

9.8.824



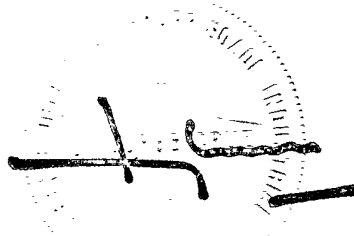
MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

De acordo com o presente invento são construídos novos genes que codificam factor de crescimento ácido de fibroblastos (aFGF) mutante, bovino e humano. Estes genes únicos derivam de genes que codificam aFGF bovino e humano devido à inclusão de mutações pontuais específicas. Cada gene construído é ingerido num vector de expressão que é usado para transformar um hospedeiro apropriado.

=====  
MERCK & CO., INC.

"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE MUTANTE DO FACTOR DE CRESCIMENTO ACIDO DE FIBROBLASTOS"



As células hospedeiras transformadas produzem um mutante recombinante de aFGF único, humano ou bovino, o qual é purificado e possui actividade biológica aumentada ou melhorada na ausência de heparina se comparado com as formas não alteradas.

Breve descrição das ilustrações

A figura 1 é um diagrama do plasmídeo pKK223-3, que contém um gene que codifica para o r-aFGF mutante.

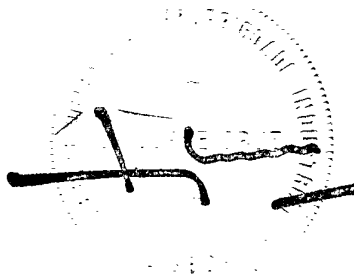
A figura 2 compara as estabilidades relativas do haFGF recombinante do tipo selvagem e de vários mutantes, na presença de heparina (A) e sem heparina (B).

Fundamentos da descoberta

A descoberta de substâncias que controlam o crescimento de células animais, nomeadamente de células humanas, e o seu mecanismo de acção é, actualmente, um assunto de maior importância na investigação biomédica sobre reparação de tecidos e cura de ferimentos. Os factores de crescimento de fibroblastos (FGFs), mitogénicos para vários tipos de células incluindo muitas das células de origem mesodérmica, têm sido identificados e foi sugerida a possibilidade de induzirem a mitose o que tem como resultado a reparação de tecidos. A actividade mitogénica dos fibroblastos foi inicialmente observada em extractos de tecido do sistema nervoso central. Mitogénicos de fibroblasto do cérebro foram pela primeira vez descritos por Trowell et al., J. Exp. Biol. 16: 60-70 (1939) e por Hoffman, Growth 4:361-376 (1940). No seguimento dos trabalhos anteriores foi demonstrado que extractos pituitários possuem também uma acti-

vidade mitogénica potente sobre células fibroblastoides, Amelin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 2702-2706 (1973). A purificação parcial dos factores de crescimento pituitários e cerebrais mostrou que estes possuem actividade mitogenica para uma grande variedade de tipos de celulas diferenciadas incluindo celulas vasculares endoteliais, Gospodarowicz et al., Natl. Cancer. Inst. Monogr. 48: 109-130 (1978). O factor de crescimento de fibroblastos foi inicialmente considerado como sendo constituído por um único peptido, formado a partir da proteina basica da mielina após proteolise limitada. Foi recentemente demonstrado que o FGF existe em duas formas, FGF ácido (aFGF) e FGF basico (bFGF) e que ambas as formas podem ser isoladas e purificadas a partir do cerebro humano, Thomas and Gimenez-Gallego, TIBS 11: 81-84 (1986). Numerosos tipos de células respondem à estimulação com aFGF ou bFGF sintetizando DNA e dividindo-se, tais como fibroblastos primários, células endoteliais vasculares e da córnea, condrocitos, osteoblastos, mioblastos, musculos lisos, células gliais e neuroblastos, Esch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6507-6511 (1985); Kuo et al., Fed. Proc. 44: 695 (1985); Gensburger et al., C.R. Acad. Sc. Paris 303: 465-468 (1986). O aFGF puro do cerebro bovino actua não só como um potente mitogeneo para as células endoteliais vasculares em cultura mas também induz o crescimento in vivo de vasos sanguineos, Thomas, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6409-6413 (1985). A actividade mitogenica do aFGF purificado também pode ser utilizada para promover a cura de ferimentos, Thomas, U.S. Patent 4, 444, 760,

O factor de crescimento acido de fibroblastos foi originalmente purificado até à homogeneidade a partir de cerebro bovino com base na sua actividade mitogenica para fibroblastos de BALB/c 3T3, Thomas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 357-361 (1984). Este



Este factor de crescimento de origem cerebral foi purificado e denominado várias vezes em multiplos laboratoriais com base na : actividade mitogénica para células endoteliais vasculares e astrogliais (factor de crescimento de células endoteliais e factor de crescimento astrogliar I), origem (factor de crescimento de retina, factor de crescimento de alho II e, talvez, o factor de crescimento de cerebro) e capacidade de ligação a heparina-Sepharose (factor de crescimento de ligação à heparina da classe I e factor de crescimento alfa de ligação à heparina), Thomas and Gimenez-Gallego TIBS 11: 81-84 (1986). A sequência de aminoácidos de aFGF bovino foi determinada, considerada possuidora de grande homologia com o FGF basico e relacionada com os mitogénicos de fibroblastos interleuquina 1-alfa e 1-beta, Gimenez-Gallego et al., Science 230: 1385-1388 (1985). A sequência completa de aminoácidos do aFGF humano foi determinada a partir da proteina purificada, Gimenez-Gallego et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 138: 611-617 (1986) e a partir do gene, Jaye et al., Science 233: 541-545 (1986).

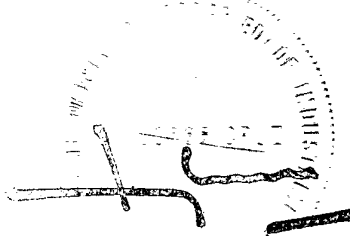
O aFGF nativo, purificado a partir do cerebro ou recombinante (r-aFGF) requiere a coadministração de heparina para uma óptima estimulação de fibroblastos Balb/C 3T3 e de células endoteliais vasculares em cultura. Os aFGF de cerebro ou recombinante possuem uma actividade de somente cerca de 1% a 5%. Nessas células em cultura, na ausência de heparina, se comparada com a actividade óptima na presença de heparina. Embora as doses requeridas para a actividade máxima de aFGF sejam relativamente baixas é preferível administrar aFGF em heparina uma vez que esta pode provocar efeitos secundarios nocivos. O aFGF puro, para além das condições padrão que destroem a actividade da maior parte das proteínas tais como temperaturas elevadas, pH e presença de proteases é também lábil à liofilização e oxidação. O aFGF puro forma, através de ligações dissulfidicas



provocadas por oxidação, ligações dentro das suas próprias cadeias ou entre cadeias diferentes e pode ser recuperado na sua forma activa por redução dissulfidica com ditiotreitól 20 mM. A heparina pode inibir a agregação de aFGF provocada pela formação de ligações dissulfidicas intermoleculares. Este glicosaminoglicano heterogeno também é reconhecido como sendo capaz de proteger o aFGF da desnaturação pelo calor e da degradação proteolitica pela tripsina. Consequentemente tanto heparina exógena ou endogena são necessárias para a actividade in vivo associada à reparação de tecidos. O presente invento coloca ao dispor formas mutantes únicas de aFGF recombinante que possuem uma actividade biologica aumentada na ausência de heparina se comparada com aFGF nativo.

#### Objectivo do invento

É, consequentemente, um objectivo do presente invento a conversão, através de mutação, de genes de aFGF bovinos e humanos capazes de codificarem para proteínas que são mais activas na ausência de heparina do que a proteína nativa ou recombinante. Outro objectivo é a incorporação de genes especificos em vectores de clonagem apropriados. Um objectivo adicional é a transformação de um hospedeiro apropriado em cada um dos vectores recombinantes e a indução da expressão de genes de aFGF mutantes especificos. Outro objectivo é a isolamento e purificação de aFGF bovino e humano biologicamente activo. Estes e outros objectivos do presente invento ficarão claros a partir da seguinte descrição.

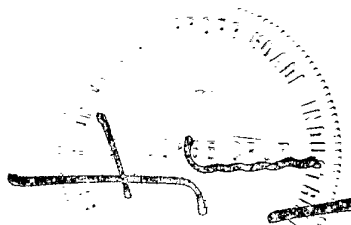


Resumo do Invento

Novos genes que codificam para aFGF bovino e humano são construídos. Os genes únicos têm origem em genes que codificam para aFGF bovino e humano recombinante nativo através de mutações pontuais específicas. Cada gene construído é inserido num vector de expressão que é usado para transformar um hospedeiro apropriado. As células transformadas hospedeiras produzem um aFGF mutante recombinante unico, humano ou bovino, o qual é purificado e possui uma actividade biologica aumentada ou melhorada na ausência de heparina se comparada com formas não mutadas.

Descrição detalhada

O factor de crescimento acido de fibroblastos existe sob várias formas microheterogénicas que são isoladas a partir de tecidos de várias origens e tipos de células que se sabe conterem aFGF. As formas microheterogénicas que são usadas dizem respeito a um único produto de um gene, o qual é uma proteina produzida a partir de uma única unidade de um gene de DNA que é modificada estruturalmente a seguir à tradução. Estas modificações estruturais, contudo, não resultam em nenhuma alteração significativa da actividade biologica do peptido. Actividade biologica e biologicamente activo são termos aqui usados alternadamente e definidos como a capacidade do aFGF nativo, recombinante ou mutante recombinante para estimular a síntese de DNA em fibroblastos Balb/C 3T3 em repouso tal como descritos no Exemplo 7, para estimular qualquer dos tipos de células descritos acima ou para efectuar qualquer uma das funções des-

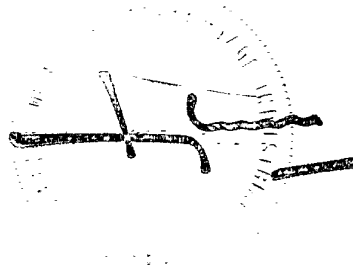


critas no meio científico. As modificações podem ter lugar quer in vivo quer durante o processo de isolamento e purificação. A modificação in vivo resulta na, mas não é a isso limitada, acetilação da extremidade N, proteólise, glicosilação ou fosforilação. A proteólise pode incluir a exoproteólise, no caso de um ou mais aminoácidos terminais serem, sequencialmente, clivados enzimaticamente de forma a produzir formas microheterogênicas possuidoras de menos aminoácidos do que o produto do gene original. A proteólise também pode incluir a modificação endoproteolítica resultante da ação de endoproteases que clivam o peptido em locais específicos ao longo da sequência de aminoácidos. Modificações similares podem ocorrer durante o processo de purificação o que resulta da mesma forma na produção de formas microheterogênicas. A modificação mais frequente que ocorre durante a purificação é a proteólise a qual é reduzida ao mínimo pelo uso de inibidores de proteases. Na maior parte das circunstâncias, uma mistura de formas microheterogênicas está presente após a purificação de aFGF nativo. O aFGF nativo difere do aFGF isolado e purificado a partir de tecidos ou células que contenham aFGF.

O invento considera a inclusão de todas as formas microheterogênicas animais do factor de crescimento ácido de fibroblastos. As formas microheterogênicas de aFGF escolhidos incluem o bovino e a humana. A forma microheterogênica de aFGF bovino preferida inclui uma forma de 154 aminoácidos, uma forma de 140 aminoácidos e uma forma de 134 aminoácidos. A forma de 140 aminoácidos está representada na Tabela 1, Gimenez-Gallego et al., Science 230: 1385-1388 (1985) e é a preferida de entre todas as espécies bovinas.

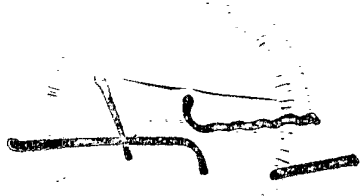






A forma de 154 aminoácidos inclui os seguintes aminoácidos adicionais; Ala-Glu-Gli-Glu-Tre-Tre-Tre-Fen-Tre-Ala-Leu-Tre-Glu-Lis, com a extremidade carboxil em Lis ligada à extremidade onde está situado o aminoácido Fen. Na primeira posição da forma de 140 aminoácidos. O residuo do aminoácido terminal alanina da forma de 154 aminoácidos de aFGF bovino pode ser acetilado. A forma de 134 aminoácidos é idêntico à forma de 140 aminoácidos excepto que os 6 primeiros aminoácidos da extremidade amino foram removidos. Quando aFGF nativo é isolado as quantidades relativas das formas microheterogenicas variam, dependendo do processo usado, mas geralmente contém duas destas formas.

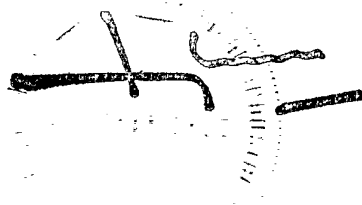
O aFGF humano exhibe uma microheterogeneidade similar ao aFGF bovino. As formas microheterogenicas preferidas de aFGF humano incluem uma forma de 154 aminoácidos, uma forma de 140 aminoácidos e uma forma de 139 aminoácidos. A forma humana de 140 aminoácidos difere da bovina em onze aminoácidos, tal como está representada na TABELA VIII. A forma de 154 aminoácidos contém a sequência exacta da forma humana de 140 aminoácidos mais os 14 aminoácidos adicionais associados à forma bovina de 154 aminoácidos, com uma excepção. O aminoácido na posição cinco da extremidade N ou na posição -10 como determinada pelo aminoácido 140 Fen na forma humana é a isoleucina e é substituída por treonina na forma bovina. A sequência terminal N humana adicional de 14 aminoácidos é: Ala-Glu-Gli-Glu-Ile-Tre-Tre-Fen-Tre-Ala-Leu-Tre-Glu-Lis. Os aminoácidos adicionais da forma de 154 aminoácidos são numerados a partir de Ala terminal N, -14, até à Lis terminal carboxil -1. O residuo de alanina na extremidade amino na posição -14 pode ser acetilada. A terceira forma de aFGF humano contém 139 aminoácidos e é equivalente à forma humana de 140 aminoácidos mas com o residuo Fen na extremidade amino removido. O residuo



de aspargina na extremidade amino pode ser desanimada para formar acido aspartico na forma de aFGF de 139 aminoácidos humanos. As formas de 140 e de 139 aminoácidos são as mais preferidas dentre as formas microheteropenicas humanas. A forma de 140 aminoácidos é apresentada na Tabela III, Gime-  
nez-Gallego et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 138: 611-  
-617 (1986).



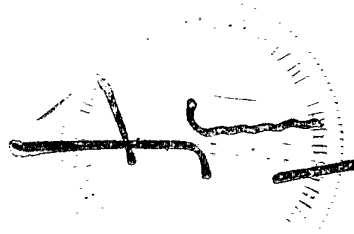




O processo preferido para a obtenção de um gene que codifique para o aFGF de mamíferos é a síntese do próprio gene uma vez que isso permite a otimização da proteína traduzida e facilidade da mutagenização. O gene pode ser sintetizado com base na sequência de aminoácidos da forma microheterogênea de aFGF obtida de qualquer animal incluindo o homem. O método preferido consiste no uso da sequência de aminoácidos de aFGF bovino e mutagenizar a base da sequência pontualmente, quimicamente de modo a produzir genes de outras espécies, Linemeyer et al., *Biotechnol.* 5: 960-965 (1987).

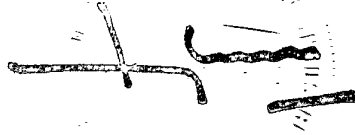
Os genes sintéticos são baseados na sequência de aminoácidos bovinos determinada, descrita por Gimenez-Gallego et al., *Science* 230: 1385-1388 (1985) e a sequência de aminoácidos humana descrita por Gimenez-Gallego et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 138:611-617 (1986) e representada nas Tabelas I e III. A sequência de aminoácidos única da forma bovina de aFGF de 140 aminoácidos deriva da tradução reversa da sequência de aminoácidos através de uma técnica semelhante à de Itakura et al., *Science* 198: 1056-1063 (1977). As várias sequências de nucleotídeos novos correspondem à sequência de aminoácidos nativo de aFGF bovino e são mostradas na Tabela seguinte:





	85		90		95		100													
	Glu	Glu	Cys	Leu	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Glu	Asn	His	Tyr	Asn	Thr	Tyr	Ile	Ser	Lys
	GAP	GAP	TGQ	CTN	TTQ	CTN	GAP	CGN	CTN	GAP	GAP	AAQ	CAQ	TAQ	AAQ	ACN	TAQ	ATQ	TCN	AAP
		TTP		TTP		AGP	TTP										ATA	AGQ		
			105				110								115					120
	Lys	His	Ala	Glu	Lys	His	Trp	Phe	Val	Gly	Leu	Lys	Lys	Asn	Gly	Arg	Ser	Lys	Leu	Gly
	AAP	CAQ	GCN	GAP	AAP	CAQ	TGG	TTQ	GTN	GGN	CTN	AAP	AAP	AAQ	GGN	CGN	TCN	AAP	CTN	GGN
										TTP						AGP	AGQ		TTP	
			125				130								135					140
	Pro	Arg	Thr	His	Phe	Gly	Gln	Lys	Ala	Ile	Leu	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Val	Ser	Ser	Asp
	CCN	CGN	ACN	CAQ	TTQ	GGN	CAP	AAP	GCN	ATQ	CTN	TTQ	CTN	CCN	CTN	CCN	GTN	TCN	TCN	GAQ
			AGP							ATA	TTP		TTP		TTP				AGQ	AGQ

onde Q = C ou T,  
P = A ou G, e  
N = A, T, C, ou G



O gene bovino é construído com uma porção guia que contém um único sítio de clivagem para enzimas de restrição e um codão para metionina na extremidade N como sítio de início de tradução. O gene contém ainda uma cauda que contém codões de parada da tradução na vizinhança uns dos outros e dois de clivagem para enzimas de restrição. A redundância do código genético permite a escolha de sequências de bases o que, por sua vez, permite a incorporação de sítios de clivagem para enzimas de restrição únicos ao longo do gene. A sequência de bases do gene bovino preferida com a localização dos sítios de clivagem para enzimas de restrição é representada na tabela seguinte:

Tabela VI

1 MetPheAsnLeuProLeuGlyAsnTyrLysLysProLysLeuLeuTyrCysSerAsnGlyGlyTyrPheLeuArgIleLeuProAspGlyThrValAspGlyThrLysAspArgSer  
 10 20 30

1 AATTCATGTTCAATCGCCACTGGGTAATACAAAAAGCCAAAGCTTCTTAACTGGCTTAACGGTGGTTACTTCTCCGCATCCCGCCAGATGGTACCGTGGACGGCACCAAGATCGTTCT  
 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120  
 GTACAAGTTAGACGGTGACCCATTAAATGTTTTTCGGTTTCGAAGAAATGACGAGATGACCACCAATGAAAGAGCGGTAGGACGGTCTACCATGGCACCTGCCGTTGGTTTTCTAGCAAGA  
 [2] [3] [4]

(EcoRI)

HindIII

KpnI

40 AspGlnHisIleGlnLeuGlnLeuCysAlaGluSerIleGlyGluValTyrIleLysSerThrGluThrGlyGlnPheLeuAlaMetAspThrAspGlyLeuLeuTyrGlySerGlnThr  
 50 60 70

140 GATCAACATATTCAACTGCAGCTGGCCGGAATCTATCGGTGAAGTIIACATCAAATCTACCGAACTGGTCAAATTCCTTGCCATGGACACTGATGGCCTGCTGTACCGAATCCAGACC  
 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240  
 CTAGTTGTATAAGTTGACGTGACACCGCGCTTAGATAGCCACTTCAAATGTAGTTAGATGGCTTGAACCAAGTAAAGAACGGTACCTGTGACTACCGGACGACATGCCCTAGCGTCTGG  
 [5] [6] [7] [8]

BclI

PstIPvuII

HinfI

NcoI

BamHI

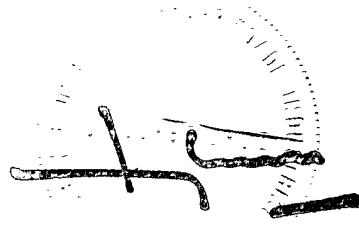


Tabela VI (Cont.)

80 ProAsnGluCysLeuPheLeuGluArgLeuGluGluAsnHisTyrAsnThrIleSerLysLysHisAlaGluLysHisTrpPheValGlyLeuLysLysAsnGlyArgSerLys  
 90 110

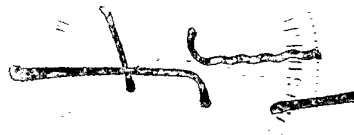
[9] 260 CCAAACGAGGAGTGCCTTTTCCTGGAGCGCCTGGAGGAAACACATACAAACACCTACATCTCTAAAAGCATGCTGAGAAACATTGGTTCGTAGGCCCTTAAGAAAAATGGCCGCTCTAAA  
 280 300 320 340 360  
 GGTTCCTCACGGAAAGGACCTCGGGACCTCCTTTTGGTAATGTTGGATGAGAGATTTTCGTACGACTCTTTGTAACCAAGCATCCGGAAATTCCTTTTACCCGGCGAGATTT  
 [10] [11] [12]

HaeII SphI StuI

120 LeuGlyProArgThrHisPheGlyGlnLysAlaIleLeuPheLeuProLeuProValSerSerAsp . . .  
 130 140

[13] 380 CTGGGCCCTCGTACTCACTTTGICAAAAAGCTATCCTGTTCCTGCCACTGCCAGTGAGCTCTGACTAATAGATAICG 440  
 400 GACCCGGGAGCATGAGTGAACCCAGTTTTTCCTTAGGACAAGGACGGTGACGGTCACCTCGAGACTGATTATCTATAGCAGCT  
 [14] [15] [16]

ApaI SacI EcoRV (SalI)



A sequência do gene para cada cadeia da molécula de cadeia dupla é dividida ao acesso em 8 sequências de nucleotídeos. Os oligonucleotídeos são construídos com finais sobrepostos para permitir a formação de DNA de cadeia dupla. A tabela seguinte contém um dos muitos arranjos possíveis de oligonucleotídeos que é usado para produzir o gene aFGF bovino.

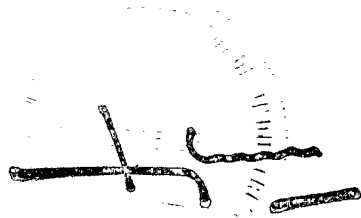
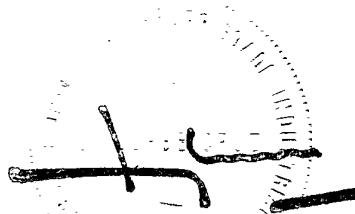


Tabela VII

OLIGO-1	10	20	30	40	50	58	
5'	AATTCATGTT	CAATCTGCCA	CTGGGTAATT	ACAAAAAGCC	AAAGCTTCTT	TACTGCTC	3'
OLIGO-2	10	20	30	40	45		
5'	AGAAGCTTTG	GCTTTTTGTA	ATTACCCAGT	GGCAGATTGA	ACATG		3'
OLIGO-3	10	20	30	40	50	60	
5'	TAACGGTGGT	TACTTTCTCC	GCATCCTGCC	AGATGGTACC	GTGGACGGCA	CCAAAGATCG	3'
OLIGO-4	10	20	30	40	50	59	
5'	TGCCGTCCAC	GGTACCATCT	GGCAGGATGC	GGAGAAAGTA	ACCACCGTTA	GAGCAGTAA	3'
OLIGO-5	10	20	30	40	46		
5'	TTCTGATCAA	CATATTCAAC	TGCAGCTGTG	CGCCGAATCT	ATCGGT		3'
OLIGO-6	10	20	30	40	50	60	65
5'	GTAACCTCA	CCGATAGATT	CGGCGCACAG	CTGCAGTTGA	ATATGTTGAT	CAGAACGATC	TTTGG 3'
OLIGO-7	10	20	30	40	50	60	67
5'	GAAGTTTACA	TCAAATCTAC	CGAACTGGT	CAATTCCTTG	CCATGGACAC	TGATGGCCTG	CTGTACG 3'



OLIGO-8    10            20            30            40            50            60 62  
5' GATCCGTACA GCAGGCCATC AGTGCCATG GCAAGGAATT GACCAGTTTC GGTAGATTG AT 3'

OLIGO-9    10            20            30            40            50 52  
5' GATCCCAGAC CCCAAACGAG GAGTGCCTTT TCCTGGAGCG CCTGGAGGAA AA 3'

OLIGO-10   10            20            30            40            50            58  
5' GTTGAATGG TTTTCCTCCA GGCCTCCAG GAAAAGGCAC TCCTCGTTTG GGGTCTGG 3'

OLIGO-11   10            20            30            40            48  
5' CCATTACAAC ACCTACATCT CTAAAAAGCA TGCTGAGAAA CATTGGTT 3'

OLIGO-12   10            20            30            40            46  
5' GGCCTACGAA CCAATGTTTC TCAGCATGCT TTTAGAGAT GTAGGT 3'

OLIGO-13   10            20            30            40            50 53  
5' CGTAGGCCTT AAGAAAAATG GCCGCTCTAA ACTGGGCCCT CGTACTCACT TTG 3'

OLIGO-14   10            20            39            40            50            55  
5' GCTTTTTGAC CAAAGTGAGT ACGAGGGCCC AGTTTAGAGC GGCCATTTT CTAA 3'

OLIGO-15   10            20            30            40            50            56  
5' GTCAAAAAGC TATCCTGTTC CTGCCACTGC CAGTGAGCTC TGACTAATAG ATATCG 3'

OLIGO-16   10            20            30            40            50  
5' TCGACGATAT CTATTAGTCA GAGCTCACTG GCAGTGGCAG GAACAGGATA 3'



Os oligonucleotidos ilustrados na Tabela VII estão presentes meramente como um exemplo de subunidades de oligonucleotidos e não devem ser interpretados como limitantes destas. A sequencia de bases composta que mostra a sobreposição e arranjo dos oligonucleotidos está ilustrada na Tabela II.

O gene bovino é reunido em duas etapas: primeiro a metade correspondente à porção da extremidade N da proteína e segundo a metade da extremidade C. Geralmente, os oligonucleotidos são tratados com cinasa de polinucleotidos de T<sup>4</sup> na presença de ATP ou de ATP marcado com <sup>32</sup>P. Durante a primeira reacção de cada etapa, os oligonucleotidos que formam uma das cadeias do gene são tratados com cinasa com excepção do oligonucleotido mais próximo da extremidade 5'. Na segunda reacção os oligonucleotidos que formam a segunda cadeia são tratados com cinasa, com excepção do oligonucleotido mais proximo da extremidade 5'. Após o tratamento com cinasa os oligonucleotidos são usados sendo que cerca de 1% dos oligonucleotidos adicionados são marcados com <sup>32</sup>P com vista a uma posterior identificação dos produtos. A fusão é levada a cabo num tampão apropriado como por exemplo um que contém, mas não é limitado na sua composição por, cerca de 60 mM Tris, pH 7,6 aproximadamente, cerca de 5 mM ditiotreitól (DTT), cerca de 10 mM MgCl<sub>2</sub> e cerca de 30 μM ATP, a cerca de 90°C durante 4 minutos seguida de passagem rápida para cerca de 60°C e arrefecimento lento até cerca de 30°C. A ligação é levada a cabo num tampão apropriado como por exemplo que contém, mas não é limitado na sua composição por, cerca de 60 mM TRIS, pH 7,6 aproximadamente, cerca de 10 mM DTT, cerca de 10 mM MgCl<sub>2</sub>, cerca de 1mM ATP e cerca de 0,03 unidades de ligase de DNA de T<sup>4</sup>, a cerca de 20°C durante cerca de 1 hora e meia.

Os oligonucleotidos ligados

são purificados por electroforese através de um gel de poli-acrilamida seguido de precipitação com etanol. Os oligonucleotidos são redissolvidos num tampão que contém cerca de 20  $\mu$ l de formamida a cerca de 80%, cerca de 50 mM TRIS-borato com pH a cerca de 8,3, cerca de 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), cerca de 0,1% (P/V) de cianol de xileno e cerca de 0,1% (P/V) de azul de bromofenol. Cada amostra é aquecida a cerca de 90°C durante cerca de 3 minutos e submetido a electroforese através de um gel de poliacrilamida-ureia 10% a cerca de 75 watts durante cerca de 5 horas. As bandas de 231 bases de extremidade N são removidos, reunidas e eluidas a cerca de 4°C em cerca de 0,5M acetato de amónia que contém 1mM EDTA a um pH próximo de 8. As bandas da extremidade C de 209 bases são tratadas da mesma forma.

As sequências sintéticas do gene que codifica quer para as porções da extremidade N quer para as da extremidade C de aFGF são incorporadas no plasmideo pBR322. É especialmente desejado e planeado que no âmbito deste invento seja incluído o uso de outros plasmideos nos quais o gene para o aFGF pode ser incorporado e que permitem a expressão do gene do aFGF. Os oligonucleotidos religados, cerca de 300 fmole e cerca de 100 fmole da extremidade N de 231 pares de base recolhida, são ligados cada um a cerca de 100 fmole de EcoRI-BamHI pBR322 de cerca de 3,9 kilobases (Kb) purificado através de um gel de agarose, no caso da extremidade N. A extremidade C de 209 pb é construída da mesma forma usando BamHI-SalI pBR322. A ligação é levada a cabo num tampão que contém cerca de 25 mM TRIS, a um pH aproximado de 7,8, cerca de 1 mM DTT, cerca de 10 mM  $MgCl_2$ , cerca de 0,4 mM ATP, com cerca de 1 unidade de ligase de DNA de T4 durante cerca de 1 hora a cerca 20°C. Cada vector ligado a metade do gene é usado para transformar células bacterianas competentes, tais como E.coli RR1 (Bethesda Research Laboratories, BRL) segundo os procedi-

mentos dos fornecedores. As células transformadas são selecionadas para o crescimento na presença de ampicilina e testadas para a presença quer do fragmento EcoRI-BamHI de 231 pares de bases (pb) inserido quer para o fragmento inserido BamHI-SalI de 209 pb, através de análise por restrição de Mini-lisados de preparações do plasmideo.

A sequência de DNA dos clones que contêm os fragmentos inseridos do tamanho apropriado é determinado usando a técnica de sequenciação química de DNA de Maxam and Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560-564 (1977).

O gene sintético final de comprimento total do aFGF foi clonado por clivagem do clone que contém a metade com a extremidade N, com as enzimas de restrição BamHI, e SalI, seguida de tratamento com fosfatase alcalina e ligação deste com o fragmento purificado através de gel, de 209 pb BamHI-SalI que contém a metade da extremidade C. Este material ligado é usado para transformar células RRI competentes como anteriormente.

A expressão do gene aFGF sintético é acompanhada de um diferente número de sistemas de expressão de promotores. É desejado e planejado que no âmbito deste invento sejam incluídos os usos de outros sistemas de expressão de promotores para a expressão do gene aFGF intacto. A construção preferida usa o promotor tac de E. coli, um híbrido entre regiões do promotor de trp e do promotor lac tal como descrito por deBarr et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25 (1983). O plasmideo pKK223-3 (Pharmacia) que contém o promotor tac e o sinal de terminação da transcrição rrnB de rRNA foi modificado com o intuito de remover o sítio de restrição da enzima SalI derivado de pBR322. O sinal de terminação RRNB de rRNA permite a expressão de promotores fortes, tal como foi demonstrado por Gentz



et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4936-4740 (1981) e por Brosius, Gene 27: 161-172 (1984).

O DNA do plasmideo pKK 223-3 é clivado com enzimas de restrição de modo a produzir um fragmento de DNA de 2,7 kb para gerar o clone pKK2.7. O gene de aFGF respectivo é clivado a partir do vector pBR322 que o contém e transferido para o plasmideo pKK2.7 após a restrição de pKK2.7 com EcoRI e Sall. O recombinante resultante, representado na fig. 1, é usado para transformar células de E.coli JM 105 (Pharmacia) ou DHS (BRL) e é expresso.

A mutagenização específica num sitio é um modo eficiente para converter a sequência de aminoácidos de aFGF de uma espécie animal numa sequência de aminoácidos de aFGF de outras espécies. A descrição seguinte diz respeito à conversão mutagenica específica num sitio, de aFGF bovino da forma de 140 aminoácidos (numerada de acordo com a forma nativa) em aFGF humano, tendo em consideração, contudo, que este processo pode ser usado para converter aFGF de qualquer espécie de mamíferos noutra de qualquer outra espécie. A única limitação desta conversão é o facto de ambas as sequências de aminoácidos dos aFGFs deverem ser conhecidos. A tabela seguinte é uma lista de aminoácidos que devem ser substituídos e respectiva localização no mapa de aminoácidos de aFGF bovino, Tabela VI, no qual as substituições são feitas:

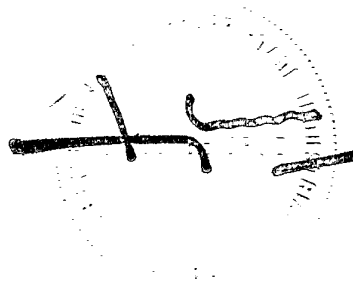


Tabela VIII

Localização  
do AminoÁcido

Aminoácidos Substituidos  
aFGF humano para aFGF bovino

5	Pro	Leu
21	His	Tyr
35	Arg	Lys
47	Ser	Cys
51	Val	Ile
64	Tyr	Phe
106	Asn	His
116	Ser	Arg
117	Cys	Ser
119	Arg	Leu
125	Tyr	Phe



Tal como na sequência do gene bovino, oito oligonucleotidos que representam a sequência do gene humano são construídos segundo o mesmo procedimento usado para os oligonucleotidos bovinos. A tabela seguinte contém um dos muitos possíveis arranjos de oligonucleotidos que é usado para produzir o gene de aFGF humano.

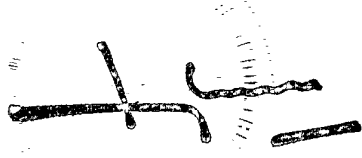


TABELA IX

OLIGO-1

5' CTGCCACCGGGTAATTAC 3'

OLIGO-2

5' CGGTGGTCACTTTCTCCG 3'

OLIGO-3

5' CGGCACCAGATCGTTC 3'

OLIGO-4

5' GCAGCTGTCGCCGAATCTGTCGGTGAAG 3'

OLIGO-5

5' CTGGTCAATACCTTGCCATGG 3'

OLIGO-6

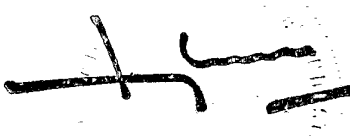
5' GCTGAGAAAAATTGGTTCG 3'

OLIGO-7

5' GGCCCGTTTACAGCTGCCATTTTTCTTAAGG 3'

OLIGO-8

5' CGTACTCACTATGGCCAAAAAGCTATCC 3'



O gene bovino sintético de aFGF clonado é convertido num gene humano sintético de aFGF através de uma série de mutações pontuais dirigidas. A mutagene dirigida de oligonucleotidos do gene clonado permite a alteração da sequência de bases de aFGF bovino de tal modo que a sequência de aminoácidos resultante contém os aminoácidos substituídos indicados na Tabela VIII e é de aFGF humanos. A deleção é feita no gene bovino de modo a remover a fenilalanina amino terminal para a produção da forma microheterogênica de aFGF humano de 139 aminoácidos. Uma mutação pontual é levada a cabo para substituir a asparagina da posição dois por ácido aspártico. Em alternativa, a asparagina é desanimada para formar ácido aspártico. Os métodos para levar a cabo estes procedimentos estão descritos abaixo ou são conhecidos no meio científico. A mutagenese dirigida de oligonucleotidos é realizada usando processos padrão conhecidos no meio, Zoller and Smith, *Methods in Enzymology*, 100: 468-500 (1983); Morris *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 11: 5103-5112 (1983); Zoller and Smith, *DNA* 3: 479-488 (1984). As mutações pontuais de conversão de bovino para humano são levadas a cabo através de mutagenese de oligonucleotidos dirigido e padronizada e são mostradas na Tabela seguinte. A localização da base mutagenizada pode ser observada na Tabela X.

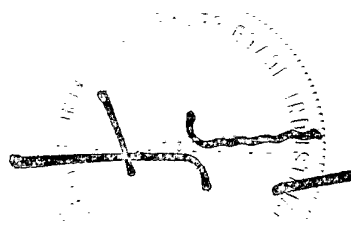


Tabela X

Localização da base	Base substituída		Aminoácido humano correspondente
	aFGF humano	para aFGF bovino	
22	C	T	Pro
69	C	T	His
112	G	A	Arg
148	C	G	Ser
159	G	A	Val
199	A	T	Tyr
324	A	C	Asn
354	A	C	Ser
358	G	C	Cys
364	G	T	Arg
365	C	G	Arg
382	A	T	Tyr



Para facilitar a mutagenese do gene aFGF bovino, este é transferido para o vector padrão M13 mp19, que é um vector de bacteriófago de DNA de cadeia simples. O plasmideo pKK-aFGF bovino é clivado com EcoRI e Sall e o fragmento de 440 pb resultante é purificado através de um gel. A RF do DNA do vector M13 mp19 é clivada com as mesmas duas endonucleases e as extremidades são subseqüentemente desfosforiladas com fosfatase alcalina bacteriana. O DNA do vector e o DNA do fragmento do gene de aFGF são ligados e a mistura é usada para transformar células de E. coli DH5. Um clone fágico contendo o gene aFGF bovino é seleccionado e denominado, M13mp19-baFGF.

Os oligomeros humanos representados na Tabela IX são fosforilados e ligados individualmente ao DNA M13mp19-baFGF de cadeia simples do fago. Moléculas de cadeia dupla fechados em circulo são preparadas usando ligase de DNA de T<sub>4</sub> e o fragmento klenow de polimerase I de DNA. Cada uma das preparações foi usada para transformar células JM105 competentes e as placas transformantes resultantes são seleccionados por hibridação com um oligomero apropriado que é marcado usando cinasa de polinucleotidos. O DNA de cadeia simples é isolado de um clone fágico que contém as mutações do oligomero humano 4 e o processo acima descrito é repetido usando o oligomero humano 5 de modo a gerar um clone que contenha os mutações dos oligomeros 4 e 5 ao mesmo tempo.

Nos processos seguintes, as mutações das seqüências de bovino para humanos nos clones de M13 foram associadas a um clone de pBR322. As RF de DNAs foram preparados a partir de clones que contém modificações de bases especificadas pelos oligomeros humanos 1, 2, 6 e 8. O DNA do clone mutante humano 1 foi clivado com EcoRI, as extremidades foram desfosforiladas com fosfatase alcalina



bacteriana e o DNA foi clivado com HindIII. O DNA do mutante humano 2 foi clivado com HindIII, tratado com fosfatase e depois clivado com BamHI. O DNA do mutante humano 6 foi clivado com BamHI, tratado com fosfatase e clivado subsequentemente com ApaI. Da mesma forma o DNA do mutante humano 8 foi clivado com Apa I, as extremidades foram desfosforiladas e o DNA foi clivado com Sall. Estas quatro preparações de DNA foram submetidas através de um gel de agarose a 2% e os fragmentos de 45 pb, 190 pb, 135 pb e 70 pb dos DNAs mutantes que contêm as mutações humanas 1, 2, 6 e 8 respectivamente, foram eluidos do gel. Volumes de cada fragmento são ligados colectivamente a um fragmento de 3,7 kb EcoRI-Sall de pBR322, purificado através de gel, usando ligase de DNA de T<sub>4</sub> e utilizantes para transformar células competentes de E. coli DHS (BRL) segundo o método descrito pelo fornecedor. Um clone que contém as mutações especificadas por todos os quatro oligomeros 1 mutantes é seleccionado por hibridação com sondas marcadas radioactivamente preparadas a partir de cada um dos oligomeros. O fragmento de DNA KpnI-BamHI de 140 pb isolado a partir da RF do DNA do clone de M13 mutante humano clivado é ligado aos produtos da clivagem endonucleasica deste DNA mutante humano 1-2-6-8 e usado para transformar células DHS competentes por forma a gerar um clone com as mutações 1-2-3-6-8 humanas. Os fragmentos gerados por digestão com Bam HI e Pst I deste último clone são ligados aos fragmentos gerados por digestão com Bam HI e Pst I da RF de DNA do clone M13 humano 4-5 e a mistura da ligação é usada para transformar células competentes DHS. Um clone contendo as mutações humanas 1-2-3-4-5-6-8 é seleccionado por hibridação de oligomeros e o fragmento de DNA EcoRI-Sall do gene aFGF deste plasmideo recombinante é ligado à RF de DNA de M13 mp 18 (BRL) clivada com EcoRI e Sall e tratada com fosfatase. As células competentes DH5 são transformadas com este DNA ligado e as células transformadas são plaquedaa em células hospedeiros



JM 105 de forma a gerar um clone M13. O DNA fágico de cadeia simples deste clone é ligado ao oligomero humano 7 e é obtido um clone M13 que contém todas as mutações desejadas, seguindo o processo descrito acima. O clone humano aFGF é designado por M13mpl8-haFGF.

O aFGF puro na ausência de heparina torna-se menos activo, presumivelmente devido à geração de ligações dissulfidicas intramoleculares incorrectamente estabilizadas e de agregados formados através de ligações dissulfidicas intermoleculares. As ligações dissulfidicas covalentes são formadas entre si dois residuos de cisteina, quer em duas cadeias polipeptidicas separadas - - ligações dissulfidicas intercadeias - quer em diferentes posições da mesma cadeia - ligações dissulfidicas intracadeia. No caso de iodinação oxidativa enzimatica, as moleculas activas podem ser recuperadas através da redução com 20 mM ditiotreitól na presença de 3M cloreto de guanidina a um pH de cerca de 9,1. O presente invento utiliza a mutagenização dirigida a um sitio para a substituição especifica ou deleção de aminoácidos capazes de formar ligações covalentes intramoleculares ou intermoleculares estranhas ou de aminoácidos sensíveis à oxidação. O termo substituição aqui referido diz respeito à troca deliberada na sequência de bases do DNA de aFGF, de tal modo que um aminoácido desejado é substituido por outro aminoácido diferente do desejado - -aminoácido não desejado. O aminoácido não desejado pode ser um capaz de formar ligações covalentes não desejadas, especialmente ligações dissulfidicas, ou um que seja oxidavel pelo ar ou que possa diminuir a actividade biologica da molecula. O termo deleção aqui usado diz respeito à mudança deliberada na sequência de bases do DNA de aFGF tendo como resultado a eliminação do aminoácido desejado. O aminoácido primario associado à formação de ligações covalentes intramoleculares e intermoleculares é a cisteina, ao passo que



os aminoácidos que são propensos à oxidação incluem a cisteína, a metionina e o triptofano. O residuo ou residuos de cisteína podem ser substituídos por qualquer aminoácido que não forme ligações dissulfídicas. O aminoácido preferido para a substituição da cisteína é a serina. Os aminoácidos propensos à oxidação são substituídos por qualquer aminoácido resistente à oxidação e que incluem, mas não são restringidos a alanina, valina, leucina e isoleucina.

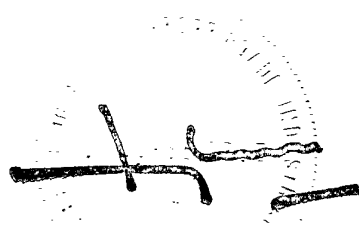
O invento é conhecido de forma a incluir mutações específicas num sítio, de um ou mais residuos de cisteína e de qualquer residuo de metionina não terminal que possam tornar o aFGF nativo ou recombinante menos activo ou inactivo devido à formação incorrecta de ligações intramoleculares ou a modificações oxidativas. As proteínas recombinantes ou nativas, bovinas ou humanas contêm dois residuos de cisteína em comum localizadas nas posições 16 e 83 e um residuo de metionina comum localizado na posição 67 definida pela forma nativa de 140 aminoácidos quer de aFGF bovino quer de humano. Os aFGFs bovino e humano contêm cada um, um terceiro residuo de cisteína nas posições 47 e 117 respectivamente. Os residuos de cisteína comuns são os mais possíveis responsáveis pela formação de ligações dissulfídicas uma vez que a localização dos residuos de cisteína nas ligações dissulfídicas é altamente conservado em proteínas homólogas. Desta forma, os terceiros residuos de cisteína que estão em diferentes locais nos aFGs bovino e humano não são, muito provavelmente, encontrados em ligações dissulfídicas em proteínas completamente activas. Considera-se que os novos aFGFs mutantes do presente invento incluem não só as formas substituídas nos residuos não comuns de cisteína mas também aqueles que possuem todas as cisteínas deleccionadas, aquelas em que uma ou duas cisteínas foram substituídas ou deleccionadas e aquelas em que a metionina foi substituída ou deleccionada.



A substituição ou deleção de qualquer uma, especialmente da única cisteína, de todas as cisteínas, de duas das três cisteínas ou de metionina no aFGF humano ou bovino através de mutagenese dirigida a um sitio pode ocorrer após a formação de ligações dissulfidicas intramoleculares ou intermoleculares e de formas oxidáveis.

A mutagenese especifica para um sitio é levada a cabo preferencialmente em R-aFGF bovino ou humano produzido a partir de DNA genômico, cDNA ou através da construção de genes que codificam para uma ou mais formas microheterogenicas da proteina baseadas nas formas microheterogenicas de aFGF de especies de mamiferos incluindo o homem. O DNA genômico é extraído do cerebro de mamiferos ou das celulas pituitárias e preparado para clonagem quer pela fragmentação ao acesso de DNA de alto peso molecular segundo a técnica de Maniatis et al., Cell 15: 687-701 (1978) quer pela clivagem com enzimas de restrição segundo o método de Smithies et al., Science 202: 1284-1289 (1978). O DNA genômico é então incorporado num vector de clonagem apropriada, em geral trata-se do fago lambda de E. coli: ver Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982).

Para se obter cDNA que codifique para aFGF é extraído, de células que expressam aFGF, pelo método de Aviv and Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. 69,: 1408-1412 (1972), RNA que contenha poli(A). O cDNA é preparado usando transcriptase reversa e DNA polimerase segundo técnicas padrão descritas por Maniatis et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982). O cDNA é clonado num vector apropriado, geralmente pBR322, através de uma técnica semelhante a de Wewsink, et al., Cell 3: 315-325 (1974).



O DNA genômico clonal ou bibliotecas de cDNA são testadas para identificar os clones que contêm sequências de aFGF por hibridação com uma sonda de oligonucleotidos. A sequência de sonda de oligonucleotidos usada na hibridação é baseada na sequência de aminoácidos de aFGF determinada. Maniatis et al., *Supra*, Anderson and Kingston, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6838-6842 (1983) and Suggs et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6613-6617 (1981) descrevem vários processos para testar clones genômicos e de cDNA. O processo preferido consiste em mutagenizar especificamente num ponto os genes humanos ou bovinos sintetizados como descrito acima.

A mutagenese especifica num sitio é levada a cabo num clone recombinante de cadeia simples de bacteriofago que codifique para aFGF humano ou bovino, tais como M13mp18-haFGF ou M13mp19-baFGF segundo os métodos de Zoller and Smith, *Methods in Enzym.* 100:468-500 (1983), Morris et al., *Nucleic Acids Res.* 11:5103-5112 (1983) e Zoller and Smith, *DNA* 3: 479-488 (1984). Três oligonucleotidos para cada especie são construidos de forma a especificarem codões de serina no lugar de cada um dos codões de cisteina do gene de aFGF humano nas posições 16, 83 e 117 e nas posições 16, 47 e 83 para o gene bovino. É construido um oligonucleotido especifico de um codão de leucina e é colocado no lugar do codão de metionina na posição 67 do aFGF humano ou bovino. Os oligomeros humanos sintetizados estão representados na tabela seguinte com as bases mutadas sublinhadas.

TABELA XI

Cisteína 1 (16) 5'CCGTTAGAGGAGTAAAGAAGC 3'

Cisteína 2 (83) 5'GGAAAAGGGACTCCTCG 3'

Cisteína 3 (117) 5'CCGCGTTTAGAGCTGCC 3'

Metionina (67) 5'CCATCAGTGTCAGGGCAAGG 3'

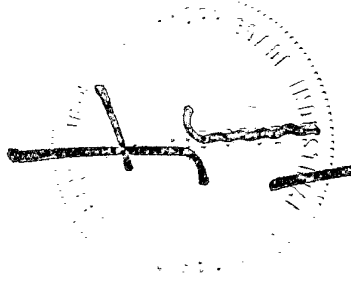
Oligomeros semelhantes são identificados para as regiões apropriadas do gene que codifica para aFGF bovino e as mutações específicas elaboradas como descrito abaixo.

Os oligomeros humanos são fosforilados e ligados individualmente ao DNA de cadeia simples de M13mp18-haFGF ou M13mp19-baFGF. Uma segunda cadeia de DNA é sintetizada usando o oligomero ligado como iniciador. Cada gene mutagenizado para a cisteína é usado para transformar um hospedeiro apropriado como por exemplo, células competentes de *E. coli* DH5. As células transformadas são plaquedadas numa camada de um hospedeiro aceitável para o vírus M13 tal como as células de *E. coli* JM105. As placas transformadas são selecionadas por hibridação com um oligomero marcado apropriado. As condições de hibridação são otimizadas para cada sonda tendo em vista a prevenção da retenção de híbridos que contenham mudanças numa única base. O DNA de cadeia simples é isolado a partir de colônias fágicas que contêm cada uma das mutações cisteína-serina e usado para sequenciação segundo o método de Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467 (1977). As RF de DNAs são preparadas



para cada clone clivado com EcoRI e Sall e purificado por electroforese através de um gel de agarose. Os fragmentos de 440 pb a inserir são ligados individualmente ao fragmento de DNA EcoRI-Sall de 2,7 kb do vector de expressão que contém um promotor tal pkk2.7. Os DNAs ligados são usados para transformar células competentes DH5 e os clones que contém DNA com códões mutados para cisteína são seleccionados por hibridação com o oligomero apropriado. Cada fragmento do gene aFGF inserido é sequenciado pelo método de Maxam and Gilbert, Methods in Enzymology 65: 499-560 (1980). Os clones que contém uma única mudança de base em relação ao DNA humano original são designados: pkk-haFGF (Ser 16), pkk-haFGF (Ser 83) e pkk-haFGF (Ser 117); por outro lado os de DNA bovino são designados por pkk-baFGF (Ser 16), pkk-baFGF (Ser 47) e pkk-baFGF (Ser 83) segundo a localização da substituição na proteína.

A substituição de quaisquer dois ou de todos os três resíduos de cisteína é acompanhado de mutações pontuais múltiplos ou da combinação de fragmentos de restrição dos recombinantes do tipo selvagem humano ou bovino e dos genes sintéticos mutantes (Ser 16), (Ser 47) (Ser 83) e (Ser 117), clonados em M13mp19 no caso bovino M13mp18 no caso humano e subclonados em pkk2.7 como descrito acima. Deve ser entendido que as mutações múltiplas podem ser levadas a cabo tanto com os aFGF de uma só mutação humanos com os bovinos descritos acima, contudo, a seguinte descrição incluirá somente aFGF humana. Os recombinantes pkk-haFGF (Ser 16,32) e pkk-haFGF (Ser 16,32) são construídos introduzindo o fragmento de 0,23 kb EcoRI-BamHI de M13 mp18 (Ser 16) em pkk2.7 seguido da inserção dos fragmentos de 0,2 kb BamHI-Sall quer de M13 mp18 (Ser 83) quer de M13 mp18 (Ser 117). O vector pkk27 é modificado de forma a remover o sitio BamHI acima do promotor tac ao mesmo tempo que é deixado o sitio BamHI na sequência multiclonal. Após digestão com os correspondentes enzimas de res-

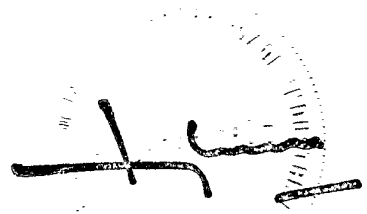


trição e subsequente ligação e transformação de um hospedeiro apropriado, os clones são seleccionados e testados de forma a conhecer aqueles que contêm plasmídeos com o peso molecular esperado para os recombinantes e que é de cerca de 3,1 kb. Os hospedeiros bacterianos apropriados podem incluir mas não são limitados a E.coli DHS, JM10( ou AB1899.

O mutante haFGF (Ser16,83,117) é construído através da substituição do fragmento de 0,13 kb SphI-SalI de pkk-haFGF (Ser 16,83) pelo correspondente fragmento de pkk-haFGF (Ser 117) que codifica para Ser em vez de cis na posição 117. O fragmento de 3kb-SphI-SalI de pkk-haFGF (Ser 16,83) é purificado por electroforese preparativa através de um gel de agarose, electroeluído e ligado ao fragmento de 0,13kb SphI-Poll de pkk-haFGF (Ser 117) purificado a partir de um gel de poliacrilamida a 5% da mesma forma, Os fragmentos purificados são ligados e os recombinantes seleccionados como descrito acima.

O mutante pkk-haFGF (Ser 83-117) é construído por substituição do fragmento de 0,3kb PstI de pkk-haFGF, a forma não mutagenizada, pelo fragmento pkk-haFGF (Ser 16,83,117) que inclui os códons para Ser em vez de de cis nos posições 83 e 117, usando as técnicas acima descritas. Os transformados são analisados por digestão com PstI-SalI para determinar a orientação dos fragmentos ligados, todos os genes são sequenciados pelo método dideoxi de Songer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467 (1977).

A expressão do gene aFGF mutado é acompanhado por um numero diferente de sistemas de expressão com promotores em diferente numero de celulas hospedeiras. É desejado e tentado que no campo abarcado por este invento estejam incluídos e uso de outras celulas hospedeiras



e sistemas de expressão com promotores para a expressão de genes aFGF mutagenizados intactos. As células hospedeiras incluem células bacterianas, leveduras, de insectos e de mamíferos. Os antígenos também podem ser expressos em vírus. Apesar dos genes poderem ser expressos em numerosas células procariotas e várias células eucarióticas, as células hospedeiras preferidas são as de Escherichia coli. Os vectores de expressão que podem ser usados para a expressão de aFGF mutado incluem, mas não são limitados a, pBR322, pLa2311, pkc30, ptacl2, Vgt11, CheY, pAS1, pLC24, pSB226, SV40 e pkk223-3 sendo este último o preferido. Os vectores de expressão de Escherichia coli permitem geralmente a tradução do residuo de metionina ligado ao primeiro aminoácido da proteína desejada. Deve ser entendido que o presente invento inclui não só o mutante R-aFGF com uma metionina terminal mas também o mutante R-aFGF em que a metionina terminal é removida após a tradução em células de levedura, mamífero ou bactérias. O vector de expressão pode incluir na sequência de DNA um ou mais cistronés adicionais que aumentam a expressão do gene aFGF, Schower, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8506-8510 (1986). O produto construído preferido usa o promotor tac de E. coli, um híbrido entre as regiões do promotor trp e do promotor lac como descrito por deBaer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983). O plasmideo pkk 223-3 (Pharmacia) que contém o promotor tac e o terminador de transcrição de rRNA RRNB foi modificado de modo a remover o sitio para a enzima de restrição Sall em pBR322. Foi demonstrado que o terminador rrnB de rRNA permite a expressão por promotores fortes, Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4936-4940 (1981); Brofins, Gene 27: 161-172 (1984).

O DNA do plasmideo pkk223-3 é clivado, com enzimas de restrição de modo a produzir um fragmento de DNA de 2,7 kb, para gerar o clone pkk2.7. O gene sintético de aFGF é clivado a partir do seu vector pBR322



e transferido para o plasmideo pkk2.7 após a restrição do próprio pkk2.7 com EcoR1 e Sall. O recombinante resultante mostrado na fig. 1, é usado para transformar células de E. coli JM105 (Pharmacia) ou DH5 (BRL) e expresso.

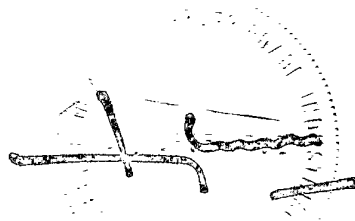
O vector com expressão aumentada preferido conterá uma sequência de nucleotidos, o primeiro cistrão e, acima do gene que codifica para a proteína desejada, o segundo cistrão. O primeiro cistrão conterá, de uma forma geral, uma sequência Shine-Dalfarno acima do codão de paragem. Um vector com expressão aumentado pode conter, mas não é limitado à seguinte sequência de nucleotidos:

AAATTATGTATCGATTAAATAAGGAGGAAT

TACATAGCTAATTTATTCTCTTATTAA

(pKK2.7)            (cistrão de 1,2 oligomeros) (aFGF)

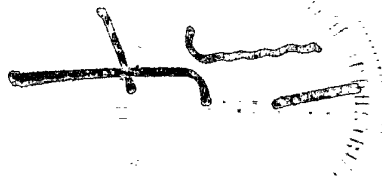
que é um primeiro cistrão eficaz para aumentar a expressão de aFGF mutante ou de tipo selvagem. O primeiro cistrão é inserido num pkk-haFGF construído, apropriado, no sitio EcoR1. A inserção do fragmento provoca a perda do sitio de clonagem EcoR1. O recombinante é usado para transformar uma célula hospedeira apropriada, como os descritos acima e, expresso. Este vector, construído desta forma, provoca um aumento de cerca de dez vezes da expressão de aFGF mutante ou de tipo selvagem. Os plasmideos que contém o vector com expressão aumentada são designados por pKK2c-haFGF. O presente invento é contemplado de forma a incluir clones que contém vectores com expressão aumentada, tais como: pKKac-haFGF



(Ser 16), pKK2c-haFGF (Ser 83), pKK2c-haFGF (Ser 117), pkk2c-haFGF (Ser 16,83), pkk2c-haFGF (Ser 16,117), pkk2c-haFGF (Ser 83, 117), pkk2c-haFGF (Ser 16, 83, 117).

Os clones de expressão mutados crescem a cerca de 37°C num meio de crescimento apropriado que é constituído por cerca de 1% de triptona, cerca de 0,5% de extracto de levedura, cerca de 0,5% de NaCl, cerca de 0,4% de glucose e cerca de 50 µg/ml de ampicilina. Quando a densidade óptica a 550 nm atinge cerca de 0,5, pode-se adicionar isopropil-B-D-tiogalactopiranosido (IPTG) até uma concentração final de cerca de 1 mM e o crescimento continua a cerca de 37°C até cerca de 24 horas. As células de um litro de meio de cultura são colhidas por centrifugação e ressuspensas num tampão de lavagem que contém fosfato a cerca de 100 mM e cerca de 5 mg/ml de EDTA. Após a ressuspensão final é adicionado lisozima até cerca de 0,1 mg/ml e a suspensão é incubada em agitação suave a 30°C durante cerca de 15 minutos. As células são colhidas por centrifugação e ressuspensas num tampão de disruptão que contém cerca de 100 mM fosfato de sódio a pH 6,0, cerca de 3 mM EDTA, cerca de 0,03 mM N-p-toluenossulfonil-2-fenil-alanina clorometil cetona (TPCK); cerca de 0,05 mM pepstatina A, cerca de 0,05 mM fenilmetilsulfonil fluorido (PMSF), cerca de 0,05 mM de leupeptina e cerca de 15 µg/ml de inibidor de tripsina pancreas bovino (BPTI). As células ou são imediatamente disruptas ou congeladas e guardadas a -70°C e disruptas, imediatamente após descongelação, através de duas passagens por um compartimento de pressão francês a cerca de 20 000 psi a cerca de 4°C. O fluido sobrenadante é colhido após centrifugação e liofilizado.

Os aFGFs mutados são purificados até à homogeneidade por um processo de cromatografia que compreende três passos, empregando uma matriz de troca de catiões, seguida de uma matriz de afinidade de Sepharose-



-Heparina e seguida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa. Os fluidos sobrenadantes liofilizados são ressuspensos em tampão fosfato a cerca de 100 mM a cerca de pH 6,0 e adicionados ao permutador de cátions, de preferência CM-Sephadex que foi equilibrado no mesmo tampão. O CM-Sephadex é adicionado à razão de 6,5 ml de resina sedimentada por grama de proteína. A resina é colhida num funil poroso de vidro, e lavada três vezes com tampão fosfato salino a cerca de 100 mM de fosfato e cerca de 150 mM NaCl a pH cerca de 6. A resina é ressuspensa no mesmo tampão empacotada na coluna, lavada e eluída com cerca de 600 mM de NaCl no tampão. A Sephase-Heparina é equilibrada com cerca de 10 mM tampão fosfato a cerca de pH 7,2 e adicionada ao eluído à razão de cerca de 1 ml de resina sedimentada por 1 mg de proteína, agitada suavemente durante cerca de 1 hora a cerca de 4° e o complexo resina-proteína é colhido num funil. A resina é ressuspensa no mesmo tampão e empacotada na coluna a cerca de 1-2 volumes de coluna por hora. A coluna foi lavada num tampão que contém cerca de 10 mM de fosfato a cerca de pH 7,2 e cerca de 0,8 M NaCl e eluída com cerca de 1,5M NaCl no mesmo tampão. Cada proteína é colhida e purificada por HPLC de fase reversa. As fracções são aplicadas numa coluna de HPLC de fase reversa, cerca de C<sub>3</sub>, equilibrada com cerca de 10 mM ácido trifluoroacético (TFA) e eluído com um gradiente de cerca de 0 a cerca de 100% de 4 mM TFA, cerca de 0-67% CH<sub>3</sub>CN em cerca de 30 minutos.

A actividade mitogénica dos recombinantes mutados de aFGFs purificados é determinada por incorporação de <sup>3</sup>H-Timidina em DNA por linha celular de fibroblastos, de preferência BALB/c 3T3 A31 (American Type Culture Collection). As proteínas mutantes dos plasmídeos pkk-haFGF (Ser 16) e pKK-haFGF (Ser 83) estimularam os fibroblastos a um nível igual ou inferior ao do aFGF não mutado humano. A proteína mutante de pKK-HaFGF (Ser 117) mos-

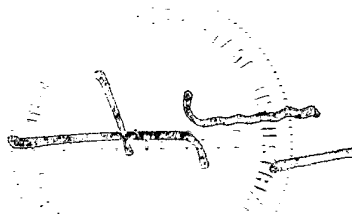


trou uma actividade estimuladora que é mais alta do que as formas não-mutadas na ausência de heparina.

Um ensaio mitogenico muito reprodutivel e controlado é requerido para comparar as actividades mitogenicas relativas especificas do haFGF de tipo selvagem e dos mutantes Cis e Ser. As culturas confluentes de celulas de Balb/C 3T3 em meio de cultura livre de soro foram estimuladas com diluições a 1:2 consecutivas até cerca de pelo menos da ordem de 3 log de concentração de aFGF e que cobrem um aumento completo da resposta em relação ao fundo do pico de sintese de DNA. Uma unidade estimuladora é calculada como a quantidade de aFGF por ml que gera metade da resposta máxima. A actividade mitogénica especifica é o numero de unidades estimuladoras por mg de aFGF puro. O ensaio é padronizado mais adiante por diluição de soluções stock até cerca de 50 µg aFGF/ml de TFA/CH<sub>3</sub>CN ou menos. A diluição elimina qualquer efeito da concentração de tal forma que diferentes amostras podem ser comparadas.

A conversão de Cis117, quaisquer duas Cis ou todos os três residuos de Cis em Ser resulta num aumento de 7 a 20 vezes na actividade especifica da proteina na ausência de heparina. Mesmo na presença de heparina, todos os quatro multiplos mutantes são mais activos do que o R-aFGF humano de tipo selvagem (Ser 83,117) sendo cerca de 2,7 vezes mais activos. Apesar da heparina estimular a actividade de aFGF de tipo selvagem de 20 vezes, apenas potencia a actividade dos mutantes entre 3 e 5 vezes.

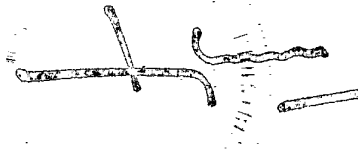
A conversão de todos ou de quaisquer dois dos três residuos de cis do aFGF humano em Ser resulta num aumento de 7 a 20 vezes da actividade especifica da proteina na ausência de heparina. Mesmo na presença de heparina, todos os quatro multiplos mutantes são mais activos do que as formas não mutadas de haFGF, sendo o haFGF



Ser (83,117) cerca de 3 vezes mais activo.

O aFGF recombinante mutado é util na promoção da reparação ou cura de, mas não limitada a, feridas de tecidos provocados por queimaduras, cortes ou lacerações e úlceras cutaneas assim como de feridas dos músculos do esqueleto tais como fracturas osseas, roturas de tendões ou ligamentos e inflamações de bolsas e tendões. Reparação de tecidos, tal como aqui é usada, é definida como a regeneração de tecido após estimulação de células da mesoderme, ectoderme ou neuroectoderme por aFGF. O r-aFGF mutado também é util na promoção da cura e regeneração da cartilagem ou tecidos da cartilagem. A administração de aFGF mutado para a reparação de tecido mole, incluindo tecido de córnea, será geralmente tópica, subcutanea, intravenosa ou intraocular. Os tecidos moles incluem todos os tecidos excepto os associados com o sistema de músculos do esqueleto como descrito acima. Os novos peptidos podem ser administrados com ou sem heparina, preferivelmente sem heparina em quantidades de cerca de 0,1 a cerca de 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{dia}$  deste invento, da proteína, na área ferida quer topicamente quer subcutaneamente a cerca de 1 a 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3/\text{dia}$ . Os limites mais preferidos de aplicação na administração tópica é cerca de 1 a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{dia}$ .

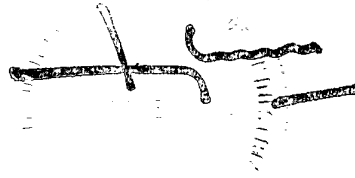
A heparina é um glicosaminoglicano sulfatado que consiste em partes iguais dos açúcares D-glucosamina e D-ácido glucurónico que, são sulfatados em graus variáveis. Está comercialmente disponível numa forma não modificada bem como em solução para aplicação terapêutica directa. Quando a heparina é administrada com aFGF em aplicações tópicas ou subcutaneas a concentração preferida é de cerca de 3 a 30 vezes a quantidade (massa) de aFGF administrado por dia.



Para a reparação de musculos do esqueleto e cartilagem ou de feridas, o r-aFGF mutado é administrado preferencialmente no local da lesão quer durante a cirurgia quer por injeção. A implantação cirurgica de formas que se libertam lentamente de aFGF mutado permitirá a libertação contínua do factor de crescimento durante um longo periodo de tempo. Métodos de formulação de aFGF mutado para libertação lenta são conhecidos. Os niveis de doseamento para as feridas do musculo do esqueleto serão de cerca de 10 a 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3/\text{dia}$ .

O mutante de r-aFGF é para além disto útil na promoção de uma reoparação mais facil do tecido vascular in vivo, tal como o crescimento de vasos sanguineos (angiogenese), reparação de vasos (tal como a substituição de celulas endoteliais danificadas) e na estimulação do crescimento de células endoteliais em substratos apropriados para a produção de vasos sanguineos para implantação. A actividade de angiogenese in vivo dos novos peptidos mutantes r-aFGF é acompanhada pela administração interna como por exemplo subcutanea, de cerca de 1 a 1000  $\mu\text{g}/\text{cm}^3/\text{dia}$  sendo a quantidade mais preferivel entre 10 e 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3/\text{dia}$ . Os limites preferiveis de aplicação para reparação da superficie é de cerca de 100 ng a 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{dia}$  sendo os limites mais preferiveis de aplicação de 1 a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{dia}$ . A reparação de vasos em larga escala é acompanhada de uma unica dose de cerca de 0,1 a 100 ng/ $\text{cm}^3$  ou da infusão contínua de 1 a 1000 pg/ $\text{cm}^3/\text{dia}$ . O crescimento in vivo de celulas endoteliais em substractos apropriados para a produção de vasos sanguineos é acompanhada pela administração de 1 a 10 ng/ml/dia.

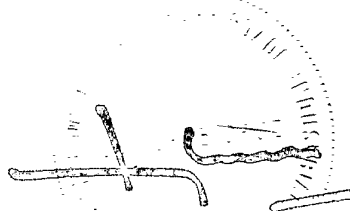
O mutante de r-aFGF é também útil na indução in vivo do activador de plasminogéneo por celulas endoteliais vasculares para o tratamento de ataques de trombose. Os ataques de trombose resultam da formação



de trombos em vasos sanguineos que podem resultar em acessos de trombose, trombose de veias funda, enfarte do miocardio e outras circunstâncias médicas que dão lugar à necrose de tecidos e muitas vezes à morte do paciente. A digestão dos coágulos formados e a prevenção da formação posterior de coágulos pode ser mediada pelo mutante r-aFGF que, desta forma, beneficia o tratamento de ataques de trombose. O pre-tratamento com o mutante r-aFGF também pode ser usado para prevenir a formação de coágulos em animais, incluindo o homem que possuem risco elevado de formação de coágulos. Os limites desejáveis de dosagem do mutante r-aFGF para o tratamento de ataques de trombose é de cerca de 10  $\mu$ g-10 mg/kg/dia.

O r-aFGF mutado ou de tipo selvagem é também util na promoção da reparação de tecido nervoso central e periférico incluindo a manutenção e estimulação dos neurónios do hipocampo, dos neuronios que são danificados ou destruidos pela doença de Alzheimer e dos neurónios motores e sensores cuja destruição causa paralisia. O tecido nervoso danificado pode ser estimulado por aFGF mutado ou de tipo selvagem para a produção adicional de neurões por mitose de neuroblastos tendo em vista a regulação dos nervos danificados na área e a promoção de alto crescimento nervoso a partir dos neurónios. Os peptidos podem ser administrados como descrito para o caso da cura de feridas, do tecido mole ou do tecido do musculo do esqueleto.

Para aplicação tópica são usados vários excipientes farmaceuticos para administração do composto activo deste invento. Tais excipientes incluem, mas não são limitados a, unguentos tais como petrolato hidrofílico ou polietileno glicol; massas que podem conter gomas tal como goma de xantão; soluções tais como alcolicas ou aquosas geis tais como hidroxido de aluminio ou geis de alginato



de sódio; albuminas tais como as humanas ou de animais; colageneos tais como o humano ou de animais; celulosas tais como os celulosas de alquilo, celulosas de hidroxialquilo e celulosas de alquilohidroxialquilo, por exemplo metilcelulose, hidroxietilcelulose, carboximetilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose e hidroxipropilcelulose; poloxameros tais como Pluronic<sup>R</sup> Poliois exemplificados pelo Pluronic F-127; tetronicos tal como o tetronico 1508; alginatos tal como o alginato de sódio. Os excipientes farmaceuticos incluirão um ou mais dos compostos do aFGF mutado em quantidades de 0,1 a 100 µg/ml.

Para aplicações não tóxicas o mutante r-aFGF é administrado em combinação com excipientes farmaceuticos aceitaveis ou diluentes tais como, tampão fosfato, salino, tampão fosfato salino, solução de Ringer ou semelhantes numa composição farmaceutica de acordo com a pratica farmaceutica usual.

A capacidade do aFGF mutado para estimular a divisão em vários tipos de celulas incluindo fibroblastos, celulas endoteliais vasculares ou de cornea ou semelhantes torna estes peptidos uteis como agentes farmaceuticos. Estes compostos podem ser usados no tratamento de feridas de mamiferos incluindo o homem através da administração do novo r-aFGF mutado a pacientes que necessitem de tal tratamento.

Os exemplos seguintes ilustram o presente invento sem contudo o limitarem a isso.



## EXEMPLO 1

### Síntese de oligonucleotidos

Os oligonucleotidos foram sintetizados de acordo com a técnica descrita por Matteucci and Caruthers, J. Am. Chem. Soc. 103: 3185-3191 (1981); Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Letters 22: 1859-1862 (1981). As sequencias de bases dos oligonucleotidos sintetizados estão representados nas Tabelas VII, IX e XI.

## EXEMPLO 2

### Montagem do gene aFGF

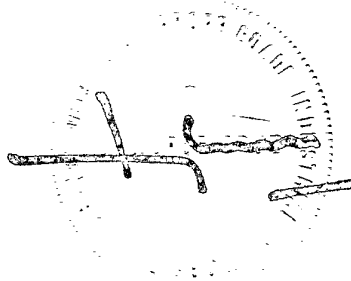
Os oligonucleotidos bovinos do Exemplo 1 foram montados como duas subunidades separadas, a metade da extremidade N (231 pb) e a metade da extremidade C (209 pb). As duas metades foram então combinadas para formar o gene sintético intacto, ver Tabela VI. Inicialmente os oligonucleotidos são tratados com linasa na seguinte mistura de reação: 70 mM Tris pH 7,6, 5 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 33 μM ATP, 0,3 unidades de cinase de polinucleotidos de T<sub>4</sub> por μl e 2,5 pmoles de oligonucleotidos por μl. A mistura foi então incubada durante 1,5 horas a 37°C e durante uma hora suplementar, adicionando à mistura 0,2 unidades/ml de cinasa e ATP até atingir a concentração de 100 mM. Para marcações radioactivas a mistura inicial continha 37 nCi/μl de



[ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP.

As fusões e ligações foram realizadas em duas reacções separadas. Em cada reacção, 100 pmole de cada um dos oito oligonucleotidos foi adicionado. Numa reacção, os oligonucleotidos que formam uma cadeia da metade do gene da extremidade C ou de extremidade N foram tratados com cinasa com excepção de oligonucleotido mais próximo da extremidade 5'. Na segunda reacção os oligonucleotidos que formam a cadeia oposta são tratados com cinasa uma vez mais com a excepção do oligonucleotido mais proximo da extremidade 5'. Desta forma, em cada reacção 3 oligonucleotidos são tratados com cinasa e 5 não são. Após tratamento com cinasa, os oligonucleotidos foram usados, foi também adicionada 1 pmole do oligonucleotido marcado com  $^{32}$ P para tornar possível a identificação posterior dos produtos. Cada reacção continha 200  $\mu$ l de uma solução composta por 70 mM Tris pH 7,6, 5 mM DTT, 10 mM  $MgCl_2$  e 30  $\mu$ M ATP. Os oligonucleotidos foram fundidos por aquecimento a 90°C durante 4 minutos, a reacção foi transferida imediatamente a seguir para 60°C e arrefecida lentamente até 30°C. A ligação foi realizada num volume de 400  $\mu$ l que contém 60 mM Tris pH 7,6 10 mM DTT, 10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM ATP e 0,03 unidades de ligase de DNA de T4 por  $\mu$ l, incubando a mistura a 20°C durante 1,5 horas.

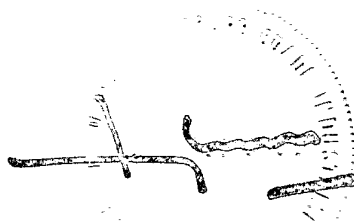
A purificação dos oligonucleotidos ligados foi realizada por electroforese através de um gel de poliacrilamida. Os oligonucleotidos ligados foram precipitados com etanol, redissolvidos em 20  $\mu$ l de formamida a 80%, 50 mM TRIS-borato pH 8,3, 1 mM EDTA, 0,1% (P/V) cianol de xileno e 0,1% (P/V) de azul de bromofenol. Cada amostra foi aquecida a 90°C durante 3 minutos e submetida a electroforese através de um gel de ureia a 10% - poliacrilamida a 75 watts durante 5 horas. As bandas de oligonucleotidos foram visualizadas por exposição do gel numa película de raios X.



As bandas de 231 bases da extremidade N em cada reacção são cortadas do gel, reunidos e eluidos a 4°C em 1 ml de acetato de amónia 0,5M e EDTA 1mM pH8. O DNA eluido foi precipitado com etanol e redissolvido em 30 µl de TRIS pH 7,6 70 mM, 5 mM DTT e 10 mM MgCl<sub>2</sub>. As bandas de 209 bases da extremidade C foram eluidas da mesma forma.

Os oligonucleotidos purificados através do gel foram fundidos antes da sua transformação a 90°C durante 4 minutos seguida de arrefecimento lento até 20°C. Presumindo uma recuperação de 5% dos oligonucleotidos iniciais de partida, 300 fmole e 100 fmole de oligonucleotidos de 231 pb fundidos, recuperados, foram ligados cada um a 100 fmole do fragmento de DNA de pBR322 de 3,9 kb EcoRI-BamHI em 20 µl de TRIS pH 7,8 25 mM, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM ATP em 1 unidade de ligase de DNA de T4 durante 1 hora a 20°C. Os oligonucleotidos fundidos de 209 pb foram ligados no fragmento de DNA de pBR322 de 3,9 kb BamHI-SalI sob as mesmas condições dos fragmentos de 231 pares de base. As reacções de ligação foram diluidas a 1:5 em H<sub>2</sub>O e 1 µl da diluição foi usada para transformar 20 µl de células de E. coli RR1 (BRL) competentes como descrito pelos fornecedores. As bactérias transformadas foram seleccionadas para o crescimento na presença de ampicilina e testadas para a presença dos fragmentos inseridos de 231 pb EcoRI-BamHI ou de 209 pb BamHI-SalI por análise de restrição de mini-lisados de preparação de plasmídeos.

A sequência de DNA dos clones que contêm fragmentos inseridos do tamanho apropriado foi determinada usando as técnicas químicas de sequenciação de DNA de Maxam and Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci USA 74:560-564 (1977). Uma vez que nenhum dos clones de 231 pb possuiu a sequência correcta, um clone que contém a sequência correcta foi preparado da seguinte forma. Um clone com a sequência



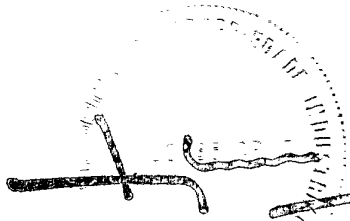
correcta entre os sitios Kpn I e BamHI foi clivado com kpn I e com Sal I as quais clivam no vector pBR322. A banda de 400 pb foi purificada através de um gel e ligada à banda de 3,8 kb kpn-SalI de um segundo clone que contem a sequênciã correctã entre os sitios KpnI e EcoRI do fragmento inserido do gene aFGF. Após transformação, o clone resultante foi sequenciado para assegurar que a sequênciã desejada foi obtida.

Uma vez obtido um clone que contém a sequênciã correctã de 209 pb, não é necessãria mais nenhuma manipulaçãõ desses clones. O gene final de aFGF sintético de comprimento completo foi clonado por clivagem da metade terminal N do clone com BamHI e SalI, tratamento com fosfatase alcalina e ligaçãõ deste ao fragmento inserido de 209 pb BamHI-SalI da metade da extremidade C do clone e purificado através de gel. Este material ligado foi usado para transformar células RR1 competentes como anteriormente.

### EXEMPLO 3

#### Mutagenese do gene aFGF bovino em gene aFGF humano

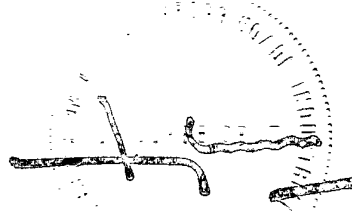
Para facilitar a mutagenese do gene aFGF bovino, o gene sintético do Exemplo 2 foi transferido para M13mp19, um vector de bacteriofago de DNA de cadeia simples. Os procedimentos padrãõ para a mutagenese foram usados tal como descrito por Zoller and Smith, *Methods in Enzymology*, 100: 468-500 (1983); Morris *et al.*, *Nucleic Acids Research* 11, 5103-502 (1983); Zoller and Smith, *DNA* 3: 479-488 (1984). O plasmideo bovino pKK-aFGF foi clivado com EcoRI e SalI e o fragmento resultante de 440 pb foi pu-



rificado através de um gel de agarose como no Exemplo 2. A RF do DNA do vector M13mp19 (BRL) foi clivada com os mesmas duas endonucleases e as extremidades subsequentemente desfosforiladas em 100  $\mu$ l de tampão TRIS pH 8,0 10 mM com 100 unidades de fosfatase alcalina bacteriana. A ligação foi realizada usando 50 mg do DNA do vector tratado e 12 ng do fragmento de DNA do gene aFGF em 10  $\mu$ l de TRIS pH 7,8 25 mM, 10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 0,4 mM ATP com 2 unidades de ligase de DNA de T<sup>4</sup> durante 16 horas a 4°C. A mistura de reacção foi diluída 1:5 em H<sub>2</sub>O e 1  $\mu$ l da diluição foi usada para transformar 20  $\mu$ l de células competentes de E. coli DH5 (BRL) segundo a descrição do fornecedor. As células foram semeadas com células hospedeiras E. coli JM 105 (Pharmacia) em 0,03% X-gel e 0,3 mM IPTG; após incubação a 37°C as placas incolores são isoladas. Um clone fágico que contém o gene aFGF bovino foi seleccionado - M13mp19-baFGF.

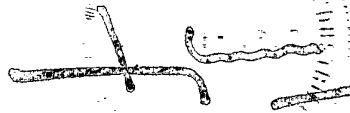
Oito oligonucleotidos foram projectados para especificar a sequência humana e sintetizados ver Tabela IX. O oligomero 8 contém uma mutação adicional na qual a Timina no sítio 386 no gene bovino é substituída por citosina no gene humano. Esta mutação permite a incorporação de um sítio de restrição sem alterar a sequência de aminoácidos do aFGF humano.

Os oligomeros humanos 1,2,3,4,6 e 8 foram fosforilados e 15 pmoles de cada foram fundidos individualmente a 0,5 pmole de DNA fágico de cadeia simples de M13mp19-baFGF em 10  $\mu$ l de TRIS pH 7,5 20 mM, 10 mM  $MgCl_2$ , 50 mM NaCl, 1 mM DTT durante 10 minutos a 65°C seguido de 10 minutos a 23°C. As moléculas de cadeia dupla fechada circular foram então preparadas em 20  $\mu$ l de TRIS pH 7,5 20 mM, 10 mM  $MgCl_2$ , 25 mM NaCl, 5,5 mM DTT, 0,5 mM ATP, 0,25 mM dATP, 0,25 mM dCTP, 0,25 mM dGTP, 0,25 mM dTTP usando 1 unidade de ligase de DNA de T<sup>4</sup> e 2 unidades do fragmento klenow

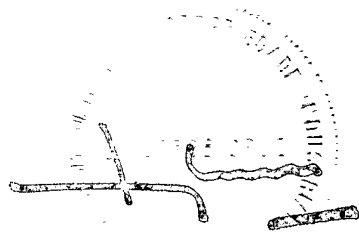


da DNA polimerase I e incubado a 15°C durante 17 horas. As preparações foram usadas cada uma para transformar células competentes JM105 e as placas transformadas resultantes foram selecionadas por hibridação com o oligomero apropriado que foi marcado radioativamente com  $^{32}\text{P}$ -ATP usando cinasa de polinucleotidos. As condições de hibridação foram otimizadas para cada sonda de forma a prevenir a formação de híbridos que contêm uma única base trocada. O DNA de cadeia simples foi isolado a partir do clone fágico que contém as mutações do oligomero 4 humano e o procedimento acima foi repetido usando o oligomero humano 5 de modo a gerar um clone que contenha as mutações de ambos os oligomeros 4 e 5.

No procedimento seguinte, as mutações de bovino para humano da sequência nesses clones de M13 foram reunidas num clone de pBR322. As RF de DNA foram preparados a partir de clones que contêm as trocas de bases especificadas pelos oligomeros humanos 1, 2, 6 e 8. O DNA do clone mutante humano 1 foi clivado com EcoRI, as extremidades foram desforiladas com fosfatase alcalina bacteriana e o DNA clivado com HindIII. O DNA mutante humano 2 foi clivado com HindIII, tratado com fosfatase e de seguida clivado com BamHI. O DNA do mutante humano 6 foi clivado com BamHI, tratado com fosfatase e clivado subsequentemente com ApaI. Da mesma forma, o DNA do mutante humano 8 foi clivado com ApaI, as extremidades foram desfosforiladas e o DNA foi clivado com SalI. Estas quatro preparações de DNA foram submetidas a electroforese através de agarose a 2% e os fragmentos de 45pb, 190 pb, 135 pb e 70 pb dos DNAs mutantes que contêm as mutações humanas 1,2,6 e 8 respectivamente foram eluídos do gel. Aproximadamente 60 fmoles de cada fragmento foram ligadas colectivamente a cerca de 60 fmoles do fragmento de 3,7 kb EcoRI-SalI de pBR322 purificado através de gel, em 5  $\mu\text{l}$  de TRIS pH 7,8 25 mM, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 0,4 mM ATP com 1,5 unidades



de ligase de DNA de T<sub>4</sub> durante 16 horas a 12°C. A mistura de reacção foi diluída 1:5 em H<sub>2</sub>O e 1 µl da diluição foi usado para transformar 20 µl de células competentes de E. coli DH5 (BRL) como descrito pelo fornecedor. Um clone que contém as mutações especificadas pelos quatro oligómeros mutantes foi seleccionado por hibridação com sondas radioactivas preparadas a partir de cada um dos oligómeros. O fragmento de DNA de 140 pb KpnI-BamHI isolado a partir de RF de DNA clivada do clone M13 do mutante humano 3 foi ligado aos produtos de clivagem por endonuclease do DNA do mutante humano 1-2-6-8 e usado para transformar células competentes DH5 de forma a gerar um clone com as mutações humanas 1-2-3-6-8. Os fragmentos produtos de digestão com BamHI e PstI deste último clone foram ligados aos fragmentos de RF de DNA digeridos com BamHI e PstI do clone de M13 humano 4-5 e a mistura da ligação foi usada para transformar células competentes DH5. Um clone que contém as mutações humanas 1-2-3-4-5-6-8 foi seleccionado por hibridação com um oligómero e o fragmento de DNA EcoRI-SalI do gene aFGF deste plasmídeo recombinante foi ligado à RF de DNA de M13 mp18 (BRL) tratada com fosfatase e clivada com EcoRI e SalI. Células competentes DH5 foram transformadas com este DNA ligado e as células transformadas foram semeadas em células hospedeiras JM105 de forma a gerar um clone de M13. O DNA fágico de cadeia simples deste clone foi fundido com o oligómero 7 humano e um clone de M13 que contém todas as mutações desejadas foi obtido seguindo o processo descrito acima. A RF de DNA foi preparada a partir deste clone e clivada com Sal I e EcoRI. A banda de 440 pb resultante foi purificada através de um gel e ligada ao fragmento de DNA de 2,7 kb EcoRI-SalI do vector de expressão com um promotor tac pKK 27. Este DNA foi usado para transformar células competentes DH5 gerando deste modo um clone de expressão pKK-aFGF humano usado para a produção da forma humana de aFGF.



EXEMPLO 4

Mutagenese dos codões cisteína do gene aFGF

Um clone recombinante de bacteriofago de cadeia simples do aFGF humano, M13mp18-haFGF, do Exemplo 3 foi mutagenizado usando processos descritos por Zuller and Smith, Methods in Enzymology 100: 468-500 (1983); Morris *et al.*, Nucleic Acids Research, 11:5103-5112 (1983); Zoller and Smith, DNA 3: 479-488 (1984). Três oligonucleonitos foram projectados de modo a especificar codões de serina no lugar de cada um dos codões de cisteína do gene aFGF humano nas posições 16,83 e 117. Os oligomeros sintetizados estão representados na Tabela XI com as bases mutadas sublinhadas.

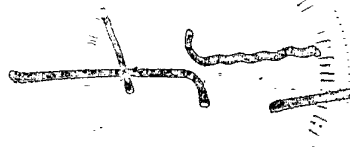
Os oligomeros foram fosforilados e 15 pmoles de cada foram fundidos individualmente com 330 ng de DNA de cadeia simples de M13mp18-haFGF em 10  $\mu$ l de TRIS pH 7,5 20mM, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl e 1 mM DTT durante dez minutos a 65°C seguido de 10 minutos a 23°C. Uma segunda cadeia de DNA foi sintetizada usando o oligomero fundido como iniciador em 20  $\mu$ l de TRIS pH 7,5 20 mM, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM NaCl, 55 mM DTT, 0,5 mM ATP, 0,25 mM dATP, 0,25 mM dCTP, 0,25 mM dGTP, 0,25 mM dTTP, usando 3 unidades de ligase de DNA de T4 e 0,4 unidades do fragmento klenow de DNA polimerase I, por incubação a 12°C durante 17 horas. Cada uma das três preparações foi diluída a 1:5 em H<sub>2</sub>O e 1  $\mu$ l da diluição foi usado para transformar aliquotas de 20  $\mu$ l de células competentes de E. coli DH5 (Bethesda Research Labs) segundo a descrição do fornecedor. As células transformadas foram semeadas com células E. coli JM105 que actuam como células hospedeiras para o vírus M13. As placas de bactérias transformadas resultantes foram seleccionadas por hibridação com um oligomero apropriado que foi marcado



radioactivamente usando  $^{32}\text{P}$ -ATP e cinasa de polinucleotidos. As condições de hibridação foram optimizadas para cada sonda de modo a prevenir a retenção de hibridos que contenham uma unica base trocada.

O DNA de cadeia simples foi isolado de clones fagicos cada um contendo mutações de cisteína para serina, e em seguida usado para sequenciação segundo o método de terminação de cadeia com dideoxinucleotidos de Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467 (1977). As RF de DNA foram então preparadas a partir de três clones, cada um contendo uma das mutações especificadas e, após eliminagem com EcoRI e Sal I, os fragmentos inseridos do gene FGF libertados foram isolados por electroforese através de um gel de agarose. Os fragmentos inseridos, purificados, de 440 pb foram ligados cada um ao fragmento de DNA de 2,7 kb EcoRI-SalI do vector de expressão que contém um promotor tac pKK 2,7 em 10  $\mu\text{l}$  de TRIS pH 7,8 25 mM, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 0,4 mM ATP com 3 unidades de ligase de DNA de  $T^4$  durante 2 horas a 14°C. Os DNAs ligados foram usados para transformar celulas competentes DH5 e os clones que contém DNA com os codões Cis mutados foram seleccionados por hibridação com um oligomero apropriado. O fragmento inserido do FGF no DNA do plasmideo destes clones foi completamente sequenciado usando o método quimico de Maxam and Gilbert, Methods in Enzymology 65: 499-560 (1980). Um clone continha somente a troca de uma base única do clone de expressão original de aFGF humano, gerando um codão de resina no lugar do codão de cisteína na posição 83 e é designado por pKK-haFGF (Ser 83).

Os clones que contém cada uma das outras duas mutações de cisteína para serina também continham trocas não especificas adicionais. Com o objectivo de gerar os mutantes de uma única base desejados foram realizados as seguintes ligações e transformações. O frag-



mento de DNA de 410 pb de HindIII do clone com o codão de serina na posição 16 foi isolado e ligado ao fragmento HindIII de 2,7 kb do clone de expressão original pKK-haFGF. O fragmento de DNA de 230 pb NcoI-SalI do clone que contém o codão de serina na posição 117 foi isolado e ligado ao fragmento de 2,9 kb NcoI-SalI de pKK-haFGF. Cada uma destas amostras foi usada para transformar células DH5 competentes; foram usadas técnicas de hibridação e sequencição para identificar os outros dois mutantes de uma só base desejados e designados por pKK-haFGF (Ser 16) e pKK-haFGF (Ser 117). Estes três clones foram usados para a produção das formas de aFGF humano Ser 16, Ser 83 e Ser 117.

Mutantes de aFGF humano dirigidos a um sítio com dois ou três resíduos de cisteína (Cis) convertidos em serina (ser) foram construídos por combinação de fragmentos de restrição de genes sintéticos mutantes Ser (16), Ser 83 e Ser 117 e do tipo selvagem não mutado, foram clonados em pKK 2,7 e subclonados em M13mp18 como descrito acima. Os recombinantes pKK-haFGF (Ser 16,83) e pKK-haFGF (Ser 16, 117) foram construídos por introdução do fragmento de 0,23 kb EcoRI-BamHI de M13mp18 (Ser 16), que inclui o codão para Ser 16, em pkk 2,7 seguido de inserção dos fragmentos de 0,2 kb BamHI-SalI quer de M13mp18 (Ser 83) quer de M13 mp18 (Ser 117). Uma vez que o vector pKk 2,7 contém dois sítios BamHI, um na sequência multiclonal e o segundo acima do promotor tac, foi usado nestas construções um vector pkk 2,7 modificado, no qual foi eliminado o segundo sítio BamHI. Após digestão com as correspondentes enzimas de restrição, subsequente ligação e transformação de células competentes Ab1899 (*E. coli* Genetic Stock Center) os clones resistentes à ampicilina foram testados para os plasmídeos com o peso molecular esperado para os recombinantes (3,1 kb).

O mutante haFGF (Ser 16, 83, 117)



foi construído por substituição do fragmento de 0,13 kb SphI-SalI de pkk-haFGF (Ser 16,83) pelo fragmento correspondente de pKK (Ser 117) que codifica para Ser no lugar de Cis na posição 117. O fragmento de 3kb Sph I-SalI de pkk (Ser 16,83) foi purificado por electroforese através de um gel preparativo de agarose, electroeluição e ligado ao fragmento de 0,13 kb SphI-SalI de pkk (Ser 117) purificado a partir de um gel de poliacrilamida a 5% da mesma maneira. Os fragmentos purificados foram ligados e os recombinantes seleccionados para resistência à ampicilina após transformação de células AB1899.

Para a construção de pKK-haFGF (Ser 83,117), o fragmento de 0,3 kb PstI de pKK-haFGF foi substituído pelo mesmo fragmento de pKK-haFGF (Ser 16,83, 117) que inclui os códons para Ser em vez de Cis nas posições 83 e 117 usando, basicamente, a mesma estratégia. As células transformadas de AB1899 foram seleccionadas para resistência à ampicilina e analisadas por digestão com PstI e SalI para determinar a orientação dos fragmentos ligados. Todos os genes mutantes foram sequenciados pelo método dideoxi usando reagentes para sequenciação standardizadas da USB Corp.

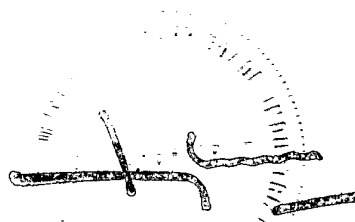


### EXEMPLO 5

#### Expressão do gene sintético bovino aFGF

Os genes de aFGF intactos do Exemplo 4 foram incorporados num plasmideo pkk 223-3 modificado. O plasmideo pkk 223-3 (Pharmacia) contém o promotor tac o qual é um híbrido entre regiões dos promotores trp e lac, de Baer et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 80: 2125 (1983). Este plasmideo também contém o sinal de terminação da transcrição rrnB de rRNA que é uma sequência de terminação forte capaz de permitir a expressão de promotores fortes, Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4936-4940 (1981); Brosina, Gene 27: 161-172 (1984). O plasmideo pKK 223-3 foi modificado de forma a remover o sítio para a enzima de restrição Sall derivado de pBR322. Isto foi conseguido por clivagem do DNA do plasmideo pKK223-3 com NdeI e NarI seguido de tratamento do fragmento de DNA com o fragmento Klenow de DNA polimerase de modo a tornar as extremidades cegas e recircularização do fragmento de DNA de 2,7 kb para gerar o clone pKK 2,7. O gene aFGF sintético foi então clivado do vector pBR322 e transferido para pKK 2,7 após restrição deste vector de expressão com EcoRI e Sall. Esta construção posiciona a metionina inicial do gene sintético, 11 bases abaixo do sítio Shine-Dalgarno de ligação aos ribossomas. Os vectores recombinantes resultantes, como exemplificado na Figura 1, foram usados para transformar células de E. coli JM 105 e de E. coli DH5.

Os clones de expressão cresceram a 37°C em meio LB (1% triptona, 0,5% de extracto de levedura, 0,5% de NaCl) contendo 0,4% de glucose e 50 µg/ml de ampicilina. Quando a densidade óptica a 550 nm atingiu 0,5, foi adicionado IPTG até 1 mM e o crescimento é continuado durante 3 horas a 37°C. As células são colhidas por centri-

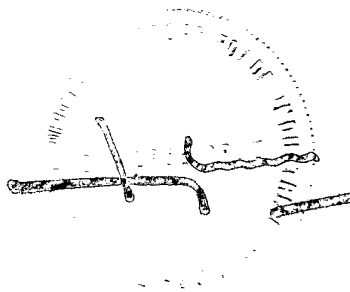


fugação a 10 000 g durante 20 minutos e as células de 1 litro de cultura são ressuspensas em tampão glicerol/fosfato salino 1:1 e congeladas rapidamente num banho de gelo/etanol e guardadas durante a noite a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### EXEMPLO 6

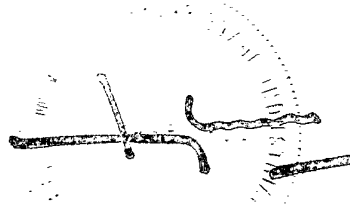
##### Vector de expressão aumentado

Níveis aumentados de expressão para as formas mutadas de aFGF do Exemplo 4 foram conseguidos por modificação do vector de expressão do Exemplo 3 de modo a introduzir um cistrão adicional acima da sequência que codifica para aFGF. Foram sintetizados dois oligonucleotidos com as sequências mostradas na pag 40. Quando fundidos estes oligomeros fornecem extensões de 4 bases na extremidade 5' que são complementares às extensões fornecidas pela clivagem com EcoRI, uma grelha de leitura aberta de 7 codões a seguir ao codão de iniciação da tradução ATG e antes do codão de paragem TAA e, um sitio Shine-Dalgarno de ligação aos ribossomas, adicional, localizado na grelha de leitura aberta acima do codão de paragem. Usando 1 pmole de cada oligomero, os oligomeros foram fundidos juntamente em 20  $\mu\text{l}$  de tampão de ligasa de DNA por aquecimento a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos seguido de arrefecimento lento. A mistura fundida 0,3 pmole, foi ligada a 0,1 pmole de DNA do plasmideo pkk-haFGF clivado com EcoRI num volume final de 25  $\mu\text{l}$  contendo 3 unidades de ligase de DNA de T4 (Pharmacia) durante 2,5 horas a  $14^{\circ}\text{C}$ . O DNA ligado, 5 ng, foi usado para transformar células competentes de E. coli JM 105. As células transfor-



madras foram testadas por análise de restrição uma vez que o sitio EcoRI é perdido durante a inserção, e por análise por "immunoblot". O vector de expressão de um clone que demonstrou altos níveis de produção do FGF foi sequenciado pela técnica química de Maxam and Gilbert, supra, para verificar a inserção correcta das novas sequências do cistrão. Subsequentemente, este vector de alta expressão pKK2c-haFGF foi transferido de E. coli DH5 através de processos de transformação.

Com o objectivo de exprimir o gene mutante haFGF (Ser 117), por exemplo, neste vector de alta expressão, o fragmento de 0,23 kb NcoI-SalI de pkk-haFGF (Ser 117) foi ligado ao fragmento de 2,5 kb NcoI-SalI de pKKac-haFGF e usado para transformar células competentes. Os outros haFGFs mutados foram transferidos para o vector de alta expressão com dois cistrões, de uma forma similar, substituindo os fragmentos de restrição apropriados que contêm sequências do tipo selvagem de pKK2c-haFGF, por fragmentos de restrição análogos de haFGF mutado.



### EXEMPLO 7

#### Extracção e purificação de aFGF mutado

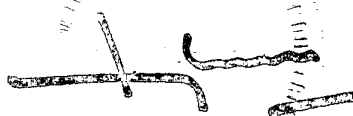
As células congeladas do exemplo 5 foram descongeladas e ressuspensas, numa quantidade suficiente para perfazer 50 ml, em tampão fosfato pH 7,2 100 mM contendo 5 mg/ml de EDTA após o que foram colhidas por centrifugação a 28000 g durante 5 minutos. As células foram lavadas uma segunda vez, colhidas por centrifugação e ressuspensas em 50 ml do mesmo tampão. As extinções das três suspensões de estirpes de mutantes a 660 nm foram: estirpe pKK-haFGF (Ser 117), 103; estirpe pkk-haFGF (Ser 83), 59; estirpe pKK-haFGF (Ser 16), 108. A cada amostra foi adicionado 0,1 mg/ml de lisozima e incubada durante 15 minutos com agitação suave a 30°C. As células foram colhidas por centrifugação e ressuspensas em 50 ml de tampão de destruição que consiste em fosfato pH 6,0 100 mM, 3 mM EDTA, 0,05 mM TPCK, 0,05 mM Pepsatina A, 0,05 mM Leupeptina e 15 µg/ml de BPTI. Cada suspensão celular é guardada a 4°C e destruída por duas passagens através de um compartimento de pressão francês previamente arrefecido, a 20000 psi a 4°C. As suspensões celulares disruptas foram centrifugadas durante 15 minutos a 15 000 rpm num rotor SS-34 Sorvall e durante 60 minutos a 45000 rpm num rotor 70 Ti numa ultracentrifuga Beckman a 4°C. Os fluidos sobrenadantes são colhidos e as extinções a 280 nm para um volume de 55 ml foram determinadas: pkk-haFGF (Ser 117), 44; pKK-haFGF (Ser 16), 40 e pkk-haFGF (Ser 83), 23; as amostras foram congeladas a -70°C.

Os fluidos sobrenadantes foram descongelados por adição de 200 ml de tampão fosfato pH 6,0 100 mM que continha CM-Sephadex à razão de 6,5 ml de resina sedimentada por grama de proteína (assumindo que a absorvân-



cia através de uma fenda de 1 cm de 1 mg/ml de proteína em solução é de 1,0). As amostras são colhidas num funil poroso de vidro e lavadas três vezes com 200 ml de tampão fosfato pH 6,0 100 mM que contem 150 mM NaCl. O bolo da resina foi ressuspensado em 200 ml do mesmo tampão, empacotado numa coluna, a  $12 \text{ ml} \times \text{hr}^{-1}$  por  $\text{cm}^2$  de secção, ARG e lavado à mesma velocidade com tampão fosfato 150 mM contendo 600 mM NaCl. As fracções que contêm a proteína são eluidas com o tampão 600 mM NaCl, reunidas e o pH ajustado a 7,2 e a condutividade ajustada com água desionizada a  $10 \mu\text{S} \times \text{cm}^{-1}$ . Heparina-Sepharose (preparada fresca) equilibrada com fosfato pH 7,2 10 mM foi então adicionada à razão de 1 ml de resina sedimentada por mg de proteína (usando o mesmo coeficiente de extinção assumido acima), a suspensão foi agitada suavemente durante 1 hora a  $4^\circ\text{C}$  e a resina colhida num funil, ressuspensa no mesmo tampão e empacotada numa coluna à razão de 1-2 volumes de coluna por hora. A coluna empacotada foi lavada com fosfato 10 mM, 0,8 M NaCl pH 7,2 à mesma velocidade até a extinção do eluido, a 280 nm, descer para um valor estável de cerca de 0,01 unidades ópticas de absorvância acima do tampão de eluição após o que o tampão é mudado para fosfato 10 mM, 1,5 M NaCl pH 7,2. As fracções que contêm a proteína com o tampão 1,5 M (controlada pela extinção a 280 nm) é reunida, aplicada a uma coluna  $\text{C}_3$  de HPLC de fase reversa equilibrada com TFA 10 mM e eluida com um gradiente de 0-67% de  $\text{CH}_3\text{CN}$  em 30 minutos.

Os dados da purificação dos diferentes estirpes é mostrado abaixo:

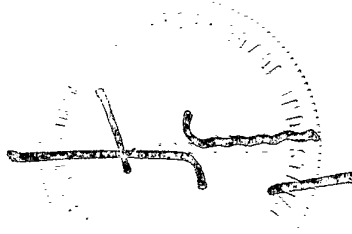


pKK-haFGF (Ser 16):

Às fracções 25-31 eluidas da coluna de CM-Sephadex com o tampão NaCl 0,6 M, num volume total de 24 ml e contendo 3,5 mg de proteína foi acrescentada água desionizada até 125 ml (condutividade final: 7 mS/cm) e 4 ml de heparina - Sepharose foram adicionados. A coluna foi corrida a 6 ml/h. As fracções 55-57 eluidas com 1,5 M NaCl foram injectadas numa coluna C<sub>3</sub>. Desta coluna o pico maior foi colhido e possuía um conteúdo em proteína de 80 µg.

pKK-haFGF (Ser 83):

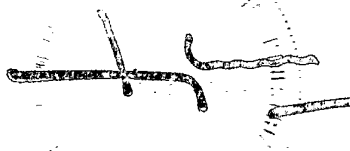
Às fracções 19-33 eluidos da coluna de CM-Sephadex com o tampão de 0,6 M NaCl num volume total de 40 ml e com um conteúdo em proteína de 4,0 mg foi adicionado água desionizada (condutividade final: 10 mS/cm) até perfazer 150 ml e 4 ml de heparina - Sepharose. A coluna foi corrida a 6 ml/h. As fracções 40-44 eluidas com 1,5 M NaCl foram injectadas numa coluna C<sub>3</sub>. Desta coluna foi colhido o pico maior com um conteúdo em proteína de 80 µg.



pKK-haFGF (Ser 117):

Às fracções 19-33 eluidas da coluna de CM-Sephadex com tampão 0,6 M de NaCl num volume total de 57 ml e um conteúdo em proteína de 11,4 mg foi adicionada água desionizada (condutividade final: 12 mS/cm) até perfazer 250 ml e 10 ml de heparina-Sepharose. A coluna foi corrida a 11 ml/h. As fracções 59-62, eluidas com 1,5 M NaCl, foram injectadas numa coluna  $C_3$ . Desta coluna foi colhido o pico maior com um conteúdo em proteína de 614  $\mu$ g.

Os produtos proteicos dos múltiplos mutantes foram purificados pelos mesmos processos. Todas as formas de aFGF, tipo selvagem recombinante e mutantes foram altamente purificados uma vez que apenas foram observadas bandas de 16 KDa após redução e electroforese através de um gel de 15% de poliacrilamida com SDS com aplicações 100 vezes superiores ao limite de detecção.



EXEMPLO 7

Actividade biológica do aFGF mutagenizado

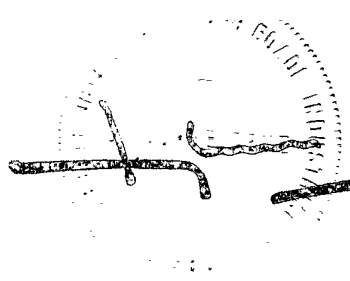
A actividade biológica do r-aFGF purificado do Exemplo 6 foi avaliada usando um ensaio mitogenico de fibroblastos modificado a partir de Thomas et al., J. Biol. Chem. 225: 5517-5520 (1980). Fibroblastos de Balb/C 3T3 A31 (American Type Culture Collection) foram semeados a  $3 \times 10^4$  células por 100  $\mu$ l por compartimento em placas de cultura de 96 compartimentos num meio de cultura que contém 10% de soro de vitela inactivado pelo calor e, incubados em 7%  $\text{CO}_2$  (pH  $7,35 \pm 0,05$ ). As células tornam-se completamente estacionárias por substituição do meio com soro de vitela inactivado pelo calor a 1,0% 6 e 24 horas mais tarde. Às 55 horas após as células terem sido semeadas foram adicionados 10  $\mu$ l da amostra a testar com ou sem 5  $\mu$ g de heparina e 0,11  $\mu$ g de dexametasona, às 70 horas cada compartimento foi suplementado com 0,2  $\mu$ Ci de [metil- $^3\text{H}$ ]-timidina (20 Ci/mole, New England Nuclear) e 0,3  $\mu$ g de timidina não marcada (Sigma) e, às 95 horas as células são procuradas para determinação da radioactividade incorporada no DNA. Cada ponto de resposta à dose é a média de quatro determinações. Os resultados com o mutante Ser-117, a única forma de mutante com actividade igual ou superior ao tipo selvagem, são mostrados na tabela seguinte:



TABELA XII

Respostas Mitogénicas de Fibroblastos de Balb/C 3T3 a  
aFGF Mutagenizado

Dose (amt/ml)	tipo selvagem		Mutante Ser-117	
	-heparina	+heparina	-heparina	+heparina
3.16 pg	1449	724	2055	883
10.0 pg	1917	914	2662	1255
31.6 pg	1547	1007	3076	2748
100 pg	2263	2498	4833	8067
316 pg	2647	14945	11505	44193
1.00 ng	3975	54516	22869	66778
3.16 ng	6400	68447	40487	60306
10.0 ng	12665	61294	54163	56326
31.6 ng	21843	56552	70670	59854
100 ng	44744	66816	66802	63856



As 4 curvas de titulação são comparadas pelo seu crescimento semi-máximo. O WT na ausência de heparina não alcança um pico e, por isso, é assumida uma magnitude do pico semelhante à dos outros 3 e o valor semi-máximo extrapolado.

TABELA XIII

Comparação das concentrações necessárias para uma estimulação semi-máxima

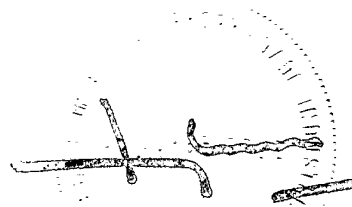
<u>Amostra</u>	<u>Heparina</u>	<u>Conc. da estimulação 1/2 Máxima</u>
WT	-	66 ng/ml
	+	0,56 ng/ml
Ser-117	-	2,3 ng/ml
Mutante	+	0,20 ng/ml

Todas as diluições foram preparadas a partir duma solução mãe que contém 1,51 mg/ml de reagentes purificados. O mutante Ser-117 é pelo menos tão activo como o tipo selvagem na presença de heparina. A actividade do tipo selvagem é pelo menos 10 vezes mais dependente em heparina do que o mutante e, conseqüentemente, 90% da dependência em heparina do aFGF de WT é eliminada no mutante Ser-117.

O ensaio mitogenico usado para avaliar a actividade biologica foi modificado da forma a poderem ser comparados os aFGF de tipo selvagem e mutagenizados. O soro de vitela inactivado pelo calor foi substituído por 1% de insulina-selenio-transferina (ITS), 0,4 gm de L-histidina, 50  $\mu$ l de 1M etanolamina, 1,25 gm de albumina bovina de soro, por 5,35 mg de ácido linoleico por litro de 75% DMED, 25% de Ham F12 contendo penicilina-estreptomicina e 2-glutamina como descrito acima. Os ensaios de dose-resposta completa foram realizados como descrito acima com diluições sucessivas a 1:2 até pelo menos 3 log de ordem de concentração de aFGF, cobrindo o aumento completo da resposta em relação ao fundo através do pico de níveis de síntese de DNA. Todos os pontos de concentração foram feitos em quadruplicado, em células Balb/C 3T3 confluentes em placas de 96 compartimentos. Uma unidade estimuladora é calculada como a quantidade de aFGF por ml que gera a resposta semi-máxima. A actividade mitogenica especifica é o numero de unidades estimuladoras por mg de aFGF puro. Todas as amostras de aFGF foram prediluidas a 50  $\mu$ g/ml no mesmo solvente de TFA/CH<sub>3</sub>CN. As actividades do aFGF de tipo selvagem ou mutagenizado são comparadas na Tabela seguinte.

TABELA XIV

<u>Amostra</u>	<u>Com Heparina</u>	<u>Sem Heparina</u>	<u>Vezes de Aumento</u>
WT	5,37 ng/ml (0,186 X 10 <sup>6</sup> )	269 pg/ml (3,72 X 10 <sup>6</sup> )	20,0
Ser 16	33,9 ng/ml (0,030 x 10 <sup>6</sup> )	400 pg/ml (2,50 x 10 <sup>6</sup> )	84,8
Ser 83	4,36 ng/ml (0,229 x 10 <sup>6</sup> )	251 pg/ml (3,98 x 10 <sup>6</sup> )	17,4
Ser 117	182 ng/ml (0,549 x 10 <sup>6</sup> )	240 pg/ml (4,17 x 10 <sup>6</sup> )	7,58
Ser 16,83	800 pg/ml (1,25 x 10 <sup>6</sup> )	195 pg/ml (5,13 x 10 <sup>6</sup> )	4,10
Ser 16,117	741 pg/ml (1,35 x 10 <sup>6</sup> )	148 pg/ml (6,76 x 10 <sup>6</sup> )	5,01
Ser 83,117	295 pg/ml (3,39 x 10 <sup>6</sup> )	100 pg/ml (10,0 x 10 <sup>6</sup> )	2,95
Ser 16,83,117	427 pg/ml (2,34 x 10 <sup>6</sup> )	107 pg/ml (9,35 x 10 <sup>6</sup> )	3,99



As estabilidades relativas do haFGF recombinante de tipo selvagem, dos mutantes de uma só Ser e dos mutantes de multiplos Ser foram determinadas. As actividades mitogénicas foram medidas após 0, 1 e 8 dias de incubação em soluções de DME livres de soro, normalmente usados para diluições em série das amostras que foram tampoadas a pH 7,3 com CO<sub>2</sub> a 37°C, contendo 1 mg/ml de albumina do soro humano. As amostras mitogénicas são guardadas a 512 mg/ml, com ou sem 500 µg/ml de heparina, equivalentes a concentrações 10 vezes, dos quais o mais alto ponto de concentração no ensaio é diluído. Cada ensaio foi guardado e ensaiado quer na presença quer na ausência de heparina. As estabilidades relativas escaladas de forma a que cada actividade do dia 0 seja de 100%, são mostradas na Figura 2 em função do tempo de armazenamento. Na Fig. 2 ▽ corresponde ao tipo selvagem; ▲ corresponde ao haFGF (Ser 16); ■ corresponde ao haFGF (Ser 83); ● corresponde ao haFGF (Ser 117); ▽ corresponde ao haFGF (Ser 16,83); △ corresponde ao haFGF (Ser 16,117); □ corresponde ao haFGF (Ser 83,117); ○ corresponde ao haFGF (Ser 16,83,117).

A perda de actividade do tipo selvagem e de mutantes de haFGF na presença de heparina enquadra-se preferivelmente numa queda experimental, ver a Fig. 4A. As actividades de todos os mutantes excepto Ser (16) são mais estáveis que as do tipo selvagem mitogenico. Os mutantes mais estáveis são Ser (16,83,117), Ser (117), Ser (16,83), Ser (83,117), Ser (16,83) e Ser (83), Ser (16). A estabilidade do Ser (83) foi apenas um pouco maior que a do tipo selvagem. As várias formas de aFGF são menos estáveis na ausência de heparina e, com a aparente excepção do Ser (16,83,117), o decaimento parece não ser uma função exponencial simples em relação ao periodo de tempo.

Uma amostra do vector de expres-



são pKK-haFGF (Ser 117) designada por A48-la 1 contendo um gene capaz de exprimir o mutante serina 117 em E. coli DM5 foi depositado na American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 USA, em 30 de Setembro de 1987 sob o tratado de Budapeste e foi-lhe dado o numero 67522 da ATCC.



REIVINDICAÇÕES:

1ª. - Processo para a produção de formas microheterogênicas de um mutante recombinante humano, activo biologicamente, do factor de crescimento ácido de fibroblastos caracterizado por compreender os seguintes passos:

- a. inclusão num plasmideo, que contém a sequência de nucleotídeos que codifica o mutante humano microheterogénico do factor de crescimento ácido de fibroblastos, da sequência a ser expressa por um hospedeiro que contém o plasmideo, seguido de
- b. incorporação do plasmideo num hospedeiro; e
- c. manutenção do hospedeiro que contém o plasmideo sob condições propícias para a expressão da sequência de nucleotídeos que produz o mutante recombinante humano microheterogénico do factor de crescimento ácido de fibroblastos.

2ª. - Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se produzir um mutante recombinante humano, activo biologicamente de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos.

3ª. - Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se produzir um mutante recombinante humano, activo biologicamente, de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos que compreende a substituição de um ou mais resíduos de cisteína nas posições 16, 83 e 117, numerados



de acordo com a forma microheterogénica nativa humana de 140 aminoácidos, por um aminoácido incapaz de formar ligações dissulfureto intramoleculares ou intermoleculares e, opcionalmente, tendo uma metionina adicional ligada ao vulgarmente considerado como primeiro aminoácido na extremidade N da referida forma heterogénica.

4ª. - Processo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por se produzir um mutante recombinante humano das formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos em que o mutante do factor de crescimento ácido de fibroblastos é da forma microheterogénica de 154, 140 ou 139 aminoácidos.

5ª. - Processo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por se produzir um mutante recombinante humano das formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos em que o aminoácido substituído é a serina.

6ª. - Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se produzir um mutante recombinante humano, activo biologicamente, de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos que compreende a substituição de todas as três cisteínas nas posições 16, 83 e 117, numeradas de acordo com a forma microheterogénica nativa humana de 140 aminoácidos, por um aminoácido incapaz de formar ligações dissulfureto intramoleculares ou intermoleculares e, opcionalmente, contendo uma metionina adicional ligada ao geralmente considerado como primeiro aminoácido na extremidade terminal das referidas formas microheterogénicas.

7ª. - Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por se produzir um mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do fac-



tor de crescimento ácido de fibroblastos em que o mutante do factor de crescimento ácido de fibroblastos pertence à forma microheterogénica de 154, 140 ou 139 aminobácidos.

8ª. - Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por se produzir um mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos em que o aminoácido substituído é a serina.

9ª. - Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se produzir um mutante recombinante humano, activo biologicamente, de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos que compreende a substituição de dois quaisquer resíduos de cisteína nas posições 16, 83 ou 117, numerados de acordo com a forma microheterogénica nativa humana de 140 aminoácidos, por um aminoácido incapaz de formar ligações dissulfureto intramoleculares ou intermoleculares e, opcionalmente contendo uma metionina adicional ligada ao geralmente considerado como primeiro aminoácido na extremidade terminal N da referida forma microheterogénica.

10ª. - Processo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por se produzir um mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos em que o mutante do factor de crescimento ácido de fibroblastos pertence à forma microheterogénica de 154, 140 ou 139 aminoácidos.

11ª. - Processo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por se produzir um mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos em que o aminoácido substituído é a serina.



12ª. - Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se produzir um mutante recombinante humano, activo biologicamente, de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos que compreende a substituição da cisteína da posição 117, numerados de acordo com o forma microheterogénica nativa humana de 140 aminoácidos, por um aminoácido incapaz de formar ligações dissulfureto intramoleculares ou intermoleculares e, opcionalmente, contendo uma metionina adicional ligada ao vulgarmente considerado como primeiro aminoácido na extremidade terminal N do referido mutante do factor de crescimento ácido de fibroblastos e que é detentor de maior actividade biologica do que o factor de crescimento ácido de fibroblastos nativo humano.

13ª. - Processo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por se produzir um mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos é da forma microheterogénica de 154, 140 ou 139 aminoácidos.

14ª. - Processo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por se produzir um mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos em que o aminoácido substituído é a serina.

15ª. - Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se produzir um mutante recombinante humano, activo biologicamente, de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos das reivindicações 1, 2, 5, 8 ou 11 em que o residuo de metionina na posição 67, numerado de acordo com a forma microheterogénica nativa humana de 140 aminoácidos, é substituído por um aminoácido não oxidável e, opcionalmente, contendo



uma metionina adicional ligada ao geralmente considerado como primeiro aminoácido na extremidade terminal N das referidas formas microheterogénicas.

16<sup>a</sup>. - Processo, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por se produzir um mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos em que o aminoácido não oxidável pelo ar é a alanina, valina, leucina ou isoleucina.

17<sup>a</sup>. - Processo, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por o aminoácido ser a leucina.

18<sup>a</sup>. - Processo, para a produção de uma sequência de nucleotídeos caracterizado por se obter uma sequência que codifica o mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos obtido de acordo com a reivindicação 3.

19<sup>a</sup>. - Processo, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por se produzir uma sequência de nucleotídeos em que está ligado acima da referida sequência que codifica o mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos, um cistrão que aumenta a expressão do factor de crescimento ácido de fibroblastos.

20<sup>a</sup>. - Processo, para a produção de uma sequência de nucleotídeos caracterizado por obter uma sequência que codifica o mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos obtido de acordo com a reivindicação 6.



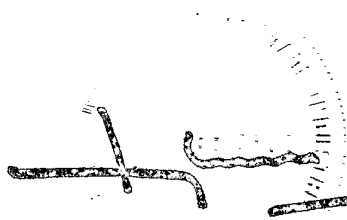
21<sup>a</sup>. - Processo, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado por se produzir uma sequência de nucleotidos em que está ligado acima da referida sequência que codifica o mutante recombinante humano de formas microheterogênicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos, um cristão que aumenta a expressão do factor de crescimento ácido de fibroblastos.

22<sup>a</sup>. - Processo para a produção de uma sequência de nucleotidos caracterizado por se obter uma sequência que codifica o mutante recombinante humano de formas microheterogênicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos obtido de acordo com a reivindicação 9.

23<sup>a</sup>. - Processo, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por se produzir uma sequência de nucleotidos em que está ligado acima da dita sequência que codifica para o mutante recombinante humano de formas microheterogênicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos, um cristão que aumenta a expressão do factor de crescimento ácido de fibroblastos.

24<sup>a</sup>. - Processo para a produção de uma sequência de nucleotidos caracterizado por se obter uma sequência que codifica o mutante recombinante humano de formas microheterogênicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos obtido de acordo com a reivindicação 12.

25<sup>a</sup>. - Processo, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por se produzir uma sequência de nucleotidos em que está ligado acima da referida sequência que codifica para o mutante recombinante humano de formas microheterogênicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos, um cristão que aumenta a expressão do factor



de crescimento ácido de fibroblastos.

26ª. - Processo para a produção de uma sequência de nucleotídeos caracterizado por se obter uma sequência que codifica o mutante recombinante humano de formas microheterogénica do factor de crescimento ácido de fibroblastos obtido de acordo com a reivindicação 15.

27ª. - Processo, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por se produzir uma sequência de nucleotídeos em que está ligado acima da referida sequência que codifica para o mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos, um cistrão que aumenta a expressão do factor de crescimento ácido de fibroblastos.

28ª. - Processo para a produção de uma composição farmacéutica para a reparação de tecido mole, tecido muscular do esqueleto, cartilagem, tecido vascular e tecido nervoso e para a produção de activador do plasminogénio, caracterizado por se incluir na referida composição um veículo farmacéutico e uma quantidade eficaz do mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos obtido de acordo com a reivindicação 2.

29ª. - Processo para a produção de uma composição farmacéutica para a reparação de tecido mole, tecido muscular do esqueleto, cartilagem, tecido vascular e tecido nervoso e para a produção de activador do plasminogénio, caracterizado por se incluir na referida composição um suporte farmacéutico a uma quantidade eficaz do mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos obtido de acordo com a reivindicação 3.



30ª. - Processo, para a produção de uma composição farmacêutica para a reparação de tecido mole, tecido muscular do esqueleto, cartilagem, tecido vascular e tecido nervoso e para a produção de activador do plasminogénio, caracterizado por se incluir na referida composição um suporte farmacêutico e uma quantidade eficaz do mutante recombinante humano microheterogénico do factor de crescimento ácido de fibroblastos obtido de acordo com a reivindicação 6.

31ª. - Processo, para a produção de uma composição farmacêutica para a reparação de tecido mole, tecido muscular do esqueleto, cartilagem, tecido vascular e tecido nervoso e para a produção de activador do plasminogénio, caracterizado por se incluir na referida composição um suporte farmacêutico e uma quantidade eficaz do mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos obtido de acordo com a reivindicação 9.

32ª. - Processo para a produção de uma composição farmacêutica para a reparação de tecido mole, tecido muscular do esqueleto, cartilagem, tecido vascular e tecido nervoso e para a produção de activador do plasminogénio, caracterizado por se incluir na referida composição um suporte farmacêutico e uma quantidade eficaz de mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos da reivindicação 12.

33ª. - Processo para a produção de uma composição farmacêutica para a reparação de tecido mole, tecido muscular do esqueleto, cartilagem, tecido vascular e tecido nervoso e para a produção de activador do plasminogénio, caracterizado por se incluir na referida composição um suporte farmacêutico e uma quantidade eficaz do



mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos obtido de acordo com a reivindicação 15.

34ª. - Método para a promoção da reparação de tecido mole, tecido muscular do esqueleto, cartilagem, tecido vascular e tecido nervoso e da promoção da produção de activador do plasminogénio caracterizado por compreender a administração a um paciente que necessite de tal tratamento de uma quantidade eficaz do mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos obtido de acordo com a reivindicação 2, sendo as gamas de dosagem de substância activa as seguintes:

a) Reparação de tecido mole

a.1) Administração tópica: cerca de 0,1 a cerca de 100 pg/  
/cm<sup>2</sup>/dia.

a.2) Administração subcutânea: cerca de 1 a cerca de 100 pg/  
/cm<sup>3</sup>/dia.

b) Reparação do tecido muscular do esqueleto e da cartilagem:

b.1) Administração no local: cerca de 10 a cerca de 100 µg/  
/cm<sup>3</sup>/dia.

c) Angiogénese in vivo:

c.1) Administração subcutânea: cerca de 1 a cerca de 1000  
µg/cm<sup>3</sup>/dia.

c.2) Administração tópica: cerca de 100 ng a cerca de 100  
µg/cm<sup>3</sup>/dia.



d) Reparação de vasos grandes

d.1) Dose única: cerca de 0,1 a cerca de 100 ng/cm<sup>3</sup>.

d.2) Infusão contínua: cerca de 1 a cerca de 1000 pg/cm<sup>3</sup>/  
/dia.

e) Produção de activador de plasminogénio

e.1) cerca de 10 µg a cerca de 10 mg/kg/dia.

35ª. - Método para a promoção da reparação de tecido mole, tecido muscular do esqueleto, cartilagem, tecido vascular e tecido nervoso e de promoção da produção de activador do plasminogénio caracterizado por compreender a administração a um paciente que necessite de tal tratamento de uma quantidade eficaz do mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos obtido de acordo com a reivindicação 3, sendo a gama de dosagem de substância activa como referido na reivindicação 34.

36ª. - Método para a promoção da reparação de tecido mole, tecido muscular do esqueleto, cartilagem, tecido vascular e tecido nervoso e de promoção da produção de activador do plasminogénio caracterizado por compreender a administração a um paciente que necessite de tal tratamento de uma quantidade eficaz do mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos obtido de acordo com a reivindicação 6, sendo a gama de dosagem de substância activa como referido na reivindicação 34.

37ª. - Método para a promoção da reparação de tecido mole, tecido muscular do esqueleto,

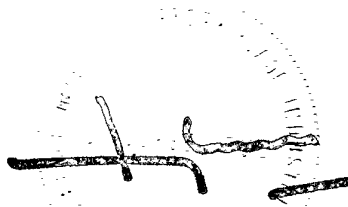


cartilagem, tecido vascular e tecido nervoso e da promoção da produção de activador do plasminogénio caracterizado por compreender a administração a um paciente que necessite de tal tratamento de uma quantidade eficaz do mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos obtido de acordo com a reivindicação 9, sendo a gama de dosagem de substância activa como referido na reivindicação 34.

38ª. - Método para a promoção da reparação de tecido mole, tecido muscular do esqueleto, cartilagem, tecido vascular e tecido nervoso e de promoção da produção de activador de plasminogénio caracterizado por compreender a administração a um paciente que necessite de tal tratamento de uma quantidade eficaz do mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos obtido de acordo com a reivindicação 12, sendo a gama de dosagem de substância activa como referido na reivindicação 34.

39ª. - Método para a promoção da reparação de tecido mole, tecido muscular do esqueleto, cartilagem, tecido vascular e tecido nervoso e de promoção da produção de activador do plasminogénio caracterizado por compreender a administração a um paciente que necessite de tal tratamento de uma quantidade eficaz do mutante recombinante humano de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos obtido de acordo com a reivindicação 15, sendo a gama de dosagem de substância activa como referido na reivindicação 34.

40ª. - Processo para a produção de um mutante recombinante bovino, activo biologicamente de formas microheterogénicas do factor de crescimento ácido de fibroblastos caracterizado por compreender a substituição de um ou mais residuos de cisteina nas posições 16, 47



e 83, numerados de acordo com a forma microheterogénica nativa bovina de 140 aminoácidos por um aminoácido incapaz de formar ligações dissulfureto intramoleculares ou intermoleculares e, opcionalmente, contendo uma metionina adicional ligada ao geralmente considerado como primeiro aminoácido na extremidade terminal N da referida forma microheterogénica.

41<sup>a</sup>. - Processo, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado por se produzir um mutante recombinante bovino do factor de crescimento ácido de fibroblastos microheterogénico da reivindicação 40 em que o resíduo de metionina na posição 67, numerado de acordo com a forma microheterogénica nativa bovina de 140 aminoácidos, é substituído por um aminoácido não oxidável pelo ar e, opcionalmente, contendo uma metionina adicional ligada ao que é geralmente considerado como primeiro aminoácido na extremidade terminal N das referidas formas microheterogénicas.

42<sup>a</sup>. - Processo para a produção de um mutante recombinante humano, biologicamente activo do factor de crescimento ácido de fibroblastos caracterizado por se incluir no referido mutante a seguinte sequência de aminoácidos:





e todas as suas formas microheterogénicas com, opcionalmente uma metionina adicional ligada ao que é geralmente considerado como primeiro aminoácido na extremidade terminal N da referida forma microheterogénica.

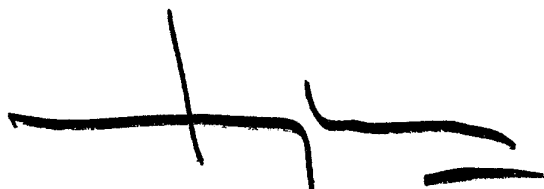
45ª. - Processo, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado por se produzir um mutante recombinante humano do factor de crescimento ácido de fibroblastos microheterogénico em que o residuo de metionina na posição 67 é substituído por leucina.

46ª. - Processo para a produção de um mutante recombinante humano activo biologicamente do factor de crescimento ácido de fibroblastos caracterizado por se incluir no referido mutante a seguinte sequência de aminoácidos:



47<sup>a</sup>. - Processo, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado por se produzir um mutante recombinante humano do factor de crescimento ácido de fibroblastos microheterogénico da reivindicação 46 em que o residuo de metionina na posição 67 é substituído por leucina.

Lisboa, 21 de Outubro de 1988



J. PEREIRA DA CRUZ  
Agente Oficial da Propriedade Industrial  
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.<sup>o</sup>  
1200 LISBOA

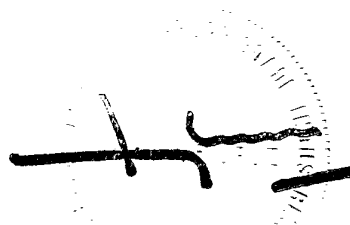
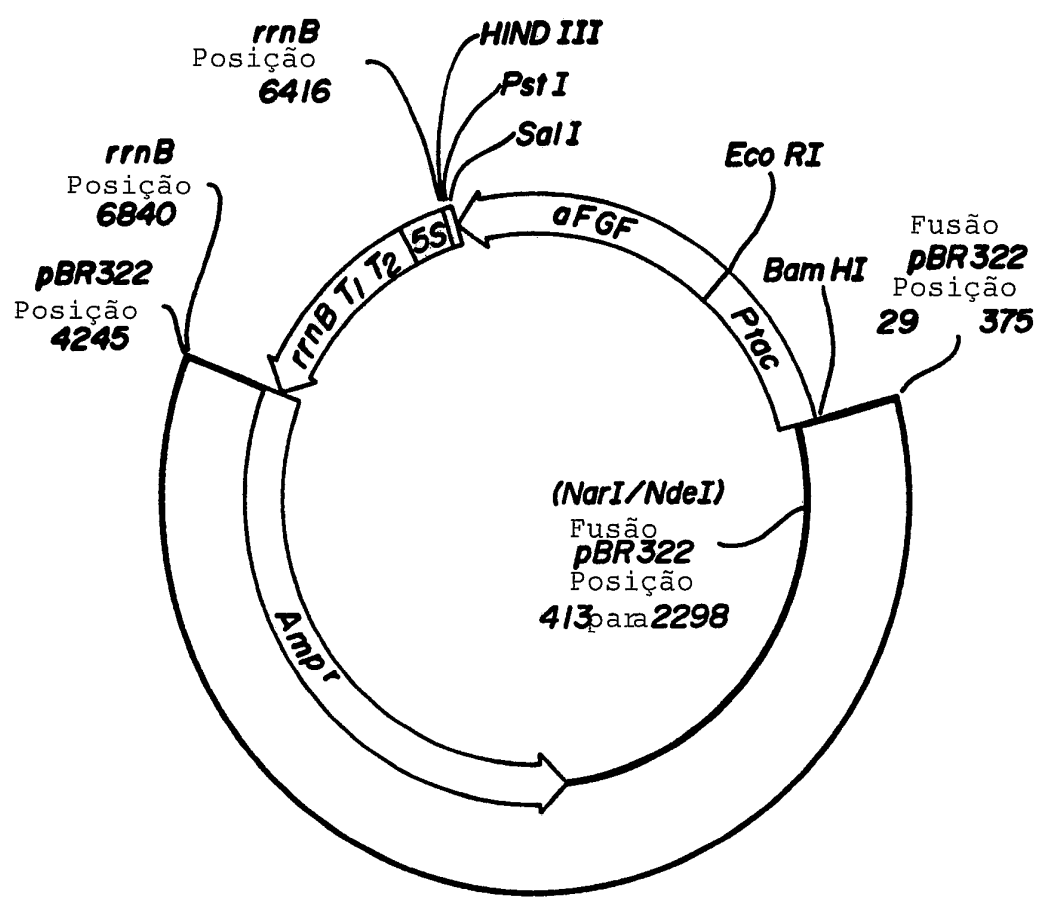


FIG-1 112



2/2

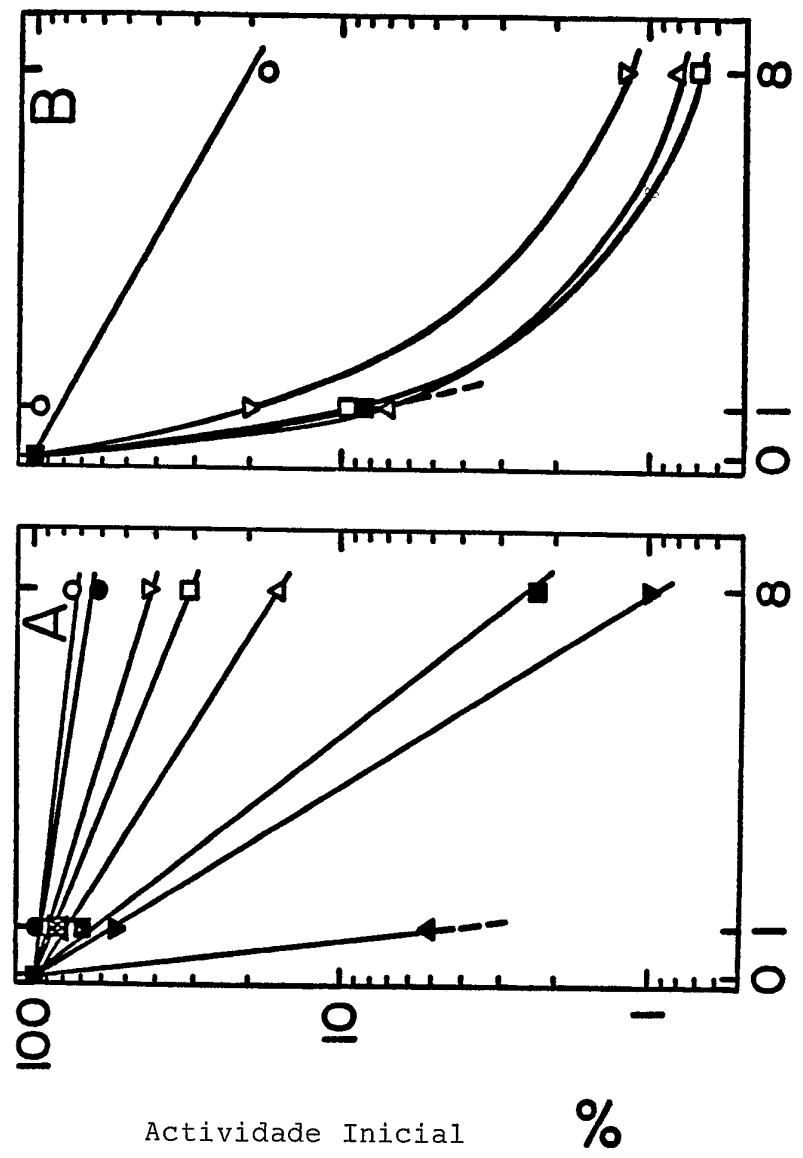


FIG-2