A431	79

* concentração (picomoles/litro) que reduz o número de células que sobrevivem depois de 48 horas a 50 % do número de células de controle.

Exemplo 7

Comparação de Várias Linhas de Células de Cancro Contra
TGF-alfa - PE₄₀ AB, TGF-alfa - PE₄₀ ab do EX. 4 e TGF-alfa - PE₄₀
ab do EX. 5

CE₅₀s [pM]

AB (EX.4) (EX.5)

Células Esquamousas

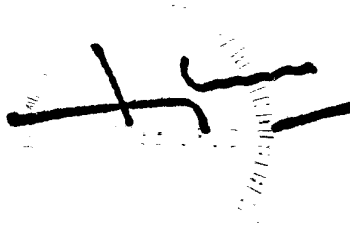
A-431	39	378	163
A-431	146	355	161
A-431	94	314	183
A-431	77	297	207
HeLa	8356	310088	3988
SCC-4	227	861	445
SCC-9	443	647	218
SCC-15	106	392	193
SCC-25	39	147	67

Glioblastoma

U138MG	20889	>316nM	216609
U373MG	>316nM	>316nM	204064

Adenocarcinoma do Peito

MDA-MB-468	78	527	253
BT-20	58	207	94

 - 32 -

MCF-7

>316nM

>316nM

>316nM

Adenocarcinoma do Colon

HT-29

7605

786

669

Linhas de Celulas Normais

CHO

>316nM

>316nM

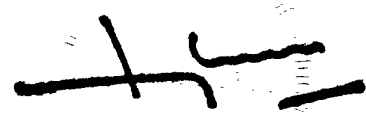
>316nM

NR-6

>316nM

>316nM

>316nM



Quadro 2

ATGGCTGCAGCAGTGGTGTCCCATTTTAATGACTGCCCAGATTCCDACACTCAGTTCTGCTTCC-
ATGGAACATGCAGGTTTTTGGTGCAGGAGGACAAAGCCGGCATGTGTCTGCCATTCTGGGTACGT-
TGGTGCBCGCTGTGAGCATGCGGACCTCCTGGCTATGGCCGAAGAGGGCCGGCAGCCTGGCCGCC-
TGACCGCGCACCAAGGCTTGCTTGCCACCTGCCGCTGGAGACTTTACCCGTCATCGCCAGCCGC-
GCGGCTGGGAACAACCTGGAGCAGTGCGGCTATCCGGTGCAGCGGCTGGTCCGCTCTACCTGGC-
GGCGCGGCTGTCTGGAACCAAGGTGACCAAGGTGATCCGCAACGCCCTGGCCAGCCCCGGCAGC-
GGCGGCGACCTGGGCGAAGCGATCCGCGAGCAGCCGGAGCAGGGCCGCTGTGGCCCTGACCCCTGG-
CCGCCGCCGAGAGGGCAGCGCTTCGTCCGGCAGGGCACCGGCAACGACGAGGGCCGGCGCGGCCAA-
CGCCGACGTGGTGAAGCTGACCTGCCCGGTGCGCCGCGGTGAATGCGCGGGGCCCGGCGGACAGC-
GGCGACGCGCTGTGGAGCGCAACTATCCCACTGGCGCGGAGTTCTCGGGCAGCGGCGGCGAGC-
TCAGCTTCAGCACCDCGCGGACGCAAGTGGACGGTGGAGCGGCTGTCTCCAGGCGCACCGCCA-
ACTGGAGGAGCGCGGCTATGTGTCTCGGCTACCAAGGACCTTCCTCGAAGCGGCGCAAGC-
ATCGTCTTCGGCGGGGTGCGCGCGCGCAGCCAGGACCTCGACGCGATCTGGCGCGGTTTTCTATA-
TCGCCGGCGATCCGGCGCTGGCCTACGGCTACGCCCAGGACCAAGGAACCCGACGACGCGGGCCG-
GATCCGCAACGGTGGCCCTGTGCGGGTCTATGTGCCGCGCTCGAGCCTGGCGGGCTTCTACCGC-
ACCAAGCTGACCCCTGGCCGCGCCGGAGGGCGGCGGGCGAGGTGGAACGGCTGATCGGCCATCCGC-
TGCCGCTGCGCTGGACGCCATCACCGGCCCGAGGAGGAAGGCGGGCGGCTGGAGACCATTTCT-
CGGCTGGCCGCTGGCCGAGCGCACCGTGGTGAATCCCTCGGCGATCCCCACCGACCCGCGCAAC-
GTCGGCGGCGACCTCGACCCGTCCAGCATCCCCGACAAGGAACAGGCGATCAGCGCCCTGCCGG-
ACTACGCCAGCCAGCCCGGCAAAACCGCCGCGCGAGGACCTGAAGTAA

QUADRO 3

Sequência de amino ácidos de TGF-alfa-PE₄₀

-4	-3	-2	-1'TGFa ¹		6
Met	Ala	Ala	Ala'Val	Val Ser His Phe Asn Asp Cys Pro Asp Ser His	
				16	
Thr	Gln	Phe	Cys		
				26	
Phe	His	Gly	Thr Cys Arg Phe Leu Val Gln Glu Asp Lys Pro Ala Cys		
				36	
Val	Cys	His	Ser		
				46	
				TGFa ⁵⁰ .	
Gly	Tyr	Val	Gly Ala Arg Cys Glu His Ala Asp Leu Leu Ala'Ala Met		
				PE ²⁵²	
Ala	Glu'	Glu	Gly		
				263	
Gly	Ser	Leu	Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu		
				273	
Glu	Thr	Phe	Thr		
				283	
Arg	His	Arg	Gln Pro Arg Gly trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr		
				293	
Pro	Val	Gln	Arg		
				303	
Leu	Val	Ala	Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp		
				313	
Gln	Val	Ile	Arg		
				323	
Asn	Ala	Leu	Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile		
				333	
Arg	Glu	Gln	Pro		



- 35 -

343

Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg
353

Phe Val Arg Gln

363

Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val Ser
373

Leu Thr Cys Pro

383

Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu
393

Leu Glu Arg Asn

403

Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe
413

Ser Thr Arg Gly

423

Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu
433

Glu Glu Arg Gly

443

Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser
453

Ile Val Phe Gly

463

Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe
473

Tyr Ile Ala Gly

483

Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala
493

Arg Gly Arg Ile

503

Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro
513

Gly Phe Tyr Arg

523

Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg
533

Leu Ile Gly His

543

Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly
553

Gly Arg Leu Glu

563

Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser
573

Ala Ile Pro Thr

583

Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp
593

Lys Glu Gln Ala

603

Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg
613

Glu Asp Leu Lys

QUADRO 4

Sequência de amino ácidos de TGF-alfa-PE₄₀-aB

-4 -3 -2 -1' TGFa¹ 6
Met Ala Ala Ala'Val Val Ser His Phe Asn Asp Cys Pro Asp Ser His
16
Thr Gln Phe Cys
26
Phe His Gly Thr Cys Arg Phe Leu Val Gln Glu Asp Lys Pro Ala Cys
36
Val Cys His Ser
46 TGFa⁵⁰.
Gly Tyr Val Gly Ala Arg Cys Glu His Ala Asp Leu Ala'Met Ala
PE²⁵²
Glu'Glu Gly Gly
264
Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Ala His Leu Pro Leu Glu
274
Thr Leu Thr Arg
284
His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Ala Gly Tyr Pro
294
Val Gln Arg Leu
304
Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln
314
Val Ile Arg Asn
324
Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg
334
Glu Gln Pro Glu

344

Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe
354

Val Arg Gln Gly

364

Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val Ser Leu
374

Thr Cys Pro Val

384

Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu
394

Glu Arg Asn Tyr

404

Pro Thr Glu Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser
414

Thr Arg Gly Thr

424

Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu
434

Glu Arg Gly Tyr

444

Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile
454

Val Phe Gly Gly

464

Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr
474

Ile Ala Gly Asp

484

Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg
494

Gly Arg Ile Arg

504

Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly
514

Phe Tyr Arg Thr

524

Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu
534

Ile Gly His Pro

544

Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly
554

Arg Leu Glu Thr

564

Ile Leu Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala
574

Ile Pro Thr Asp

584

Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys
594

Glu Gln Ala Ile

604

Ser Ala Leu Pro Asp Tyr AlaSer Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu
614

Asp Leu Lys

40 -

Quadro 5

Sequência de amino ácidos de TGF-alfa-PE₄₀ Ab

-4 -3 -2 -1 TGFa¹ 6
 Met Ala Ala Ala Val Val Ser His Phe Asn Asp Cys Pro Asp Ser His
 16
 Thr Gln Phe Cys
 26
 Phe His Gly Thr Cys Arg Phe Leu Val Gln Glu Asp Lys Pro Ala Cys
 36
 Val Cys His Ser
 47 TGFa⁵⁰
 Gly Tyr Val Gly Ala Arg Cys Glu His Ala Asp Leu Leu Ala Ala Met
 PE²⁵²
 Ala Glu Glu Gly
 263
 Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu
 273
 Glu Thr Phe Thr
 283
 Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr
 293
 Pro Val Gln Arg
 303
 Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp
 313
 Gln Val Ile Arg
 323
 Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile
 333
 Arg Glu Gln Por

343

Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala ALa ALa Glu Ser Glu Arg
353

Phe Val Arg Gln

363

Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val Thr
373

Leu Thr Ala Pro

383

Val Ala Ala Gly Glu Ala Ala Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp ALa Leu
393

Leu Glu Arg Asn

403

Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe
413

Ser Thr Arg Gly

423

Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu
433

Glu Glu Arg Gly

443

Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser
453

Ile Val Phe Gly

463

Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe
473

Tyr Ile Ala Gly

483

Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala
493

Arg Gly Arg Ile

503

Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro
513

Gly Phe Tyr Arg

523

Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg
533

Leu Ile Gly His

543

Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly
553

Gly Arg Leu Glu

563

Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser
573

Ala Ile Pro Thr

583

Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp
593

Lys Glu Gln Ala

603

Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg
613

Glu Asp Leu Lys

Quadro 6

Sequência de amino ácidos de TGF-alfa-PE₄₀ ab

-4	-3	-2	-1	TGFa ¹	6	
Met	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Ser His Phe Asn Asp Cys Pro Asp Ser His
					16	
Thr	Gln	Phe	Cys			
					26	
Phe	His	Gly	Thr	Cys	Arg	Phe Leu Val Gln Glu Asp Pro Lys Ala Cys
					36	
Val	Cys	His	Ser			
					46	TGFa ⁵⁰ .
Gly	Tyr	Val	Gly	Ala	Arg	Cys Glu His Ala Asp Leu Leu Ala Met Ala
					PE ²⁵²	
Glu	Glu	Gly	Gly			
					264	
Ser	Leu	Ala	Ala	Leu	Thr	Ala His Gln Ala Ala His Leu Pro Leu Glu
					274	
Thr	Leu	Thr	Arg			
					284	
His	Arg	Gln	Pro	Arg	Gly	Trp Glu Gln Leu Glu Gln Ala Gly Tyr Pro
					294	
Val	Gln	Arg	Leu			
					304	
Val	Ala	Leu	Tyr	Leu	Ala	Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln
					314	
Val	Ile	Arg	Asn			
					324	
Ala	Leu	Ala	Ser	Pro	Gly	Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg
					334	
Glu	Gln	Pro	Glu			

344

Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe
354

Val Arg Gln Gly

364

Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val Thr Leu
374

Thr Ala Pro Val

384

Ala Ala Gly Glu Ala Ala Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu
394

Glu Arg Asn Tyr

404

Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser
414

Thr Arg Gly Thr

424

Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu
434

Glu Arg Gly Tyr

444

Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile
454

Val Phe Gly Gly

464

Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr
474

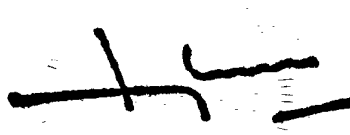
Ile Ala Gly Asp

484

Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg
494

Gly Arg Ile Arg

504

 - 45 -

Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly
514

Phe Tyr Arg Thr

524

Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu
534

Ile Gly His Pro

544

Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly
554

Arg Leu Glu Thr

564

Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala
574

Ile Pro Thr Asp

584

Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys
594

Glu Gln Ala Ile

604

Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu
614

Asp Leu Lys

REIVINDICAÇÕES

1ª. - Método para o tratamento de células cancerosas da bexiga, caracterizado por compreender o contacto das células cancerosas da bexiga com uma quantidade de uma proteína híbrida, que compreende um agente que tem por alvo as células seleccionado a partir de um membro da família EGF de hormonas peptídicas que se liga ao receptor de EGF das células do tumor da bexiga, e uma toxina de célula seleccionada a partir dos membros da classe da ribosilação de ADP de venenos de células de mamíferos, sendo a quantidade de proteína híbrida eficaz para matar as células cancerosas da bexiga; sendo a gama de dosagem de proteína híbrida de 0,1 mg até 10 mg por dose.

2ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o agente que tem por alvo as células ser EGF ou TGF-alfa, e a toxina de célula ser PE_{40} AB, PE_{40} Ab, PE_{40} aB, PE_{40} ab, toxina da difteria ou toxina ricina.

3ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a proteína híbrida estar na forma de uma solução ou suspensão, num líquido fisiologicamente aceitável.

4ª. - Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o líquido ser água esterilizada, água para injeção, solução salina ou solução salina tamponada contendo opcionalmente uma proteína de suporte.

5ª. - Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o líquido ser uma solução salina tamponada com fosfato contendo opcionalmente albumina de soro humano.

6a. - Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o líquido fisiologicamente aceitável conter desde cerca de 0,1 mg a cerca de 10 mg de proteína híbrida por 60 ml.

7a. - Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o líquido fisiologicamente aceitável conter desde cerca de 0,5 mg a cerca de 5 mg de proteína híbrida por 60 ml.

8a. - Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o líquido fisiologicamente aceitável conter desde cerca de 2 mg a cerca de 4 mg da proteína híbrida por 60 ml.

9a. - Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o contacto ser contínuo durante um período desde cerca de 30 minutos a cerca de 4 horas.

10a. - Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por a solução salina tamponada com fosfato conter desde cerca de 0,1 mg a cerca de 10 mg de proteína híbrida por 60 ml.

11a. - Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por a solução salina tamponada com fosfato conter desde cerca de 0,5 mg a cerca de 5 mg de proteína híbrida por 60 ml.

12a. - Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por a solução salina tamponada com fosfato conter desde cerca de 2 mg a cerca de 4 mg de proteína híbrida por 60 ml.

13a. - Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o contacto ter lugar à temperatura ambiente.

14a. - Processo para a preparação de uma composição, caracterizado por se incluir na referida composição um líquido

fisiologicamente aceitável que contém uma concentração de proteína híbrida TGE-alfa - PE₄₀ aB, TGE-alfa - PE₄₀ Ab ou TGE-alfa - PE₄₀ ab que é eficaz para matar células cancerosas da bexiga.

15a. - Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por o referido líquido conter desde cerca de 0,1 mg a cerca de 10 mg de proteína híbrida por 60 ml.

16a. - Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por o referido líquido conter desde cerca de 0,5 mg a cerca de 5 mg de proteína híbrida por 60 ml.

17a. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o referido líquido conter desde cerca de 2 mg a cerca de 4 mg de proteína híbrida por 60 ml.

18a. - Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por se obter uma composição que é uma solução salina tamponada com fosfato opcionalmente contendo uma proteína de suporte.

19a. - Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizada por a proteína opcional de suporte ser albumina de soro humano.

20a. - Processo para a preparação de proteínas híbridas TGE-alfa - PE₄₀ aB, TGE-alfa - PE₄₀ Ab ou TGE-alfa - PE₄₀ ab de potência aumentada, caracterizado por compreender a precipitação com sulfato de uma das proteínas híbridas anteriores que tenha sido expressas numa célula transformada, e a purificação da proteína híbrida por cromatografia de afinidade usando uma coluna de quelação de metais, e a não sujeição da proteína híbrida ao tratamento com ureia.

21a. - Processo de acordo com a reivindicação 17,
caracterizada por o sulfato precipitante ser $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Lisboa, 20 de Junho de 1991



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10 - A 3.ª
1200 LISBOA

FOLHA ÚNICA

