



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) Número de Publicação: **PT 706567 E**

(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)

C12N015/12 A C07K014/46 B
A61K038/17 B C07K016/18 B
C12P021/08 B

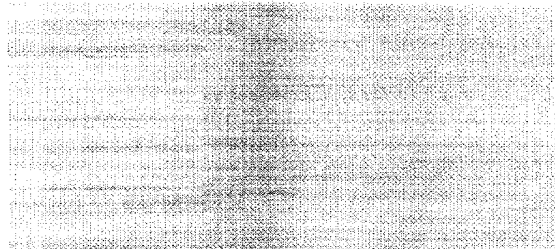
(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

<p>(22) Data de depósito: 1994.06.28</p> <p>(30) Prioridade: 1993.06.29 FR 9307901 1994.01.11 EP 94400062 1994.01.11 FR 9400202</p> <p>(43) Data de publicação do pedido: 1996.04.17</p> <p>(45) Data e BPI da concessão: 2001.06.06</p>	<p>(73) Titular(es): TRANSGENE S.A. 11, RUE DE MOLSHEIM 67082 STRASBOURG CÉDEX FR</p> <p>(72) Inventor(es): TILMAN ACHSTETTER DE HANNO V.J. KOLBE FR ULLA B. RASMUSSEN FR GUNTHER KREIL AT</p> <p>(74) Mandatário(s): MANUEL GOMES MONIZ PEREIRA RUA DO ARCO DA CONCEIÇÃO 3, 1º AND. 1100 LISBOA PT</p>
--	---

(54) Epígrafe: FAMÍLIA DE PÉPTIDOS DESIGNADOS XENOXINAS

(57) Resumo:

FAMÍLIA DE PÉPTIDOS DESIGNADOS XENOXINAS



DESCRIÇÃO

FAMÍLIA DE PÉPTIDOS DESIGNADOS XENOXINAS

A presente invenção refere-se a uma família de péptidos, designados xenoxinas, aos membros da família peptídica, bem como a processos para os preparar e às sequências de ADN correspondentes. Ela refere-se igualmente às composições farmacêuticas contendo as referidas xenoxinas bem como aos estojos de diagnóstico que as contêm ou contêm anticorpos anti-xenoxina.

Foi já isolado um número importante de péptidos com funções biológicas diversas da pele ou das secreções da pele de anfíbios (V. Erspamer e P. Melchiorri, *Neuroendocrine Perspectives*, E.E. Müller e McLeod, Eds., (Elsevier Science Publishers B. V.) 2, (1983), p. 37; C.L. Bevis e col.; *Ann. Rev. Biochem.* 59; (1990); p. 395). Desde o início descobriu-se que vários destes péptidos eram similares, ou mesmo idênticos, a hormonas e a neurotransmissores de mamíferos (V. Erspamer e col., *Trends Pharmacol. Sci.* 1, (1980), p. 391).

Assim, a pele e as secreções da pele de rã é reputada como sendo uma fonte de péptidos com propriedades farmacológicas ou antibióticas interessantes. Mais particularmente, a pele de *Xenopus laevis*, uma rã de origem africana, contém importantes concentrações de diversos péptidos.

O papel biológico que podem desempenhar estes péptidos que se encontram na matéria segregada pelas glândulas e a pele de *Xenopus laevis* é apenas parcialmente conhecido. Por um lado, as secreções poderiam ter uma função protectora dado que a matéria segregada pareceria ser nociva para os predadores. Por outro lado, a matéria segregada contém péptidos que limitam o crescimento das bactérias e dos cogumelos e que poderiam portanto comportar-se como antibióticos sobre a pele molhada da rã ou combater as infecções durante a cicatrização de feridas.

Estes péptidos antibióticos contêm em geral entre 21 e 26 aminoácidos, são básicos e são isentos de tirosina. A identidade das sequências de aminoácidos dos diferentes péptidos antibióticos é frequentemente muito limitada. Pelo contrário, estes péptidos têm em comum a sua configuração em hélice alfa anfipática. Ao nível das sequências sinal de cerca de 20 aminoácidos, a identidade das sequências de aminoácidos é apenas de 55%.

Todavia encontram-se segmentos conservados, comuns às sequências sinal dos diferentes péptidos antibióticos. Além disso, eles partilham toda uma sequência N-terminal Arg-Xaa-Val-Arg que seria o local de acção de uma enzima de maturação comum.

Como outros exemplos de péptidos isolados e caracterizados na *Xenopus laevis*, podem citar-se a caeruleína, membro da família dos péptidos colecistoquinina/gastrina (Anastasi e col., Brit. J. Pharmacol. 38, (1970), p. 221); espasmolisina I e II (W. Hoffmann, J. Biol. Chem. 263 (16), (1988), p. 7686); thyrotrophine releasing peptide (K. Richter e col., EMBO J. 3(3), (1984), p. 617) e xenopsina (K. Araki e col., Chem. Pharmacol. Bull. 21 (12), (1973), p. 2801). A maioria destes péptidos são membros de uma família de péptidos que contém, entre outros, péptidos análogos de origem mamífera. Bombesina e cassinina, por exemplo, serviram como referência para identificar respectivamente o gastrine releasing peptide e a substância K nos mamíferos (C.L. Bevins e col, ver supra). Efectivamente a matéria segregada pela pele da rã contém péptidos em quantidade abundante, enquanto que nos mamíferos o péptido análogo está frequentemente presente apenas numa quantidade fraca. É por esta razão que os péptidos de rã se prestam à identificação dos péptidos de mamíferos úteis.

A presente invenção refere-se a uma nova família de péptidos, que se designaram xenoxinas e que possuem propriedades farmacêuticas de valor e, em particular, a propriedade de influenciar o funcionamento dos canais iónicos trans-membranares sem apresentar actividade neurotóxica. Além disso, pensa-se que os péptidos teriam a propriedade vantajosa de eliminar os efeitos da activina.

Mais particularmente, a presente invenção refere-se a uma xenoxina caracterizada por compreender uma sequência de aminoácidos, a qual:

- a. contém pelo menos 8 cisteínas (Cys) que estão ligadas por 4 pontes dissulfureto segundo a configuração Cys¹ com Cys³, Cys² com Cys⁴, Cys⁵ com Cys⁶ e Cys⁷ com Cys⁸;
- b. contém 0 a 3 aminoácidos do lado N-terminal da Cys¹, 9 a 14 aminoácidos entre as Cys¹ e Cys², 3 a 7 aminoácidos entre as Cys² e Cys³, 11 a 18 aminoácidos entre as Cys³ e Cys⁴, 1 a 6 aminoácidos entre as Cys⁴ e Cys⁵, 7 a 15 aminoácidos entre as Cys⁵ e Cys⁶, nenhum aminoácido entre as

Cys⁶ e Cys⁷, 3 a 5 aminoácidos entre as Cys⁷ e Cys⁸ e 0 a 10 aminoácidos do lado C-terminal da Cys⁸; e

- c. apresenta uma identidade de aminoácidos após alinhamento de pelo menos 40% com a sequência de aminoácidos identificada sob o número SEQ ID NO: 3.

O termo xenoxina faz referência a uma pequena proteína básica apresentando as características descritas.

No quadro da presente invenção, o número que figura em índice de um resíduo cisteína indica a sua posição em relação às outras cisteínas na referida xenoxina no sentido de N para C-terminal. Assim Cys¹ faz referência à primeira cisteína que figura numa xenoxina de acordo com a invenção do lado N-terminal.

A presente invenção refere-se igualmente aos péptidos intermediários que ainda não adoptaram a sua conformação dobrada mas que contêm pelo menos 8 cisteínas susceptíveis de se ligarem por 4 pontes dissulfureto seguindo a configuração Cys¹ com Cys³, Cys² com Cys⁴, Cys⁵ com Cys⁶ e Cys⁷ com Cys⁸.

Por isso é que a presente invenção se refere a um péptido básico caracterizado por compreender uma sequência de aminoácidos, a qual:

- a. contém pelo menos 8 cisteínas que, quando o péptido adopta a sua configuração dobrada, estão ligadas por 4 pontes dissulfureto segundo a configuração Cys¹ com Cys³, Cys² com Cys⁴, Cys⁵ com Cys⁶ e Cys⁷ com Cys⁸;
- b. contém 0 a 3 aminoácidos do lado N-terminal da Cys¹, 9 a 14 aminoácidos entre as Cys¹ e Cys², 3 a 7 aminoácidos entre as Cys² e Cys³, 11 a 18 aminoácidos entre as Cys³ e Cys⁴, 1 a 6 aminoácidos entre as Cys⁴ e Cys⁵, 7 a 15 aminoácidos entre as Cys⁵ e Cys⁶, nenhum aminoácido entre as Cys⁶ e Cys⁷, 3 a 5 aminoácidos entre as Cys⁷ e Cys⁸ e 0 a 10 aminoácidos do lado C-terminal da Cys⁸; e

- c. apresenta uma identidade de aminoácidos após alinhamento de pelo menos 40% com a sequência de aminoácidos identificada sob o número SEQ ID NO: 3,

ou fragmento derivado desta sequência.

Os péptidos preferidos da presente invenção contêm 2 aminoácidos do lado N-terminal da Cys¹, 10 a 13 aminoácidos entre as Cys¹ e Cys², 4 a 6 aminoácidos entre as Cys² e Cys³, 12 a 17 aminoácidos entre as Cys³ e Cys⁴, 1 a 5 aminoácidos entre as Cys⁴ e Cys⁵, 8 a 14 aminoácidos entre as Cys⁵ e Cys⁶, nenhum aminoácido entre as Cys⁶ e Cys⁷, 4 aminoácidos entre as Cys⁷ e Cys⁸ e 2 aminoácidos do lado C-terminal da Cys⁸.

Outros péptidos, igualmente preferidos, da presente invenção apresentam uma identidade de aminoácidos de pelo menos 50%, de maneira particularmente preferida de pelo menos 60% e de maneira vantajosa de pelo menos 70%, com a sequência de aminoácidos identificada sob o número SEQ ID NO: 3.

Os péptidos particularmente preferidos de acordo com a invenção são as xenoxinas caracterizadas por compreenderem uma sequência de aminoácidos, a qual:

- a. contém pelo menos 8 cisteínas que estão ligadas por 4 pontes dissulfureto segundo a configuração Cys¹ com Cys³, Cys² com Cys⁴, Cys⁵ com Cys⁶ e Cys⁷ com Cys⁸;
- b. contém 0 a 3 aminoácidos do lado do N-terminal da Cys¹, 13 aminoácidos entre as Cys¹ e Cys², 6 aminoácidos entre as Cys² e Cys³, 12 aminoácidos entre as Cys³ e Cys⁴, 5 aminoácidos entre as Cys⁴ e Cys⁵, 14 aminoácidos entre as Cys⁵ e Cys⁶, nenhum aminoácido entre as Cys⁶ e Cys⁷, 4 aminoácidos entre as Cys⁷ e Cys⁸ e 0 a 10 aminoácidos do lado C-terminal da Cys⁸; e
- c. apresenta uma identidade de aminoácidos após alinhamento de pelo menos 80%, de preferência 90%, com a sequência de aminoácidos identificada sob o número SEQ ID NO: 3.

Os péptidos da invenção comportam com vantagem de 42 a 86 aminoácidos, de preferência de 51 a 75 aminoácidos e, de maneira particularmente preferida, de 62 a 75 aminoácidos.

A presente invenção refere-se igualmente a péptidos de 66 aminoácidos que apresentam uma identidade de aminoácidos após alinhamento de pelo menos 80%, de maneira preferida, de pelo menos 90% e, de maneira particularmente preferida, de pelo menos 95% com a sequência de aminoácidos identificada sob o número SEQ ID NO: 3.

Como exemplos de péptidos particularmente preferidos pode citar-se o péptido xenoxina-1, tal como identificado sob o número SEQ ID NO: 3, bem como a xenoxina-2 segundo SEQ ID NO: 4 e a xenoxina-3 segundo SEQ ID NO: 5.

Para determinar o grau de identidade de aminoácidos, alinham-se as cisteínas de tal modo que elas se encontrem em posição idêntica com as cisteínas da sequência de aminoácidos tal como apresentada sob SEQ ID NO: 3 e introduz-se um número mínimo de inserções ou deleções para maximizar o alinhamento das sequências. Identificam-se agora os aminoácidos idênticos que se encontram em posição idêntica, incluindo as cisteínas. A identidade dos aminoácidos é expressa em percentagem e calculada segundo a fórmula (1) seguinte:

$$\frac{n}{66 + p} \times 100 \quad (1)$$

na qual

n é o número de aminoácidos idênticos,

66 é o número de aminoácidos da sequência identificada sob o número SEQ ID NO: 3,

p é o número de inserções ou deleções introduzidas.

Os péptidos de acordo com a invenção podem estar sob forma de seus sais de adição de ácidos não tóxicos, farmacologicamente aceitáveis. Como exemplos de ácidos farmacologicamente aceitáveis, podem citar-se os ácidos minerais como os ácidos clorídrico, sulfúrico, fosfórico, etc. e os ácidos orgânicos como os ácidos sulfônicos e

carboxílicos tais como o ácido acético, láctico, palmítico, esteárico, maleico, tártrico, ascórbico, cítrico, etc.

Os péptidos de acordo com a invenção podem igualmente estar sob forma de seus sais de adição de base, dado que eles contêm grupos carboxílicos livres. Como exemplos de sais farmacêuticamente aceitáveis, podem citar-se os sais de sódio, de potássio, de cálcio ou de magnésio e os derivados de amónio quaternário.

Dado que os péptidos de acordo com a invenção contêm simultaneamente grupos carboxilo e amina livres, eles podem estar sob forma de seus sais internos ou sob forma combinada de sais de adição e de sais internos.

Uma família de xenoxinas de acordo com a invenção compreende péptidos provenientes de diferentes espécies de anfíbios ou de mamíferos. Como exemplo de anfíbios podem citar-se as espécies que pertencem à super-ordem das *Salienta*, anuros tais como as rãs, os sapos, as relas, etc.; ou à ordem das *Caudata*, urodelos tais como as salamandras, os tritões, etc.; ou ainda à ordem das *Gymnophiona*, ápodes tais como as enguias, as moreias, etc. É igualmente possível obter xenoxinas de mamífero especialmente de rato, de porco ou de homem.

As xenoxinas de acordo com a invenção têm em comum propriedades farmacêuticas nos mamíferos baseadas especialmente nas suas interações com o funcionamento dos canais iónicos trans-membranares e sua interação com a activina.

A identidade de aminoácidos das diferentes xenoxinas pode variar devido às divergências inter-espécies ou alelomórficas. Mais frequentemente trata-se de substituições conservativas que permitem conservar a conformação esquelética do péptido. Assim de modo preferível, nas xenoxinas de acordo com a invenção, uma substituição em posição homóloga, comparada à sequência identificada sob SEQ ID NO:3, faz-se com um aminoácido tendo uma funcionalidade equivalente no que se refere às suas propriedades hidrofóbicas, de carga ou de espaçamento. Escolhe-se por exemplo entre o grupo dos aminoácidos hidrófobos entre alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptofano e valina; entre o grupo dos aminoácidos polares não carregados asparagina, cisteína, glutamina, glicina, serina, treonina e tirosina; entre os aminoácidos carregados positivamente arginina, histidina e lisina; entre os aminoácidos carregados negativamente

ácido aspártico e ácido glutâmico e entre o grupo dos aminoácidos de espaçamento equivalente alanina, glicina e serina.

Uma modificação pós-traducional, tal como a formação de pontes dissulfureto entre as cisteínas do péptido, estabiliza a conformação dobrada das xenoxinas, o que permite o exercício das suas actividades farmacológicas.

As diferentes pontes dissulfureto não se formam de modo aleatório. Quando se permite à sequência de aminoácidos enrolar-se, os grupos dissulfureto que se ligam são os de duas cisteínas vizinhas no péptido dobrado. É por isso que a conformação do esqueleto peptídico pode ser descrita pela configuração das pontes dissulfureto. Para este efeito, descrevem-se as ligações que se formaram entre as cisteínas no péptido dobrado e dá-se uma indicação do número de aminoácidos entre as diferentes cisteínas sucessivas na sequência primária dos péptidos.

Existe portanto uma dupla similaridade estrutural entre os péptidos da mesma família, especialmente ao nível do esqueleto peptídico e ao nível da identidade de aminoácidos. Assim, quando se compara dois péptidos da mesma família, pode acontecer que eles possuam sequências de aminoácidos com uma disparidade significativa, ou mesmo uma identidade de aminoácidos tão fraca como 40%. Pelo contrário, a similitude da configuração das cisteínas implicadas na formação das pontes dissulfureto será notável.

As xenoxinas de acordo com a invenção, sob forma total ou sob forma de fragmento, podem igualmente ser introduzidas em estruturas químicas ou físico-químicas mais complexas destinadas a facilitar a sua actividade ou a conferir-lhes propriedades terapêuticas vantajosas, como por exemplo a forma retardada ou protegida.

A invenção refere-se igualmente às xenoxinas não modificadas, por exemplo não glicosiladas. No entanto, a extensão da protecção inclui igualmente xenoxinas modificadas, por exemplo produtos glicosilados, desglicosilados ou modificados pelo polietilenoglicol.

As xenoxinas de acordo com a presente invenção podem ser isoladas de acordo com o seguinte processo:

- a. divide-se em fracções a matéria segregada pela pele da rã por precipitação com o auxílio de sulfato de amónio ou um agente precipitante equivalente,
- b. submetem-se os precipitados que se formam entre 30% e 70% de saturação em sulfato de amónio, de preferência entre 30% e 60%, ou em condições equivalentes, a uma cromatografia por permeação de gel, e
- c. recolhe-se a fracção peptídica que elui tardiamente.

Se se desejar, a mistura de xenoxinas assim obtida pode em seguida ser purificada, especialmente por HPLC de permuta de catiões e seguida de HPLC de fase inversa.

De acordo com um aspecto preferido da presente invenção, a matéria segregada pela pele de rã é proveniente de *Xenopus laevis*.

No processo de acordo com a invenção precipita-se a fracção de péptidos com vantagem com o auxílio de sulfato de amónio. Todavia, podem utilizar-se outros agentes precipitantes tais como o polietilenoglicol, o etanol ou o sulfato de sódio. É função do perito escolher a gama de saturação em agente precipitante necessária para obter os precipitados isentos por um lado de proteínas e por outro lado de péptidos de massas moleculares inferiores a 10 kDa, de preferência 8 kDa.

Normalmente, a cromatografia por permeação de gel permite separar as moléculas em função da sua dimensão molecular. No processo de acordo com a invenção esta cromatografia permite afastar todas as moléculas de dimensão molecular importante dos respectivos péptidos recolhendo unicamente a fracção que elui tardiamente da coluna.

Assim, pode utilizar-se qualquer tipo de gel de permeação tendo uma zona de fraccionamento para lá de 10 kDa. No comércio, este género de gel está disponível sob o nome, por exemplo de Sephacryl S200 (Pharmacia), Sephadex (Pharmacia), Fractogel (Merck) ou Toyopearl (Toso Haas).

Pode igualmente sintetizar-se quimicamente os péptidos de acordo com a invenção por métodos de síntese conhecidos do perito. A título de referência citar-se-á E. Bayer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30, (1991), p. 113.

A presente invenção refere-se igualmente à expressão das xenoxinas em sínteses celulares para além do sistema celular natural de onde elas provêm.

Para isso, a invenção refere-se igualmente às sequências de ADN isoladas codificantes para as referidas xenoxinas, bem como a cassetes de expressão das referidas sequências assegurando a sua expressão na célula desejada.

Por fragmento de ADN isolado entende-se um fragmento de ADN que já não está associado ao conjunto das regiões naturais que controlam a sua expressão no organismo de onde provém, isto é no caso do exemplo citado abaixo do *Xenopus laevis*.

Entre as sequências de ADN isolado que compreendem uma sequência codificante para um péptido de acordo com a invenção, é necessário citar em particular o ADN que é retomado na lista de identificação das sequências sob o número SEQ ID NO: 1 e, mais particularmente, a parte da SEQ ID NO: 1 da posição 39 a 290 e a parte da SEQ ID NO: 1 da posição 93 à 290.

A invenção refere-se a cassetes de expressão das referidas sequências de ADN codificante para um péptido de acordo com a invenção.

Uma tal cassette de expressão compreende especialmente um fragmento de ADN isolado que é colocado sob o controle de elementos que permitem a sua transcrição e a sua tradução na célula hospedeira considerada.

Estes elementos de controle são essencialmente um promotor da transcrição apropriada bem como codões de iniciação e fim de tradução. Em certos casos, é também vantajoso adicionar um terminador de transcrição e um péptido sinal, ou sequência pré, eventualmente seguida de uma sequência pro. Preferir-se-á, muito particularmente, a sequência pro da defensina A de *Phormia terranova* (Dimarcq e col., EMBO J, 9 (1990), p. 2507) funcional nas células eucariotas e especialmente a levedura como *Saccharomyces cerevisiae*.

A invenção refere-se igualmente a uma célula que é transformada com uma cassette de expressão que compreende um fragmento de ADN de acordo com a invenção. A cassette

de expressão pode ser quer integrada no genoma da célula quer transportada por um vector de expressão apropriado, tal como por exemplo um plasmídeo ou um vector viral.

A presente invenção refere-se igualmente à utilização de vectores de expressão susceptíveis de serem administrados para produzir as xenoxinas *in situ* no homem ou no animal, especialmente quando o vector é um vector viral ou sintético (por exemplo as misturas de lípidos como os lipossomas).

Por fim, a presente invenção refere-se a um processo de preparação de um péptido de acordo com a invenção que consiste em cultivar uma célula transformada de acordo com a invenção e em recolher o referido péptido a partir da cultura.

As tecnologias que permitem a clonagem e a expressão de um gene estrangeiro nas células hospedeiras procaríotas ou eucaríotas são conhecidas do perito. Elas serão ilustradas nos exemplos abaixo, entendendo-se que podem ser utilizados outros vectores e outras células hospedeiras. O perito sabe bem, evidentemente, escolher o promotor da transcrição apropriado em função do hospedeiro no qual se deseja exprimir o fragmento de ADN e em função do vector no qual a cassette de expressão deve ser inserida.

De acordo com um processo preferido de preparação de um péptido de acordo com a invenção, o fragmento de ADN isolado é expresso em células hospedeiras que permitem a secreção dos péptidos sintetizados no meio de cultura e assegurar a formação das pontes dissulfureto. A título de exemplo, podem citar-se as células hospedeiras de procaríotas tal como *E. coli*, de eucaríotas inferiores tal como *Saccharomyces cerevisiae* ou de eucaríotas superiores tal como o homem ou o animal ou as plantas.

Para dirigir um péptido de acordo com a invenção para o sistema de secreção das células hospedeiras, prevê-se na cassette de expressão uma sequência codificante para um seu precursor. O referido precursor compreende essencialmente um péptido de acordo com a invenção sobre forma madura e um péptido sinal fixado por uma ligação peptídica na sua extremidade NH₂ terminal. Um péptido sinal comporta geralmente uma sequência de aminoácidos principalmente hidrófoba e tem como função promover a secreção. Durante o processo de translocação esse péptido sinal será clivado por uma enzima, a peptidase sinal. É então um péptido maduro que é segregado no meio de cultura ou no periplasma do hospedeiro.

O péptido sinal preferivelmente utilizado é proveniente de genes em que se conhece que eles codificam para um produto segregado de modo eficaz. A título de exemplo citam-se os péptidos sinal da invertase periplasmática SUC2 (R.A. Smith e col., *Science* 229, (1985), p.1219; C.N. Chang e col., *Mol. Cell. Biol.* 6, (1986), p. 1812), bem como os péptidos sinal toxinas "killer" de *Kluyveromyces lactis* (C. Baldazi e col., *EMBO J.* 6, (1987), p.229) ou de *Saccharomyces cerevisiae* (M. Tokunaga e col., *Nucleic Acids Res.* 16, (1988), p. 7499). A título de indicação, precisa-se todavia que o péptido sinal do gene BGL2 proveniente de *S. cerevisiae* (T. Achstetter e col., *Gene* 110, (1992) p. 25), e utilizado nos exemplo abaixo, permite obter muito bons resultados. Além disso, pode igualmente utilizar-se o péptido sinal natural das xenoxinas.

Em certos casos, o péptido obtido poderá não apresentar a boa configuração, poderá então ser necessário proceder a um rearranjo por métodos químicos comportando por exemplo a colocação em solução e dobragem utilizando as condições de pH e a ureia, por exemplo.

A presente invenção refere-se igualmente a anticorpos monoclonais ou policlonais anti-xenoxinas que podem ser obtidos por processos conhecidos, bem como a sua aplicação tanto em terapia como no domínio diagnóstico para identificar ou quantificar as xenoxinas no homem ou no animal. A escolha da técnica a utilizar é grande e ao alcance do perito. Podem citar-se nomeadamente as técnicas ELISA, de marcação ou ainda de fluorescência.

A presente invenção refere-se portanto igualmente a estojos de diagnóstico utilizando as xenoxinas ou os anticorpos correspondentes.

Os péptidos de acordo com a invenção têm aplicações terapêuticas nos mamíferos e especialmente no homem dado as suas propriedades de poder influenciar o funcionamento dos canais iónicos trans-membranares e da activina, sem ter actividade neurotóxica.

Consequentemente, a invenção refere-se igualmente a:

- uma composição farmacêutica que compreende a título de agente activo pelo menos um péptido de acordo com a invenção;

- o uso terapêutico de um péptido de acordo com a invenção.

A composição farmacêutica de acordo com a invenção destina-se em particular ao tratamento preventivo ou curativo de doenças tais como por exemplo arritmias cardíacas devidas a uma hiper ou hipotensão; as doenças fibroquísticas de origem genética tal como a fibrose quística do pâncreas, mais conhecida sob o nome de mucoviscidose; as perturbações associadas a um desequilíbrio de gonadotrofina coriônica humana durante a gravidez; as doenças devidas a uma secreção desequilibrada das hormonas FSH, STH e ACTH (respectivamente, por follicle stimulating hormone, somatotropic hormone e adenocorticotropic hormone, em Inglês); as composições farmacêuticas de acordo com a invenção permitem igualmente a regulação da eritropoiese.

As composições farmacêuticas contendo os péptidos de acordo com a invenção podem ser administradas pela via mais apropriada ao seu destino final, especialmente por via oral, parentérica ou rectal.

As composições farmacêuticas que se podem utilizar para a administração oral podem ser sólidas ou líquidas, por exemplo sob forma de comprimidos (recobertos ou não), pílulas, drageias, cápsulas em gelatina, soluções, xaropes, etc.

Do mesmo modo, as composições que se podem utilizar para a administração por via parentérica são as formas farmacêuticamente conhecidas para este género de administração, por exemplo soluções, suspensões ou emulsões aquosas ou oleosas que convêm e.a. para injecções intramusculares, intravenosas, intraperitoneais, subcutâneas ou aplicações cutâneas ou trans-mucosas, por exemplo, pulverização, pomadas, etc.

Para administração por via rectal, as composições contendo os compostos da invenção apresentam-se geralmente sob forma de supositórios.

Os compostos de acordo com a invenção poderão igualmente ser preparados sob uma forma de libertação controlada e, em função da via de administração retida, sob uma forma protegida apropriada afim de evitar uma degradação muito rápida do péptido.

As formas farmacêuticas tais como as soluções injectáveis, suspensões injectáveis, comprimidos, gotas, supositórios, etc. são preparadas segundo os métodos

correntemente utilizados pelos farmacêuticos. As formas farmacêuticas compreendem igualmente as composições que permitem libertar o péptido activo de um modo progressivo. Misturam-se os compostos da invenção com um veículo sólido ou líquido, não tóxico, farmacêuticamente aceitável e, eventualmente, com um agente dispersante, um agente desintegrante, um agente estabilizante, etc. Pode adicionar-se, por exemplo, agentes edulcorantes, agentes corantes, etc. A percentagem de produto activo nas composições farmacêuticas pode variar entre grandes limites, segundo o paciente e o modo de administração, em particular segundo a frequência da administração.

Os exemplos que se seguem ilustram a presente invenção, sem a limitar, fazendo referência às figuras 1 a 4.

A figura 1 representa um SDS-PAGE colorido com Azul de Comássia de dois estádios diferentes de purificação. (1) fracção peptídica recolhida após cromatografia por permeação de gel Sepharyl S300; (2) Marcadores de massa molecular de baixo até acima: lisozima (14300), inibidor de tripsina (21500), anidrase carbónica (3000), ovalbumina (46000), albumina de soro bovino (69000), fosforilase b (92500) e miosona (200000); (3) xenoxina-1 purificada por HPLC de permuta de catiões e fase inversa de acordo com o exemplo 1 abaixo.

A figura 2 representa um perfil de eluição obtido após HPLC de permuta de catiões da fracção peptídica proveniente de secreção de pele de *Xenopus laevis*, obtida por precipitação com sulfato de amónio, seguida de uma cromatografia por permeação de gel nas condições do exemplo 1 que é retomado abaixo. As fracções que contêm respectivamente xenoxina-1, xenoxina-3 e xenoxina-2, são indicadas por setas sucessivas.

A figura 3 A representa o alinhamento de (a) xenoxina-1 com (b) a citotoxina proveniente de *Naja naja kaouthia*, *Naja naja siamensis*, uma cobra monoculo (S. Inoue e col., FEBS Lett. 218, (1987), p. 17) e (c) a neurotoxina d curta de *Laticauda colubrina*, um *bungare* de mar de lábios amarelos (N. Tamiya e col. Toxicon (Suppl. 3), (1983), p.445). Introduzem-se afastamentos (-) e indicam-se as pontes dissulfureto.

A figura 3 B representa o número de aminoácidos entre as cisteínas sucessivas nas sequências primárias para as três famílias de péptidos xenoxinas, citotoxinas e neurotoxinas curtas, respectivamente.

A figura 4 representa o alinhamento de xenoxina-1 com 27 aminoácidos do local de fixação N'-terminal de 116 resíduos do receptor humano da activina.

Exemplo 1: Purificação e caracterização das xenoxinas.

1.1 Isolamento e purificação das xenoxinas.

Mantêm-se *Xenopus laevis* (Herpetologic Institute, DeRover, Países-Baixos) em tinas de madeira ventiladas e alimentadas com fígado de porco picado. Todas as três semanas, os animais são submetidos a um ligeiro choque eléctrico (15 V) e as secreções da sua pele são recolhidas numa solução de 0,9% de NaCl segundo o método descrito por C. Mollay e col., Eur. J. Biochem. 160, (1986), p. 31. O mucus assim extraído é submetido a duas extracções sucessivas pelo n-butanol de igual volume. A fracção insolúvel é eliminada por centrifugação durante 15 minutos a 15000 rotações por minuto (Sorvall RC-5B, rotor SS34). Adiciona-se em seguida sulfato de amónio ao sobrenadante e o material precipitante entre 30 e 60% de saturação é recuperado. Dissolve-se este precipitado e dializa-se em acetato de amónio 50 mM, pH 5,0 e submete-se a uma cromatografia por permeação de gel utilizando uma coluna Sephacryl S300 (2,7 cm x 120 cm; Pharmacia) equilibrada com o mesmo tampão. A fracção peptídica é detectada a 280 nm e elui tardiamente sob forma de um pico largo. Recolhe-se apenas esta fracção tardia e liofiliza-se.

Estabelece-se um SDS-PAGE colorido com Azul de Comássia para verificar que as moléculas de massa molecular superior a 10 kDa são afastadas, (ver Figura 1).

A fracção peptídica liofilizada é retomada em 50 ml de acetonitrilo 5% em acetato de amónio 20 mM, a pH 4,6, depois centrifuga-se durante 15 minutos a 15000 rotações por minuto (Sorvall RC-5B, rotor SS34). Filtra-se o sobrenadante sobre filtro Millex GV de 0,22 µm (Millipore) e congelam-se alíquotas de 5 ml a -80°C.

Dilui-se uma alíquota de 5 ml da solução em 90 ml de tampão CE1 (acetone nitrilo 25% em fosfato de potássio monobásico 5 mM, ajustado a pH 3,0 com o auxílio de ácido fosfórico). Ajusta-se a condutividade da solução a 8 mS com o auxílio do tampão CE1 e, se necessário, ajusta-se o pH a 3,0 com o auxílio de ácido fosfórico. Separa-se então a solução assim obtida em três alíquotas que são sucessivamente submetidas a uma separação por HPLC (Cromatografia Líquida de Elevada Resolução) de permuta de cátions com detecção UV a 215 nm, de modo seguinte:

- carrega-se a alíquota numa coluna HPLC (Poli-sulfoetilo Aspartamida SCX; 9,4 mm x 200 mm; The Nest Group) a um débito de 1,6 ml/minuto;
- lava-se a coluna com o tampão CE1 até que a linha de base a 215 nm se tenha estabilizado;
- aplica-se um gradiente 0 a 100% de tampão CE2 (cloreto de potássio 600 mM em tampão CE1) durante 40 minutos para eluir o material absorvido que é recolhido manualmente por fracções de 1,6 ml;
- lava-se a coluna com o tampão CE2 durante 10 minutos;
- aplica-se um gradiente de 100% de tampão CE2 a 100% de tampão CE1 durante 5 minutos; e
- lava-se a coluna com o tampão CE1 durante 15 minutos.

Obtém-se respectivamente a xenoxina-1 que elui entre 362 e 392 mM de cloreto de potássio após 33,3 a 35,5 minutos; a xenoxina-3 (398-415 mM; 35,9-37,1 minutos); e a xenoxina-2 (415-435 mM; 37,1-38,6 minutos) que são indicadas pelas setas sucessivas sobre o diagrama da Figura 2.

Realiza-se em seguida uma etapa de separação em HPLC de fase inversa (Hewlett Packard 1090A) com detecção UV a 205 nm. Para este efeito, as fracção individuais provenientes da cromatografia HPLC de permuta de cátions são directamente carregadas sobre uma coluna HPLC Vydac C₁₈ (10 mm x 250 mm; Vydac Separation Group) equilibrada com o tampão RP1 (0,10% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) em água desionizada pelo sistema de preparação de água reagente de Millipore (água Milli Q)) num débito de 1,5 ml/minuto.

Por cada fracção carregada, as xenoxinas são eluídas da coluna segundo o seguinte procedimento:

- 100% de tampão RP1 durante 5 minutos para voltar a estabilizar a coluna;
- aplica-se um gradiente 100% de tampão RP1 a 71,4% de tampão RP2 (30/70/0,10 (v/v/v) de água Milli Q/acetoneitrilo/TFA) em 100 minutos;
- lava-se a coluna com 71,4% de tampão RP2 durante 10 minutos;
- aplica-se um gradiente de 71,4% de tampão RP2 a 100% de tampão RP1 durante 5 minutos; e
- lava-se a coluna com 100% de tampão RP1 durante 15 minutos.

As fracções são recolhidas manualmente e dessalgam-se e purificam-se as xenoxinas que são concentradas com o auxílio de um Speed Vac Concentrator (Savant) e armazenadas a -20°C .

Obtém-se assim, a partir de um equivalente de secreções de pele de 150 *Xenopi laevis*, 800 μg de xenoxina-1, 650 μg de xenoxina-2 e 200 μg de xenoxina-3.

1.2. Caracterização das xenoxinas

1.2.1 Redução e alquilação

Retomam-se 50 μg de xenoxinas purificadas e concentradas segundo o exemplo 1.1 num tampão de alquilação (Tris-HCl 250 mM, pH 8,5; cloreto de ganidínio 6M; EDTA 1 mM) a uma concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, depois homogeneízam-se em vortex e sujeitam-se a sonicação 5 minutos. Em seguida, adicionam-se 5 μl de 20/80 (v/v) β -mercaptoetanol em água Milli Q, coloca-se a mistura sob árgon e deixa-se a 37°C . Após 2 horas, adicionam-se 10 μl de 4-vinilpiridina (4VP; Janssen), coloca-se de novo a mistura sob árgon e deixa-se à temperatura ambiente. Após 2 horas, congela-se a mistura reaccional e guarda-se a -20°C até à sua utilização para digestão ou dessalgamento.

1.2.2 Digestão com clostripaína (CL), tripsina (T) ou com brometo de cianogénio (CNBr).

A clostripaína (Sigma) é activada a uma concentração de 1 mg/ml em tampão CL (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; dicloreto de cálcio 1 mM; DTT 2,5 mM) a 37°C durante 2 horas. Incubam-se 12 μg de xenoxina preparada segundo o exemplo 1.1 (alquilada com 4VP, segundo o exemplo 1.2.1, ou não alquilada) no tampão CL durante 16 horas a 37°C a

uma concentração de 150 µg/ml e uma relação ponderal protease/substrato de 1:10. Adicionam-se em seguida 8 µl de ácido acético glacial e 70 µl do tampão RP1 (ver acima). A solução assim obtida é então utilizada para determinar a carta peptídica por cromatografia HPLC de fase inversa como descrito no exemplo 1.2.3 abaixo.

Dilui-se a tripsina (1 mg/ml em HCl 1 mM) 10 vezes em tampão TR (N-etilmorfolina-HCl 100 mM, pH 8,3; dicloreto de cálcio 0,1 mM). Incubam-se 25 µg de xenoxina preparada segundo o exemplo 1.1 (alquilada com 4VP, segundo o exemplo 1.2.1, ou não alquilada) no tampão TR durante 16 horas a 37°C a uma concentração de 240 µg/ml e uma relação ponderal protease/substrato entre 1:5 e 1:100. Adicionam-se em seguida 2 µl de tampão TFA puro e 100 µl de tampão RP1 e a solução assim obtida é então utilizada para determinar a carta peptídica por cromatografia HPLC de fase inversa como descrito no exemplo 1.2.3.

Adicionam-se 40 µl de uma solução (massa/volume) CNBr 1% (Pierce) em ácido fórmico 70% a 25 µg de xenoxina preparada segundo o exemplo 1.1. (alquilada com 4VP ou não alquilada). A reacção prossegue durante 16 horas após adição de 300 µl de água Milli Q. Seca-se a mistura reaccional com o auxílio de um Speed Vac Concentrator. Adicionam-se 250 µl de tampão RP1. A solução assim obtida é então utilizada para determinar a carta peptídica por cromatografia HPLC de fase inversa como descrito no exemplo 1.2.3.

1.2.3 Determinação da carta peptídica por cromatografia HPLC de fase inversa.

Realiza-se a carta peptídica por cromatografia HPLC de fase inversa com o auxílio de uma unidade HPLC 1090A (Hewlett-Packard) com detecção UV a 205 nm.

Carregam-se as moléculas de xenoxina intactas, seus fragmentos proteolíticos bem como seus equivalentes alquilados com 4VP sobre uma coluna HPLC Supersher 100C₁₈ (4 mm x 125 mm; Merck) equilibrada com TFA 10 mM em 10/90 (v/v) de acetonitrilo/água Milli Q a um débito de 1 ml/minutos. Os péptidos são então eluídos segundo o protocolo seguinte:

- lava-se a coluna com TFA 10 mM em 10/90 (v/v) de acetonitrilo/água Milli Q durante 15 minutos; e

- aplica-se um gradiente linear até TFA 10 mM em 50/50 (v/v) de acetonitrilo/água Milli Q em 40 minutos.

As frações eluídas são recolhidas manualmente e concentradas com o auxílio de um Speed Vac Concentrator.

Os tempos de retenção observados são retomados nas tabelas I, II e III abaixo.

1.2.4 Determinação da sequência em aminoácidos

Os péptidos obtidos segundo o exemplo 1.2.3 são solubilizados numa solução de ácido fórmico 80% e a determinação da sequência N-terminal é realizada com o auxílio de um sequenciador de proteínas de tipo 477A acoplado a um analisador HPLC de aminoácidos feniltiocarbâmico (Applied Biosystems Inc.) de acordo com os procedimentos padrão. Apresentam-se os resultados do sequenciamento nas tabelas I, II e III a seguir.

TABELA I

Péptido ⁽¹⁾	Tempo de retenção (minutos)	SEQUÊNCIA EM AMINOÁCIDOS					
		10	20	30	40	50	60
xenoxina-1, alquilada ^a	37,5	LKCVNLQANGIKMTQECAKEDTKCLTLRSLKTKLFC					
xenoxina-1, alquilada fragmento CNBR1 ^{b,c,d}	34,0	LKCVNLQANGIKXXQECAKEDTKCLTLRSLKTKLFCAXXXTC TQECAKEDTKCLTLRSLKTKLFCAXGRTCT					
xenoxina-1, alquilada fragmento CL1 ^b	27,7	LKCVNLQA SLKTKLFCASG TXTTMK					
xenoxina-1, alquilada fragmento T1 ^{b,d}	33,4	IMSLPGEQITXXEGNMXNA					
xenoxina-1, alquilada fragmento CNBR2 ^{b,c}	28,2	SLPGEQITCCEGN KIMSLPGEQITCCEGN					
xenoxina-1, alquilada fragmento CL2	32,9	IMSLPGEQITCCEGNMCN					
xenoxina-1	40,0	LKCVNLQANGIKMTQECAKEDTKCLTLRSLKTKLFCASGRTCTTKIMSLPGEQITCCEGNMCNA					

- (1) CNBR, CL ou T precisam o método proteolítico utilizado
- a Molécula completa, só se apresenta a parte analisada
- b Duas seqüências peptídicas são lidas em paralelo
- c Um péptido derivado de uma clivagem completa
- d Os resíduos marcados X não são identificáveis

TABELA II

Péptido ⁽¹⁾	Tempo de retenção (minutos)	SEQUÊNCIA EM AMINOÁCIDOS					
		10	20	30	40	50	60
xenoxina-2, alquilada ^a	37,5	LKCVNLQANGIKMTQECAKEDNKCLTLRSLKKTLLKFCAXDRICKTMKIMSLPGEXI					
xenoxina-2 ^{a,b}	40,0	LKXVNLQANGIKMTQEXAKEDNKXLLRSLKKTLLKFCASDXIXKTMK					
xenoxina-2, alquilada fragmento CL3	23,0	ITCCEGNMCNA					
xenoxina-2, alquilada fragmento T3	28,0	IMSLPGEK					
xenoxina-2	40,0	LKCVNLQANGIKMTQECAKEDNKCLTLRSLKKTLLKFCASDRICKTMKIMSLPGEKITCCEGNMCNA					

- (1) CL ou T precisam o método proteolítico utilizado
a Molécula completa, só se apresenta a parte analisada
b Os resíduos marcados X não são identificáveis

TABELA III

Péptido ⁽¹⁾	Tempo de retenção (minutos)	SEQUÊNCIA EM AMINOÁCIDOS					
		10	20	30	40	50	60
Xenoxina-3, alquilada ^{a,b,c}	35,5	LXCVNLQANGVKMXQECXKE	KCVNLQANGVKMTQECAKED	CVNLQANGVKMTQECAKEDT			
Xenoxina-3, alquilada Fragmento T4	7,0				FCASDR		
Xenoxina-3, alquilada Fragmento T5	?					IASLPGEQITCCEGNMCNA	
Xenoxina-3, alquilada Fragmento T6 ^b	?					IASLPGEQITXXEGNMXNA	
Xenoxina-3 ^d	40,0	LKCVNLQANGVKMTQECAKEDTKCLTLRSLKKTLLKFCASDRICKTMMKIASLPGEQITCCEGNMCNA					

(1) T precisa o método proteolítico utilizado

a Molécula completa, só se apresenta a parte analisada

b Os resíduos marcados X não são identificáveis

c Três sequências peptídicas são lidas em paralelo

d Os aminoácidos em itálico são deduzidos das sequências das xenoxina-1 e xenoxina-2

1.2.5 Espectrometria de massa

As medidas de espectrometria de massa são efectuadas por ESMS (Electrospray Mass Spectrometry) num espectrómetro de massa de tipo VG Bio Tech BioQ (VG Biotech Ltd.). Os protocolos utilizados são conhecidos do perito e são retomados por exemplo em A. Van Dorsselaer e col., *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 19, (1990), p.692. As massas moleculares calculadas são dadas como valores médios baseados nos valores de massas atómicas dos elementos C, H, N, O e S seguintes: C = 12,011; H = 1,0079; N = 14,0067; O = 15,994 e S = 32,06.

Apresentam-se os resultados na tabela IV a seguir.

TABELA IV
ESPECTROMETRIA DE MASSA

Péptido	Massa molecular experimental	Massa molecular calculada
xenoxina-1	7228,3 ± 0,1 Da ^a	7227,6 Da ^b
xenoxina-1, alquilada	8077,7 ± 0,4 Da ^c	8076,7 Da ^d
xenoxina-1, T1	2693,5 ± 0,2 Da	2694,6 Da ^e
xenoxina-1, T2	1662,0 ± 0,2 Da	1662,0 Da ^f
mistura de fragmentos trípsicos	2329,2 ± 0,6 Da	2329,7 Da ^g
xenoxina-1, alquilada	1164,5 ± 0,4 Da	1164,3 Da ^h
	744,4 Da	744,8 Da ⁱ
	709,4 Da	709,5 Da ^j
xenoxina-2	7337,5 ± 0,5 Da	7337,8 Da ^b
xenoxina-2, alquilada	8188,7 ± 0,5 Da ^c	8186,9 Da ^d
xenoxina-2, fragmento T2'	1661,9 ± 0,6 Da	1662,0 Da ^f
mistura de fragmentos trípsicos	1473,0 ± 0,2 Da	1473,7 Da ^k
xenoxina-2, alquilada	1164,7 ± 0,2 Da	1164,3 Da ^h
	873,5 Da	874,1 Da ⁱ
		709,5 Da ^j
xenoxina-3	7251,2 ± 0,4 Da	7250,6 Da ^b
xenoxina-3, alquilada	8100,6 ± 0,4 Da ^c	899,8 Da ^d

- a Massa correspondente ao sinal maioritário; um sinal menos intenso dá uma massa de $7243,8 \pm 0,4$ Da, provavelmente devido à adição de um átomo de oxigénio na primeira metionina.
- b Admitindo que as 4 pontes dissulfureto estejam intactas.
- c Indicando 8 compostos 4VP por proteína; para a xenoxina-1 um sinal menos intenso dá uma massa de $8091,8 \pm 0,9$ Da, provavelmente devido à adição de um átomo de oxigénio.
- d Xenoxina reduzida, alquilada com 8 compostos 4VP.
- e TCTTMK, cisteína ligada a IMSLPGEQITCCEGNMCNA; admitindo que as 2 pontes dissulfureto estejam intactas.
- f CVNLQANGIK, cisteína ligada a CLTLR, admitindo que a ponte dissulfureto esteja intacta.
- g IMSLPGEQITCCEGNMCNA, alquilado por 3 compostos 4VP.
- h CVNLQANGIK, alquilado por um composto 4VP.
- i FCASGR, alquilado por um composto 4VP.
- j CLTLR, alquilado por um composto 4VP.
- k ITCCEGNMCNA, alquilado por 3 compostos 4VP.
- l IMSLPGEK.

Exemplo 2: Clonagem de ADN complementar condificante para as xenoxinas

Para maior precisão sobre as técnicas gerais de manipulação dos ácidos nucleicos e de clonagem molecular que não são detalhados no exemplo que segue, pode-se recorrer à obra de Maniatis e col. (Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)).

2.1 Síntese dos iniciadores oligonucleóticos

Utilizando um sintetizador de oligonucleótidos ABI 380B (Applied Biosystems Inc.) seguindo os procedimentos padrão preconizados pelo construtor, sintetizam-se 0,2 μ moles dos oligonucleótidos seguintes. As bases degeneradas são expressas de acordo com o seu código de uma letra da "Internacional Union of Biochemistry" (I.U.B.); I corresponde à inosina.

OTG3278 (5'-ATGTCGACCARGARTGYGCIAARGARGA-3'), i. e., ramo sens-Q-E-C-A-K-E-D com adição de um local de restrição *SaI* na extremidade 5' afim de facilitar a sub-clonagem posterior (SEQ ID NO:26); e

OTG3279 (5'-ATAAGCTTCACATRTTICCYCRCARCA-3'), i. e., ramo anti-sens-C-C-E-G-N-M-C com adição de um local de restrição *HindIII* na extremidade 5' afim de facilitar a sub-clonagem posterior (SEQ ID NO:27).

Após desprotecção, os oligonucleótidos são purificados sobre μ -Bondapak C₁₈ (3,5 mm x 300 mm; Waters) com o auxílio de um gradiente 20% - 30% de acetonitrilo na presença de trietilamina/ácido acético 100 mM, pH 6,9. Os oligonucleótidos são destilados segundo as condições padrão bem conhecidas do perito e quantificados com o auxílio do seu espectro UV entre 230 e 340 nm.

2.2 Amplificação génica

O ARN mensageiro de *Xenopus laevis* é obtido segundo o método descrito em K. Richter et col., J. Biol. Chem. 261, (1986), p. 3676 e é então submetido a uma transcrição inversa iniciada por iniciadores degenerados. Obtém-se assim o ADNc que servirá de matriz para a amplificação. Realiza-se então uma etapa de amplificação génica por PCR (Polymerase Chain Reaction) sobre 0,5 μ g do ADNc em 50 μ l contendo 250 ng dos oligonucleótidos OTG3278 (ramo sens) e OTG3279 (ramo anti-sens) sintetizados segundo o exemplo 2.1, bem como Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; cloreto de potássio 10 mM; dicloreto de magnésio 1,6 mM; DTT 1 mM; 200 μ M de cada dos desoxirribonucleósidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Pharmacia) e 2,5 unidades de ADN Polimerase AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus). Sendo uma unidade a quantidade de enzima que permite a síntese de 10 nmoles de ADN durante 30 minutos de incubação. Realizam-se 30 ciclos de incubação segundo o protocolo seguinte:

Aquando dos 5 primeiros ciclos:

- desnaturação a 93°C durante 1 minuto (3 minutos aquando do primeiro ciclo);
- hibridação dos iniciadores a 50°C durante 2 minutos;

- polimerização efectuada a 72°C durante 30 segundos, com um aumento de temperatura de 1°C por 20 segundos;

Aquando dos 25 ciclos restantes:

- desnaturação a 93°C durante 1 minuto;
- hibridação a 60°C durante 1 minuto; e
- polimerização a 72°C durante 45 segundos.

2.3 Análise

Em electroforese sobre gel de agarose (1%) uma alíquota de 5 µl do produto de PCR apresenta uma larga banda de cerca de 120 pares de bases.

2.4 Clonagem do ADNc-PCR

Submete-se o ADN restante a uma digestão com o auxílio de enzimas de restrição *HindIII* e *SaI* (Gibco-BRL), depois separam-se os fragmentos de ADN segundo o seu tamanho com o auxílio de agarose de baixo ponto de fusão (agarose tipo II Sigma). Os ADN assim separados são purificados e clonados num bacteriófago M13 segundo os procedimentos padrão. Os fragmentos de ADNc-PCR assim clonados são utilizados como sonda para a selecção do banco de ADNc de pele de *Xenopus laevis*.

2.5 Selecção do banco de ADNc de pele de *Xenopus laevis*.

Prepara-se uma sonda marcada com ³²P utilizando o fragmento de ADNc-PCR, PCR1, de um clone preparado segundo o exemplo 2.4. A sequência da inserção PCR1 está representada na lista das sequências sob o número SEQ ID NO: 28. Marca-se a PCR1 com α[³²P]dATP (Amersham) segundo o método dos iniciadores aleatórios (Boehringer Mannheim).

Para a selecção utiliza-se o banco de ADNc de pele de *Xenopus laevis* construído no vector de expressão λgt11, segundo Kuchler et col., J. Biol. Chem. 265, (1990), p. 11731. Preparam-se caixas contendo cerca de 2 x 10⁴ colónias de fago e realiza-se uma impressão sobre filtro de nitrocelulose BA85 (Schleicher & Schüll).

Os filtros impressos são então hibridados com a sonda PCR1 ³²P em 2 x SET (cloreto de sódio-EDTA-Tris-HCl), 10 x solução de Denhardt e SDS 0,1% a 55°C.

Os clones positivos são utilizados em duas selecções consecutivas.

2.6 Sequenciamento dos clones de ADNc

Isola-se o ADN dos fagos positivos e as inserções de ADNc são sub-clonadas em vectores M13TG130 (Kieny e col., Gene 26, (1983), p. 91) segundo os métodos padrão.

Faz-se o sequenciamento destas inserções de ADNc segundo o método enzimático de Sanger e col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, (1977), p. 5463 com o auxílio do Sequenase Kit (US Biochemical Corp.).

Estabeleceu-se a sequência nucleotídica de um clone com uma inserção de ADNc constituída por 462 pares de bases. Esta sequência está representada na lista das sequências sob o número SEQ ID NO: 1 e contém um quadro de leitura aberto codificante para a xenoxina-1 que contém 84 aminoácidos. O péptido pré-xenoxina-1 tal como deduzido da sequência de ADNc começa com uma metionina de iniciação codificada pelo codão ATG (pb 39 a 41), seguida de um péptido sinal de 18 aminoácidos que precede a sequência da xenoxina-1 madura. A sequência de aminoácidos da xenoxina-1 madura deduzida corresponde exactamente à sequência completa de aminoácidos determinada por degradação de Edman da xenoxina-1 purificada segundo o exemplo 1.1 e representada na lista de sequências sob o número SEQ ID NO: 3.

O sinal de poliadenilação AATAAA encontra-se 12 pares de bases a montante da extremidade 3'.

2.7 Análise das sequências peptídicas

Compararam-se as sequências das xenoxinas com o banco de dados SWISS-PROT/PIR/GBTRAN release 24 utilizando PROSCAN, Ver.6.0 do suporte lógico ADN STAR (DNA STAR Inc).

Esta pesquisa só permitiu identificar famílias de péptidos que têm uma similaridade estrutural ao nível do esqueleto mas não ao nível da identidade de aminoácidos. Como ilustrado na figura 3 A, a identidade é apenas de 25,9% com um membro representativo da família das citotoxinas e apenas de 21,3% com uma neurotoxina curta se bem que a configuração das pontes dissulfureto seja a mesma. À parte as cisteínas, apenas se conserva nas três famílias de péptidos Asn⁵, Thr¹⁴ e Asn⁷¹. As Gly²⁰, Pro⁵⁰ e Lys⁵¹ que são comuns às citotoxinas e às neurotoxinas curtas são substituições não conservativas comparadas às xenoxinas. As Arg⁴¹ e Gly⁴² são deletadas nas xenoxinas.

No que diz respeito ao número de aminoácidos entre as cisteínas refere-se à Figura 3B. Para as três famílias, o número é comparável do lado N-terminal até à Cys³ e a partir da Cys⁶ até ao lado C-terminal. Pelo contrário, nas xenoxinas o número de resíduos entre as Cys³ e Cys⁴ é mais pequeno e entre as Cys⁴ e Cys⁵ e entre as Cys⁵ e Cys⁶ é mais importante.

Como ilustrado na Figura 4, a parte C-terminal das xenoxinas (Cys³⁷ a Asn⁶⁵, 29 resíduos) compreendendo as Cys⁴ e Cys⁸ partilham uma identidade de aminoácidos de 50% com 27 aminoácidos (Cys⁸⁵ a Asn¹¹¹) do receptor humano da activina. Do lado N-terminal das xenoxinas, não se encontra identidade das sequências nem mesmo ao nível das cisteínas.

Exemplo 3: Preparação das xenoxinas recombinantes

3.1. Construção de um vector de expressão da xenoxina

As xenoxinas de acordo com a invenção podem ser obtidas por técnicas de engenharia genética, especialmente utilizando como célula hospedeira leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

Para isto, sintetiza-se um fragmento de ADN codificante para a xenoxina-1 madura tal como identificada sob o número SEQ ID NO: 1, indo da base na posição 93 até à base na posição 290 e clonado no bacteriófago M13TG131 (M.P. Kieny e col., Gene 26, (1983), p. 91).

Constrói-se um plasmídeo de expressão da xenoxina-1 que permite a síntese e a secreção por *S. cerevisiae* de acordo com o pedido de patente internacional PCT/FR90/00306 que descreve os péptidos sinal úteis para a secreção de uma proteína heteróloga pela levedura.

O fragmento SphI-SmaI de 1045 pares de bases do bacteriófago M13TG3846 descrito no exemplo 1.E. do referido pedido de patente internacional é transferido para o vector M13TG3869 (descrito no exemplo 1.D. do mesmo pedido) anteriormente digerido por SphI e SmaI. Obtém-se assim o vector M13TG4803 que transporta:

- o promotor do gene MF α 1, seguido de um codão ATG,
- a sequência XII (ver PCT/FR/90/00306),
- a sequência “pro” mutada do gene MF α 1 seguido dos codões codificantes para Lys-Arg,
- a sequência codificante para rHV2Lys47.

A fim de substituir a sequência codificante para rHV2Lys47 pela codificante para a xenoxina-1, introduz-se um local HindIII na sequência codificante para “pro” mutada de MF α 1, segundo o exemplo 3.B do pedido internacional.

Depois, introduz-se um fragmento HindIII-BamHI que transporta a sequência codificante para a xenoxina-1 para esse vector anteriormente tratado por HindIII e BamHI para eliminar a sequência codificante para rHV2Lys47.

Introduz-se o fragmento SphI-SalI de M13TG4803 no plasmídeo pTG3828 (ver exemplo 1.B do pedido internacional) aberto aos locais SphI e SalI para dar o vector de expressão da xenoxina-1 que comporta:

- a sequência do gene URA3 deletada do seu promotor (URA3-d),
- o promotor do gene MF α 1, seguido de um ATG,
- a sequência XII como péptido sinal,
- a sequência “pro” mutada do gene MF α 1 seguido dos codões para Lys-Arg,
- a sequência codificante para a xenoxina-1,
- o terminador de transcrição do gene codificante para PGK da levedura,

- um fragmento de pBR322 que permite a replicação e a selecção em *E. coli*,
- um fragmento do plasmídeo 2 μ que possui elementos estruturais necessários à replicação e à equipartição miótica na levedura.

Transforma-se uma estirpe de *S. cerevisiae* que se meterá em cultura em condições conhecidas.

3.2 Construção de pTG8709 e análise da xenoxina-1 madura segregada no meio de cultura.

Amplifica-se por PCR a sequência codificante para a xenoxina-1 madura munida de um local EagI em 5' e de um local Sall em 3'. Utiliza-se a título de matriz M12TG4414 ou pTG4414 (Kolbe e col., J. Biol. Chem., 268, (1993) p. 1658) e os iniciadores:

OTG5770:

5'-TACGTCGGCCGTTACAAGAGACTGAAATGTGTGAATTTACAAGCG-3' e

OTG5771:

5'-AGTTTGTCTGACTCAAGCATTGCACATGTTTCCT-3'

O fragmento assim gerado é integrado em M13TG9800 previamente digerido por EagI e Sall para dar M13TG8703. O vector M13TG9800 é proveniente de M13TG131 no qual são inseridos os elementos essenciais à expressão de uma proteína de interesse, a saber:

- o promotor do gene MF α 1, seguido de um codão ATG (Inokuchi e col., Mol. Cell. Biol. 7 (1987) p.3185)
- a sequência pré BGL2 (β -glucanase 2; Klebl e Tanner, J. Bacteriol., 171 (1989) p. 6259)
- a sequência pro da defensina A (Dimarcq e col., EMBO J. 9 (1990) p. 2507) na qual se introduziu, de maneira silenciosa, um local EagI na sua extremidade 3' (cobrindo os codões precedentes os codificantes para os resíduos Lys-Arg em 3')
- locais de restrição para a inserção de uma sequência de ADN de interesse.

Introduz-se o fragmento SphI-Sall isolado de M13TG8703 e transportando a cassete de expressão da xenoxina-1 madura entre os mesmos locais de pTG4812 para obter pTG8709. O vector pTG4812 deriva de pTG3828 mas compreende além disso uma cassete para a expressão do gene KEX2 de levedura inserida ao nível da junção da parte 2 μ e da parte pBR322.

Transforma-se pTG8709 numa estirpe *Saccharomyces cerevisiae*. Podem citar-se a título de exemplo TGY47.1 (MAT α , pra1, prb1, prc1, cps1, ura3-delta5, leu2-3, leu 2-112, his) ou TGY73.4 que deriva da precedente mas apresenta uma prototrofia para a leucina (Leu⁺).

Selecciona-se um transformante TGY73.4/pTG8709 que se cultiva a 28°C em meio selectivo mínimo (0,67% de bases azotadas por levedura YNB (Yeast Nitrogen Base) sem aminoácido, 1% de casaminoácidos, 2% de glucose e 2% de bactoagar).

Após 60 horas de cultura, concentra-se o sobrenadante da cultura por ultrafiltração sobre membrana YM2/centrifugação segundo as técnicas convencionais. Submete-se o concentrado a uma electroforese desnaturante sobre gel de poliacrilamida (15,3% em poliacrilamida). Transferem-se as proteínas sobre membrana PVDF e submete-se o material correspondente à massa molecular esperada (cerca de 70 kDa) a um sequenciamento dos aminoácidos N-terminais.

Lê-se, de modo maioritário, uma sequência que corresponde à sequência N-terminal esperada para a xenoxina-1 madura.

LISTA DE SEQÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) DEPOSITANTE:

- (A) NOME: TRANSGENE S.A.
- (B) RUA: 11 RUA DE MOLSHEIM
- (C) CIDADE: ESTRASBURGO CEDEX
- (D) PAÍS: FRANÇA
- (E) CÓDIGO POSTAL: 67082

(F) TELEFONE: (33) 88 27 91 00

(G) TELECÓPIA: (33) 88 22 58 07

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Família de péptidos, designados xenoxinas.

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 28

(iv) FORMA LEGÍVEL POR COMPUTADOR:

(A) TIPO DE SUPORTE: Floppy disk

(B) COMPUTADOR: IBM PC compatível

(C) SISTEMA DE EXPLORAÇÃO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SUPORTE LÓGICO: Patentin Release # 1,0, Versão # 1,25 (OEB)

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 1

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 462 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc por ARNm

(ix) CARACTERÍSTICA ADICIONAL:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) LOCALIZAÇÃO: 39..293

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /codão_star= 39

/produto= "préxenoxina-1"

/nota= "o péptido sinal compreende os dezoito primeiros resíduos de aminoácidos"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 1:

AAGATGTGCT GTGATTGGTT GAAAGCTTGA GCCACACA ATG CGT TAC GCC ATC 53
Met Arg Tyr Ala Ile
1 5

Met Arg Tyr Ala Ile Val Phe Phe Leu Val Cys Val Ile Thr Leu Gly
1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Cys Val Asn Leu Gln Ala Asn Gly Ile Lys Met Thr
20 25 30

Gln Glu Cys Ala Lys Glu Asp Thr Lys Cys Leu Thr Leu Arg Ser Leu
35 40 45

Lys Lys Thr Leu Lys Phe Cys Ala Ser Gly Arg Thr Cys Thr Thr Met
50 55 60

Lys Ile Met Ser Leu Pro Gly Glu Gln Ile Thr Cys Cys Glu Gly Asn
65 70 75 80

Met Cys Asn Ala

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 3

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 66 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 3:

Leu Lys Cys Val Asn Leu Gln Ala Asn Gly Ile Lys Met Thr Gln Glu
1 5 10 15

Cys Ala Lys Glu Asp Thr Lys Cys Leu Thr Leu Arg Ser Leu Lys Lys
20 25 30

Thr Leu Lys Phe Cys Ala Ser Gly Arg Thr Cys Thr Thr Met Lys Ile
35 40 45

Met Ser Leu Pro Gly Glu Gln Ile Thr Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys
50 55 60

Asn Ala
65

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 4

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 66 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 4:

Leu Lys Cys Val Asn Leu Gln Ala Asn Gly Ile Lys Met Thr Gln Glu
1 5 10 15

Cys Ala Lys Glu Asp Asn Lys Cys Leu Thr Leu Arg Ser Leu Lys Lys
20 25 30

Thr Leu Lys Phe Cys Ala Ser Asp Arg Ile Cys Lys Thr Met Lys Ile
35 40 45

Met Ser Leu Pro Gly Glu Lys Ile Thr Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys
50 55 60

Asn Ala
65

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 5

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 66 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 5:

Leu Lys Cys Val Asn Leu Gln Ala Asn Gly Val Lys Met Thr Gln Glu
1 5 10 15

Cys Ala Lys Glu Asp Asn Lys Cys Leu Thr Leu Arg Ser Leu Lys Lys
20 25 30

Thr Leu Lys Phe Cys Ala Ser Asp Arg Ile Cys Lys Thr Met Lys Ile
35 40 45

Ala Ser Leu Pro Gly Glu Gln Ile Thr Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys
50 55 60

Asn Ala
65

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 37 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ix) CARACTERÍSTICA ADICIONAL:

(A) NOME/CHAVE: péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..37

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota= "parte analisada de xenoxina-1, alquilada"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 6:

Leu Lys Cys Val Asn Leu Gln Ala Asn Gly Ile Lys Met Thr Gln Glu
1 5 10 15

Cys Ala Lys Glu Asp Thr Lys Cys Leu Thr Leu Arg Ser Leu Lys Lys
 20 25 30

Thr Leu Lys Phe Cys
 35

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 43 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA ADICIONAL:

(A) NOME/CHAVE: péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..43

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota= "xenoxina-1, alquilada, fragmento CNBR1(1)"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 7:

Leu Lys Cys Val Asn Leu Gln Ala Asn Gly Ile Lys XAA XAA Gln Glu
1 5 10 15

Cys Ala Lys Glu Asp Thr Lys Cys Leu Thr Leu Arg Ser Leu Lys Lys
20 25 30

Thr Leu Lys Phe Cys Ala Xaa Xaa Xaa Thr Cys
35 40

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 31 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA ADICIONAL:

- (A) NOME/CHAVE: péptido
- (B) LOCALIZAÇÃO: 1..31
- (D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota= "xenoxina-1, alquilada, fragmento CNBR1 (2)"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 8:

Thr Gln Glu Cys Ala Lys Glu Asp Thr Lys Cys Leu Thr Xaa Arg Ser
1 5 10 15

Leu Lys Lys Thr Leu Lys Phe Cys Ala Xaa Gly Arg Thr Cys Thr
20 25 30

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 8 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota= "xenoxina-1, alquilada, fragmento T1
(2)"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 12:

Ile Met Ser Leu Pro Gly Glu Gln Ile Thr Xaa Xaa Glu Gly Asn Met
1 5 10 15

Xaa Asn Ala

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 13 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA ADICIONAL:

(A) NOME/CHAVE: péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..13

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota= "xenoxina-1, alquilada, fragmento
CNBR2 (1)"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 13:

Ser Leu Pro Gly Glu Gln Ile Thr Cys Cys Glu Gly Asn
1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 16 aminoácidos

- (B) TIPO: aminoácido
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA ADICIONAL:

- (A) NOME/CHAVE: péptido
- (B) LOCALIZAÇÃO: 1..16
- (D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota= "xenoxina-1, alquilada, fragmento CNBR2 (2)"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 14:

Lys Ile Met Ser Leu Pro Gly Glu Gln Ile Thr Cys Cys Glu Gly Asn
1 5 10 15

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 18 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA ADICIONAL:

- (A) NOME/CHAVE: péptido
- (B) LOCALIZAÇÃO: 1..18
- (D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota= "xenoxina-1, alquilada, fragmento CL2"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 15:

Ile Met Ser Leu Pro Gly Glu Gln Ile Thr Cys Cys Glu Gly Asn Met
 1 5 10 15

Cys Asn

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 56 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA ADICIONAL:

(A) NOME/CHAVE: péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..56

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota= "parte analisada da xenoxina-2,
 alquilada"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 16:

Leu Lys Cys Val Asn Leu Gln Ala Asn Gly Ile Lys Met Thr Gln Glu
 1 5 10 15

Cys Ala Lys Glu Asp Asn Lys Cys Leu Thr Leu Arg Ser Leu Lys Lys
 20 25 30

Thr Leu Lys Phe Cys Ala Xaa Asp Arg Ile Cys Lys Thr Met Lys Ile
 35 40 45

Met Ser Le Pro Gly Glu Xaa Ile
 50 55

Ile Ala Ser Leu Pro Gly Glu Gln Ile Thr Cys Cys Glu Gly Asn Met
1 5 10 15

Cys Asn Ala

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA ADICIONAL:

- (A) NOME/CHAVE: péptido
- (B) LOCALIZAÇÃO: 1..19
- (D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota= "xenoxina-3, alquilada, fragmento T6"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 25:

Ile Ala Ser Leu Pro Gly Glu Gln Ile Thr Xaa Xaa Glu Gly Asn Met
1 5 10 15

Xaa Asn Ala

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 28 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA ADICIONAL:

(A) NOME/CHAVE: modified_base

(B) LOCALIZAÇÃO: 20

(E) OUTRAS INFORMAÇÕES: /mod_base= i

(ix) CARACTERÍSTICA ADICIONAL:

(A) NOME/CHAVE: misc_feature

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..28

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota= "oligonucleótido OTG3278"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 26:

ATGTCGACCA RGARTGYGCN AARGARGA

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 28 PARES DE BASES

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA ADICIONAL:

(A) NOME/CHAVE: modified_base

(B) LOCALIZAÇÃO: 17

(F) OUTRAS INFORMAÇÕES: /mod_base= i

(ix) CARACTERÍSTICA ADICIONAL:

(A) NOME/CHAVE: misc_feature

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..28

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota= "oligonucleótido OTG3279"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 27:

ATAAGCTTCA CATRTTNCCY TCRCARCA

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 149 PARES DE BASES

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA ADICIONAL:

(A) NOME/CHAVE: misc_feature

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..149

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /produto= "PCR1"

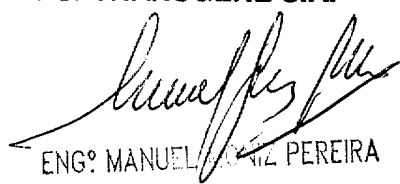
/nota= "fragmento de ADNc-PCR utilizado para a selecção descrita no exemplo 2.5."

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 28:

CAGGAGTGTG CGAAGGAGGA TAACAAATGC TTAACATTAA GATCGTTAAA AAAACTTTA	60
AAGTTTTGTG CCTCTGATCG AATATGTAAG ACTATGAAA TAATGTCTCT GCCTGGGGAA	120
AAGATTACAT GTGCGAAGG CAACATGTG	149

Lisboa, 26 JUL. 2001

Por TRANSGENE S.A.



ENG. MANUEL LUIZ PEREIRA

Agente Oficial da Propriedade Industrial

50

Arco da Conceição, 3, 1.º - 1100 LISBOA.

REIVINDICAÇÕES

1. Péptido caracterizado por compreender uma sequência de aminoácidos, a qual:
 - a. contém pelo menos 8 cisteínas que estão ligadas por 4 pontes dissulfureto segundo a configuração Cys¹ com Cys³, Cys² com Cys⁴, Cys⁵ com Cys⁶ e Cys⁷ com Cys⁸;
 - b. contém 0 a 3 aminoácidos do lado do N-terminal da Cys¹, 9 a 14 aminoácidos entre as Cys¹ e Cys², 3 a 7 aminoácidos entre as Cys² e Cys³, 11 a 18 aminoácidos entre as Cys³ e Cys⁴, 1 a 6 aminoácidos entre as Cys⁴ e Cys⁵, 7 a 15 aminoácidos entre as Cys⁵ e Cys⁶, nenhum aminoácido entre as Cys⁶ e Cys⁷, 3 a 5 aminoácidos entre as Cys⁷ e Cys⁸ e 0 a 10 aminoácidos do lado C-terminal da Cys⁸; e
 - c. apresenta uma identidade de aminoácidos após alinhamento de pelo menos 40% com a sequência de aminoácidos identificada sob o número SEQ ID NO: 3.

2. Péptido caracterizado por compreender uma sequência de aminoácidos, a qual:
 - a. contém pelo menos 8 cisteínas que, quando o péptido adota a sua configuração dobrada, estão ligadas por 4 pontes dissulfureto segundo a configuração Cys¹ com Cys³, Cys² com Cys⁴, Cys⁵ com Cys⁶ e Cys⁷ com Cys⁸;
 - b. contém 0 a 3 aminoácidos do lado do N-terminal da Cys¹, 9 a 14 aminoácidos entre as Cys¹ e Cys², 3 a 7 aminoácidos entre as Cys² e Cys³, 11 a 18 aminoácidos entre as Cys³ e Cys⁴, 1 a 6 aminoácidos entre as Cys⁴ e Cys⁵, 7 a 15 aminoácidos entre as Cys⁵ e Cys⁶, nenhum aminoácido entre as Cys⁶ e Cys⁷, 3 a 5 aminoácidos entre as Cys⁷ e Cys⁸ e 0 a 10 aminoácidos do lado C-terminal da Cys⁸; e

- c. apresenta uma identidade de aminoácidos após alinhamento de pelo menos 40% com a sequência de aminoácidos identificada sob o número SEQ ID NO: 3.

3. Péptido de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por a sequência de aminoácido conter 2 aminoácidos do lado N-terminal da Cys¹, 10 a 13 aminoácidos entre as Cys¹ e Cys², 4 a 6 aminoácidos aminoácidos entre as Cys² e Cys³, 12 a 17 aminoácidos entre as Cys³ e Cys⁴, 1 a 5 aminoácidos entre as Cys⁴ e Cys⁵, 8 a 14 aminoácidos entre as Cys⁵ e Cys⁶, nenhum aminoácido entre as Cys⁶ e Cys⁷, 4 aminoácidos entre as Cys⁷ e Cys⁸ e 2 aminoácidos do lado C-terminal da Cys⁸.

4. Péptido de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado por a sequência de aminoácidos apresentar uma identidade de aminoácidos de pelo menos 50%, de preferência de pelo menos 60% com a sequência de aminoácidos identificada sob o número SEQ ID NO: 3.

5. Péptido de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por a identidade em aminoácidos ser pelo menos 70%.

6. Péptido de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por compreender uma sequência de aminoácidos que contém 0 a 3 aminoácidos do lado do N-terminal da Cys¹, 13 aminoácidos entre as Cys¹ e Cys², 6 aminoácidos entre as Cys² e Cys³, 12 aminoácidos entre as Cys³ e Cys⁴, 5 aminoácidos entre as Cys⁴ e Cys⁵, 14 aminoácidos entre as Cys⁵ e Cys⁶, nenhum aminoácido entre as Cys⁶ e Cys⁷, 4 aminoácidos entre as Cys⁷ e Cys⁸ e 0 a 10 aminoácidos do lado C-terminal da Cys⁸ e que apresenta uma identidade de aminoácidos após alinhamento de pelo menos 80%, de preferência 90%, com a sequência de aminoácidos identificada sob o número SEQ ID NO: 3.

7. Péptido de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a identidade de aminoácidos ser pelo menos uma sequência tal como identificada sob o número SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 5.

8. Péptido de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a identidade de aminoácidos ser pelo menos 95% com uma sequência tal como identificada sob o número SEQ ID NO: 3.

9. Péptido de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por a sequência de aminoácidos compreender uma sequência tal como identificada sob o número SEQ ID NO:3.

10. Processo de preparação de um péptido de acordo com as reivindicações 1 a 9, caracterizado por para se isolar o referido péptido a partir de matéria segregada pela pele de rã, de preferência de *Xenopus laevis*,

- a. se divide em fracções a matéria segregada pela pele da rã por precipitação com o auxílio de sulfato de amónio ou um agente precipitante equivalente,
- b. se submetem os precipitados que se formam entre 30% e 70% de saturação em sulfato de amónio, de preferência entre 30% e 60%, ou em condições equivalentes, a uma cromatografia por permeação de gel, e
- c. se recolhe a fracção peptídica que elui tardiamente.

e se necessário,

d. se submete esta fracção peptídica a uma cromatografia HPLC de permuta de catiões eventualmente seguida de uma cromatografia HPLC de fase inversa.

11. Fragmento de ADN isolado, caracterizado por compreender uma sequência codificante para um péptido de acordo com uma das reivindicações 1 a 9.

12. Fragmento de ADN de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por compreender uma sequência codificante para o precursor de um péptido de acordo com uma das reivindicações 1 a 9.

13. Fragmento de ADN de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por a sequência codificar para uma sequência de aminoácidos, tal como identificada sob o número SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 5.

14. Fragmento de ADN de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por compreender uma sequência de ácidos nucleicos codificante para uma sequência de

aminoácidos tal como identificada sob o número SEQ ID NO:1 e indo da base em posição 93 até à base em posição 290.

15. Fragmento de ADN de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por compreender uma sequência de ácidos nucleicos codificante para uma sequência de aminoácidos tal como identificada sob o número SEQ ID NO:1 e indo do ácido nucleico em posição 39 até ao ácido nucleico em posição 290.

16. Cassete de expressão de um fragmento de ADN isolado de acordo com uma das reivindicações 11 a 15, caracterizada por o referido fragmento ser colocado sob o controlo de elementos permitindo a sua transcrição e/ou a sua tradução na célula transformada considerada.

17. Cassete de expressão de acordo com a reivindicação 16, caracterizada por compreender além disso uma sequência pré e uma sequência pro, especialmente a sequência pro da defensina A de *Phormia terranova*.

18. Cassete de expressão de acordo com a reivindicação 16 ou 17, caracterizada por compreender um fragmento de ADN de acordo com a reivindicação 12.

19. Célula transformada com uma cassete de expressão de acordo com uma das reivindicações 16 a 18, caracterizada por a referida cassete de expressão ser quer integrada no genoma da célula transformada quer transportada por um vector de expressão.

20. Célula transformada de acordo com a reivindicação 19, caracterizada por ser escolhida entre o grupo constituído por *S. cerevisiae* e *E. coli*.

21. Célula transformada de acordo com a reivindicação 19, caracterizada por ser de origem mamífera.

22. Processo de preparação de um péptido de acordo com uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado por se cultivar uma célula transformada de acordo com uma das reivindicações 19 a 21 sobre um meio apropriado e recuperar o péptido a partir da referida cultura.

23. Composição farmacêutica de uso humano ou veterinário caracterizada por compreender como agente activo pelo menos um péptido de acordo com uma das reivindicações 1 a 9, um vector contendo uma cassette de expressão de acordo com uma das reivindicações 16 a 18 ou um célula transformada de acordo com uma das reivindicações 19 a 21.

24. Anticorpo, monoclonal ou policlonal, caracterizado por reconhecer um péptido de acordo com uma das reivindicações 1 a 9.

25. Estojos de diagnóstico compreendendo um péptido de acordo com uma das reivindicações 1 a 9 ou um anticorpo de acordo com a reivindicação 24.

Lisboa, 26 JUL. 2001

Por TRANSGENE S.A.



ENG. MANUEL MONIZ PEREIRA

Agente Oficial da Propriedade Industrial

Arco da Conceição, 3, 1.º - 1100 LISBOA

RESUMO

FAMÍLIA DE PÉPTIDOS DESIGNADOS XENOXINAS

Xenoxina ^a Xenoxin ^a	LKCVNLQANGIKMTQECAKEDTKCLTLRSLKKT-LKF---CASGRTCTTMKIMSLPGEQITCCEGNMCNA
Citotoxina ^b Citotoxin ^b	LKCHNTQLPFIYKT—CPEGKNLCFKA-TLKKFPLKIPIKRGCAD—NCPKNSALL----KYVCCSTDKCN
Neurotoxina ^c Neurotoxin ^c	RRCFNQSSQPKTTKSCPPGENSCYNKQWRDHRGSI--TERGCG----CPKVK----PGIKLRCCSEDCNN

		C		C	C		C	C		CC	C	
XENOXINAS XENOXIN	2		13	6	12	5	14	4		2		
CITOTOXINAS CITOTOXINS	2		10-11	6	15-17	3	10	4		1-2		
NEUROTOXINAS NEUROTOXINS	2		12-13	4-6	15-16	1	8-11	4		2		

Família de péptidos designados xenoxinas, em que podem ser isolados membros representativos da matéria segregada pela pele de *Xenopus laevis* e que possuem propriedades farmacológicas de valor.

1/4



FIGURA 1

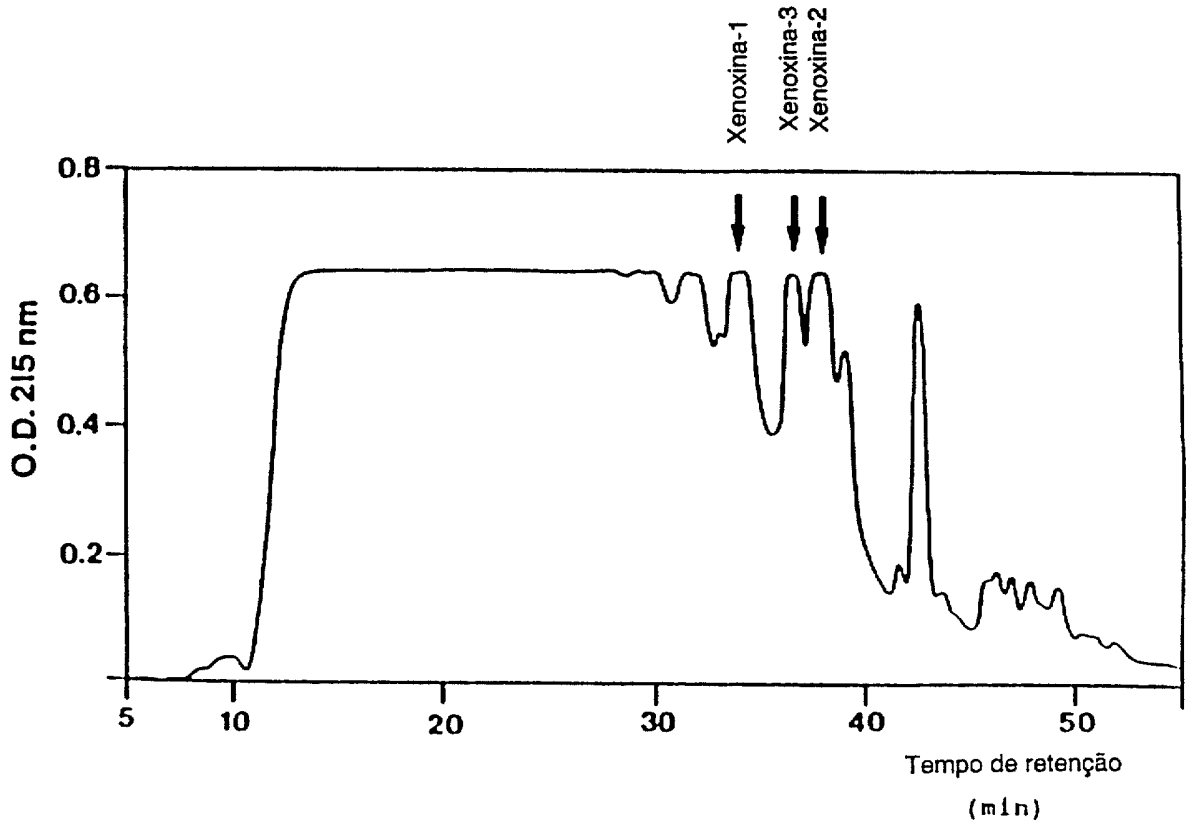


FIGURA 2

Xenoxina^a LKCVNLQANGIKMTQECAKEDTKCLTLRSLKKT-LKF-----CASGRTCTTMKIMSLPGEQITCCEGNMCNA
 Citotoxina^b LKCHNTQLPFIYKT--CPEGKNLCFKA-TLKKFPLKIPIKRGCAD--NCPKNSALL----KYVCCSTDKCN
 Neurotoxina^c RRCFNQQSSQPKTTKSCPPGENSCYHKQWRDHRSI--TERGCG----CPKVK----PGIKLRCCESDCNH

FIGURA 3A

	C	C	C	C	C	CC	C
Xenoxinas	2	13	6	12	5	14	4 2
Citotoxinas	2	10-11	6	15-17	3	10	4 1-2
Neurotoxinas	2	12-13	4-6	15-16	1	8-11	4 2

FIGURA 3B

