

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

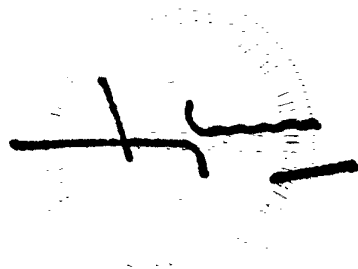
**N.º** 97.445

**REQUERENTE:** SCHERING CORPORATION, norte-americana, industrial, com sede em 2000 Galloping Hil Road, Kenilworth, New Jersey 07033, Estados Unidos da América do Norte

**EPÍGRAFE:** "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE RECEPTORES DE INTERFERÃO GAMA TRUNCADOS E SOLÚVEIS"

**INVENTORES:** PAUL J.ZAVODNY; SATWANT K.NARULA; MARY ELIZABETH PETRO; DANIEL J.LUNDELL e JAMES D. COSSETTA

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883. 24 de Abril de 1990 sob o No. 513.729 nos Estados Unidos da América do Norte



SCHERING CORPORATION

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE RECEPTORES DO INTERFERÃO GAMA TRUNCADOS E SOLÚVEIS"

=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de receptores do interferão gama truncados e solúveis, especialmente o domínio extracelular solúvel do receptor humano, juntamente com sequências de DNA os codificam e linhas celulares transformadas que os produzem.

O referido processo consiste na construção de um vector que compreende uma sequência de nucleotídeos codificadora do referido receptor solúvel, em que a sequência de nucleotídeos é capaz de ser expressa por um hospedeiro contendo o vector, na incorporação do vector no hospedeiro, e na manutenção do hospedeiro contendo o vector sob condições adequadas para a expressão da sequência de nucleotídeos no receptor solúvel.

São também referidos os métodos para usar tais receptores para inibir a ligação do interferão gama ao seu receptor celular.

## CAMPO TÉCNICO

Este invento está relacionado com receptores de interferção gama truncados e solúveis e em particular com fracções extracelulares solúveis do receptor de interferção gama.

## FUNDAMENTO DO INVENTO

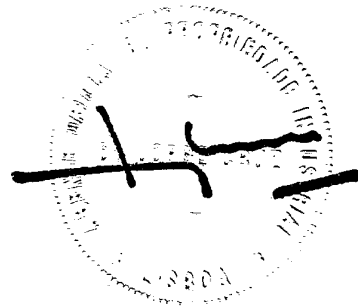
O interferção gama, até agora por vezes referido como IFN-gama, é uma citocina produzida por células T auxiliares activadas; ele tem efeitos directos sobre vários tipos celulares tais como células B, macrófagos e células T. Ele tem múltiplos efeitos (Trinchieri et al., Immunology Today, 6:131-136 (1985); uma das suas actividades mais distintas é induzir a expressão de genes do complexo major de histocompatibilidade (MHC) classe I e classe II (Kelley et al., J. Immunol., 132:240-245 (1984); Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:4917-4921 (1984); Cooper et al., J. Immunol., 141:1958-1962 (1988); e Amaldi et al., J. Immunol., 142:999-1004 (1989)). A expressão de genes de MHC classe II é uma marca das células apresentadoras de antígeno. A expressão de antígenos da classe II é observada em macrófagos e em células B e T maduras; e sabe-se que o interferção gama regula de forma positiva esta expressão. Em adição, sabe-se que o interferção gama induz a expressão de genes codificadores de antígenos da classe II em células que não são células apresentadoras de antígeno primárias, tais como células epiteliais, fibroblastos, astrócitos, células endoteliais e células do músculo liso. Não se sabe ao certo se estes tipos celulares apresentam de facto antígenos, mas mostrou-se que a indução que os antígenos classe II nestes tipos celulares está correlacionado com o desenvolvimento de doenças auto-imunes (Massa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:4219-4213 (1987)). Uma vez que o interferção gama é o estimulador primário dos antígenos da classe



II, ele poderá desempenhar um papel importante na expressão da doença. Portanto, um inibidor do interferão gama ou dos seus efeitos, por exemplo um que actue ao nível da interface do receptor, teria grande valor potencial e utilidade no tratamento de doenças auto-imunes.

Foram feitas tentativas para inibir os efeitos do interferão gama em murganhos através da administração de anticorpos monoclonais contra ele (Grau et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 86:5572-5574 (1989)). No entanto, para se aplicar este tratamento a humanos deve-se ter em conta a possibilidade de os próprios anticorpos monoclonais poderem induzir uma resposta imune neutralizante que pudesse reduzir a eficácia do tratamento.

São conhecidos clones recombinantes expressando receptores de interferão gama (ver, por exemplo, "Molecular Cloning and Expression of the Human Interferon-Gama Receptor", Aguet, G., et al., Cell, 55:273-280 (1980)); mas estes proporcionam todo o receptor celular, incluindo o domínio citoplasmático (intracelular) e o domínio transmembranar. O domínio citoplasmático pode ser responsável para a transdução do sinal na célula e é portanto dispensável quando se procura uma antagonista de IFN-gama para seleccionar e ligar selectivamente IFN-gama ca corrente sanguínea ou noutros fluídos do corpo (e.g. fluido sinovial). Ainda, o domínio citoplasmático é normalmente escondido dentro da célula onde é inacessível ao sistema imune; o receptor de IFN-gama de tamanho completo poderá pois actuar como um antigénio devido ao seu domínio citoplasmático e ser neutralizado. Se isto acontecer ele pode ser removido e rapidamente perdido o seu efeito se introduzido em tais fluídos do corpo. Existe portanto a necessidade de um antagonista do IFN-gama que vá competir com o IFN-gama sem o risco de induzir os efeitos secundários que lhe estão associados.



A sequência de DNA codificadora e a sequência de aminoácidos prevista do receptor do IFN-gama foram divulgados por Aguet et al. (supra), que postularam que a sequência líder vai desde o aminoácido (resíduo) 1 até ao aminoácido 14 e que a sequência transmembranar se estende desde o aminoácido 246 até ao aminoácido 266 (esta é a sua numeração). Postulou-se pois que a fracção extracelular prevista do receptor do IFN-gama se estende desde o aminoácido 15 até ao aminoácido 245; a sua estrutura postulada, incluindo a sequência líder consistindo nos resíduos de aminoácidos 1-14 e sequência de DNA codificadora estão apresentados na Figura 1 partes A e B dos desenhos juntos, onde a sequência líder é portadora da numeração -14 a -1 e a fracção extracelular prevista é portadora da numeração 1 a 231.

Na discussão que se segue toda a numeração será dada de acordo com a da Figura 1 dos desenhos juntos, mesmo que possa diferir das publicações aqui referidas.

Não se sabe ao certo quanto desta sequência é necessário para um receptor de IFN-gama eficaz que possa ligar-se especificamente a IFN-gama. No entanto, sabe-se (Stueber et al., Abstract A3-15, J. Interferon Res., Vol. 9 Supl. 2 (Oct. 1989)) que os resíduos de aminoácidos 1-198 não proporcionam um receptor eficaz enquanto que os resíduos de aminoácidos 12-231 (incluindo as sequências que começam antes da posição 12) proporcionam um receptor eficaz produzido em E. coli de acordo com aquele resumo, i.e., com seis resíduos histidina no extremo N ou C. Estes resíduos de histidina poderão alterar propriedades fundamentais do receptor, tais como a sua imunogenicidade e são portanto altamente indesejáveis quando o receptor solúvel se destina a usar como produto farmacêutico. O nosso trabalho indica que os resíduos de aminoácidos 6-221 proporcionam um receptor eficaz mas que outras sequências poderão ser também eficazes.



SUMARIO DO INVENTO

O invento proporciona pois um receptor solúvel do interferção gama, o qual consiste na fracção extracelular glicosilada ou não glicosilada do receptor do interferção gama humano natural substancialmente livre de outras proteínas e suas variações funcionalmente equivalentes. As variações funcionalmente equivalentes incluem não só formas alélicas naturais como também variações produzidas por substituição, deleção ou adição de um ou mais (e.g. até três) resíduos de aminoácidos mas retendo substancialmente a mesma actividade de ligação. Este receptor solúvel de IFN-gama tem preferencialmente a fórmula apresentada na Figura 2 dos desenhos juntos, em que:

Y é uma sequência de um ou mais resíduos de aminoácidos começando no extremo carboxilo (Pro) da sequência:

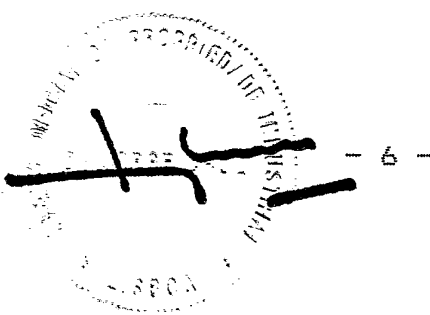
Arg Ala Glu Met Tre Ala Asp Leu Gli Pro;

Z é uma subsequência de um ou mais resíduos de aminoácidos começando no extremo amina (Ile) da sequência:

Ile Tre Ile Fen Asn Ser Ser Ile Lis Gli;

e m, n e p são independentemente 0 ou 1.

Este receptor solúvel é portanto a fracção extracelular do receptor do IFN-gama e vai competir num ensaio de ligação a receptores com o IFN-gama e é um antagonista da ligação do IFN-gama aos seus receptores celulares; i.e., ele compete com os receptores de IFN-gama para IFN-gama. Ainda, ele pode ser usado



num ensaio de ligação para medir IFN-gama: o processo do Exemplo 4D abaixo pode ser adaptado a um formato de fase sólida para uma detecção de antagonistas de IFN-gama.

Os resíduos Ser e Arg nas posições 1 e 2 são codificados por um sítio potencial de ligação ao ribossoma AGCAGG (geralmente ABBAGG; cf. Shine e Dalgarno, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:1342) (1974) (ver Figura 1) e existe um código de iniciação de 7-9 pares de bases a jusante. Para eliminar a possibilidade de uma iniciação falsa na maior parte dos procariotas, e.g. bactérias tais como E. coli, preferimos começar no resíduo G11 na posição 6 ou numa posição mais à frente até à posição 12. Desta forma, pode ser proporcionado um receptor solúvel e eficaz de IFN-gama compreendendo os resíduos de aminoácidos 12-221 ou em particular sequências mais longas, por exemplo desde o resíduo de aminoácido 1 e/ou até ao resíduo de aminoácido 231.

Um clone de cDNA de tamanho completo codificador do receptor do interferão gama (ver, por exemplo, Aguet et al., Cell, 55:273-280 (1988) (referido atrás)) foi directamente isolado por meio da reacção em cadeia com polimerase (Friedman et al., Nucl. Acids Res. 16:871B (1988)) de uma biblioteca de cDNA de placenta em lambda gt11. A fracção do cDNA codificador da fracção solúvel do receptor do IFN-gama foi isolada a partir dela e incorporada no plasmídeo que a expressa.

Numa realização preferida do invento, o receptor solúvel de IFN-gama é como definido atrás, em que n é 1 e a subseqüência em Y representa:

G11 Tre Ala Asp Leu G11 Pro.



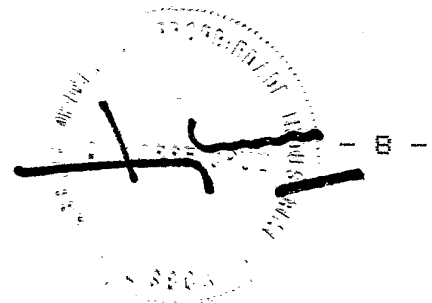
Numa outra realização particularmente preferida do invento, o receptor solúvel de IFN-gama é como definido atrás, em que  $m$ ,  $n$  e  $p$  são todos 1 e as sequências representadas por  $Y$  e  $Z$  estão totalmente presentes; i.e., o receptor do IFN-gama solúvel tem a sequência de resíduos de aminoácidos 1-231.

Ainda numa outra realização particularmente preferida do invento, o receptor solúvel de IFN-gama é como definido atrás, em que  $m$  e  $n$  são 1 e  $p$  é 0 e a sequência representada por  $Y$  está totalmente presente; i.e., o receptor de IFN-gama solúvel tem a sequência de resíduos de aminoácidos 1-221.

Numa outra realização do invento particularmente preferida, o receptor solúvel do IFN-gama é como definido atrás, em que  $m$  é 0,  $n$  é 1 e  $p$  é 0 e a sequência representada por  $Y$  está presente a partir de <sup>(6)</sup>Gli; i.e., o receptor solúvel de IFN-gama tem a sequência dos resíduos de aminoácidos 6-221.

Numa outra realização particularmente preferida do invento o receptor solúvel de IFN-gama do invento é como definido atrás, em que  $m$  é 0 e  $n$  e  $p$  são ambos 1, a sequência representada por  $Y$  está presente desde <sup>(6)</sup>Gli e a sequência representada por  $Z$  está completamente presente; i.e., o receptor solúvel de IFN-gama tem a sequência de resíduos de aminoácidos 6-231.

Ainda em realizações particularmente preferidas do invento, o receptor solúvel de IFN-gama é como definido nos dois parágrafos precedentes excepto  $m$  ser 1, de tal forma que a sequência inclui adicionalmente um resíduo serina inicial.



#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS:

A Figura 1 (nas Partes A e B) mostra as sequências de tamanho completo do receptor solúvel de IFN-gama e do seu DNA codificador como divulgado por Aguet et al., Cell, 55:273-280 (1988), excepto a numeração ter sido alterada como indicado atrás.

A Figura 2 mostra a fórmula preferida do receptor solúvel de IFN-gama do presente invento.

A Figura 3 mostra o plasmídeo pDSRS no qual a sequência de DNA codificadora do receptor solúvel de IFN-gama foi inserida.

A Figura 4 mostra esquematicamente como foi construído um plasmídeo de expressão em E. coli para o receptor solúvel do IFN-gama.

A Figura 5 descreve a competição da proteína receptor solúvel de IFN-gama produzida em E. coli com ligação a IFN-gama em células U937; os ensaios de ligação foram realizados como descrito no Exemplo 4D.

#### DESCRIÇÃO DO INVENTO

Todas as referências aqui citadas são incluídas na sua totalidade como referência.

Vectores de expressão codificadores e capazes de produzir o domínio extracelular do DNA do receptor de IFN-gama em procariontes foram usados para obtenção de clones procariontes que produtores da fracção solúvel (extracelular) do receptor de IFN-gama. As células procariontes que podem ser usadas incluem

bactérias, especialmente E. coli; muitas estirpes de E. coli podem ser usadas na realização do presente invento. No entanto, a estirpe de E. coli preferida é um mutante "leaky" que permite que o receptor solúvel de IFN-gama saia do espaço periplasmático para o meio de cultura, de onde poderá ser facilmente isolado sem as complicações causadas pela presença da maiorparte de outras proteínas de E. coli. A produção de tais bactérias e a sua utilização na obtenção de proteínas heterólogas recombinantes está descrito no pedido de patente copendente nº 07/429,588, entregue em 31 de Outubro, 1989, o qual é aqui incluído como referência.

Na realização do presente invento podem ser usados vários promotores diferentes de E. coli, tais como Trp, lac, pII, lambda pL, etc.. Estes promotores dirigem a expressão de proteínas heterólogas no citoplasma. Para uma secreção eficaz para o espaço periplasmático pode ser usada uma sequência de peptídeo sinal como seja a derivada de OmpA de E. coli, fosfatase alcalina de E. coli, lipoproteína de E. coli, etc.. O plasmídeo de expressão para a expressão procariótica em E. coli contém um promotor forte, especialmente um duplo promotor em tandem como seja lpp-lac, seguido de uma sequência sinal que pode transportar a proteína heteróloga para o espaço periplasmático. Esta última sequência de DNA é de preferência a sequência sinal derivada de uma proteína de membrana externa de E. coli, OmpA. A sequência sinal é seguida da sequência codificadora do cDNA do receptor de IFN-gama.

O esquema de construção (mostrado na Figura 4) usado na obtenção deste plasmídeo introduziu um resíduo adicional, viz serina, no início da sequência codificadora madura. Um código de paragem da tradução foi introduzido no fim da sequência codificadora do receptor solúvel de IFN-gama previsto. Um plasmídeo



contendo estes atributos, quando usado para transformar uma estirpe mutante de E. coli (e.g., a estirpe disponível na ATCC com o Nº de Acesso 53956), produz uma proteína de fusão que é composta pela sequência sinal OmpA seguido da sequência do receptor solúvel de IFN-gama. A proteína de fusão foi ainda processada no periplasma para dar o receptor solúvel de IFN-gama maduro, o qual sai para o meio de cultura.

Linhas celulares eucarióticas que podem ser usadas incluem linhas celulares de mamíferos, e.g. células COS7, NS-1 e CHO e células de levedura; podem ainda ser usados sistemas de expressão de insectos, e.g. Bombyx mori ou Spodoptera frugiperda.

Para demonstrar este invento, células U937 foram usadas como uma fonte adequada de receptores de interferência gama; no entanto, os receptores solúveis aqui descritos inibirão certamente a ligação de IFN-gama a quaisquer células portadoras daqueles receptores. Tais células incluem, por exemplo, células B, células T, eosinófilos, células do músculo liso, promielócitos, macrófagos, células eritróides, monócitos, granulócitos, etc.

#### PURIFICAÇÃO

O Exemplo 3 abaixo descreve a purificação do receptor solúvel de IFN-gama a partir de E. coli, mas o seu processo pode ser adaptado à purificação do receptor a partir de outras fontes tais como células eucarióticas, especialmente células de mamífero e células de levedura.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. REAGENTES

As enzimas de restrição foram adquiridas à New England Biolabs., Beverly, MA. DNA-polimerase de Thermus aquaticus e tampão 10x foram adquiridos à Stratagene, LaJolla, CA. A sequencição do DNA de plasmídeo de cadeia dupla foi feita usando Sequenase Version 2.0 da United States Biochemical, Cleveland, OH. Uma biblioteca de cDNA de placenta humana em lambda gt11 foi adquirida à Clontech, Palo Alto, CA.

2. OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS

Os oligonucleótidos sintéticos que se seguem foram sintetizados por métodos convencionais com uma sintetizador de DNA Applied Biosystems Model 380A:

AB697:

5'-CAGACTGGTTACTACTTAAAGGT-3'

AB758:

5'-CAGCBACCCTCGGTAGCAGC-3'

AB759:

5'-CTTCAAAGTTGGTGCAACTT-3'

AB812:

5'-CTATCTGCAGCGACCCCTCGGTAGCAGC-3'

AB813:

5'-GTATGTCGACTTCCAAAGTTGGTGCAACTT-3'

AB870JF:

5'-GCGCAAGCTTCTGGCACCAGCGGATCTGGGGCCGTCCTCA-3'

AB871JF:

5'-GGCGGATCCTTAACCTTTTATACTGCTATTGAAAATGAA-3'.

3. A reacção em cadeia com polimerase (PCR) foi realizada como anteriormente descrito (Friedmann et al., Nucleic Acids Res. (1988), 14:8718).

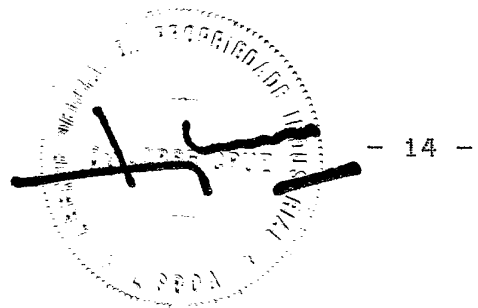
4. IFN-gama humano pode ser purificado de acordo com o processo do Exemplo 4A ou ser obtido comercialmente e os anticorpos contra ele podem ser adquiridos comercialmente. Por exemplo, Genzyme Corp. (Boston, MA) fornece IFN-gama humano recombinante (99% puro) com o código HB-IFN com o código IP-500 para transferências Western.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1. ISOLAMENTO E EXPRESSÃO TRANSITÓRIA DO CLONE DO RECEPTOR DE IFN-GAMA DE TAMANHO COMPLETO

Os oligonucleótidos AB758 e AB759, os quais são idênticos às regiões não traduzidas 5' e 3' da sequência de cDNA do receptor de IFN-gama, foram usados numa PCR com o lisado fágico da biblioteca de cDNA de placenta essencialmente como descrito anteriormente (Friedman et al., Nucl. Acids Res. (1988), 16:8718). A PCR foi realizada com um Techne programável Dri-Block (GRI, Essex, UK), nas seguintes condições: desnaturação a 95°C durante 2 minutos, emparelhamento dos iniciadores a 50°C durante 2 minutos e extensão da cadeia a 72°C durante 2 minutos, tudo durante 30 ciclos, com um ciclo final de alongação a 72°C durante 9 minutos. Os produtos de PCR foram sujeitos a electroforese num gel de 1% de agarose e uma banda forte de aproximadamente 1,5 Kb correspondendo ao receptor de IFN-gama de tamanho completo foi visualizado por coloração com brometo de etídio e isolado por electroeluição. A autenticidade do fragmento foi confirmada com uma segunda PCR usando o oligómero AB758 como iniciador 5' e AB697 como iniciador interno correspondendo a sequências na região intracelular do receptor de IFN-gama, para produzir um fragmento de aproximadamente 1,2 Kb.

Sítios de restrição para PstI (5') e SalI (3') foram introduzidos no fragmento do receptor de IFN-gama de tamanho completo de 1,5 Kb com os oligómeros AB812 e AB813 numa PCR como descrito atrás. O fragmento resultante foi isolado, digerido com PstI e SalI e ligado no plasmídeo pDSRS digerido com PstI/SalI (ATCC Nº de Acesso 68232) (Fig. 3), para expressão em células COS7. A mistura de ligação resultante foi usada para transformar células competentes de E. coli 29A (adquiridas já prontas à E.



coli Genetics Stock Center, Dept. of Biology, Yale University, P.O. Box 6666, New Haven, CT 06511-7444).

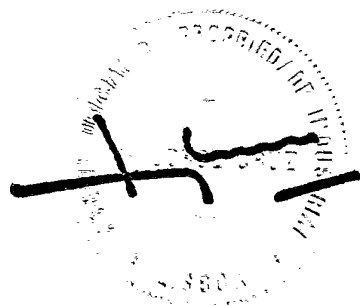
DNA de plasmídeo isolado pelo método de lise alcalina (Birnboim and Doly, "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA", Nucl. Acids Res., 7:1513 (1978)) a partir de 14 dos clones resultantes foi analisado e testado por análise de restrição e PCR. Sete clones continham o fragmento receptor de IFN-gama de 1,5 Kb. O DNA de seis destes sete clones foi purificado por centrifugação em gradientes de cloreto de céσιο/brometo de etídio (Maniatis et al.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) e foi usado para transfectar transitoriamente células COS7 (5µg DNA/placa de 100 mm) pelo método do DEAE-dextrano essencialmente como descrito (McCutchan e Fagano, "Enhancement of the infectivity of Simian Virus 40 Deoxyribonucleic Acid with Diethylamino-ethyl-Dextran", J. Natl. Cancer Inst., 41:351-356 (1968)). Após crescimento a 37°C durante 60-72 horas, as células foram colhidas por tripsinização suave e ressuspensas para  $1 \times 10^7$  células/ml em meio RPMI contendo 0,02% de azida de sódio e mantidas a 4°C. Foram então testadas quanto à expressão do receptor de IFN-gama pelo pela ligação específica de IFN-gama marcado com  $^{125}\text{I}$  usando técnicas descritas no Exemplo 4 abaixo.

Três clones apresentaram apresentaram um aumento marcado na ligação específica de interferon gama marcado com  $^{125}\text{I}$  (ver Tabela I abaixo). O DNA de plasmídeo dos três clones foi sequenciado pelo método de terminação de cadeias didesoxi (Sanger et al., "DNA Sequencing with Chain-terminating Inhibitors", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-6567 (1977)); a sequência do domínio extracelular era idêntica à sequência publicada (Aguet et al., supra).

EXEMPLO 2.      CONSTRUÇÃO DE pJFR105-6 PARA EXPRESSÃO DO GENE  
CODIFICADOR DO RECEPTOR SOLÚVEL DE IFN-GAMA EM  
E. COLI

Usando um fragmento de DNA isolado a partir de uma biblioteca de cDNA e codificador do receptor do interferção gama, fizeram-se iniciadores para introduzir dois sítios para clonagem do domínio solúvel num plasmídeo de expressão procariótico. Construiu-se o iniciador AB870JF para introduzir um sítio de restrição HindIII perto do extremo amina do DNA (o qual seria a G11 na posição 20); e o iniciador AB871JF foi feito para introduzir um sítio de restrição BamHI e um códon de paragem, o qual serviria para isolar e definir apenas o domínio solúvel da molécula. (Estes iniciadores isolam e definem o domínio solúvel do receptor do IFN-gama menos a sua própria sequência líder; i.e., a sequência polipeptídica entre a sequência líder e a região transmembranar.) Usando tecnologia de PCR, o fragmento de DNA (codificador do receptor de tamanho completo) e iniciadores foram combinados numa mistura de reacção como se segue: 100 pmoles de iniciadores, 25 ng de DNA, 10 mM dNTPs, 10 µl de tampão polimerase TAQ e 2 unidades de polimerase TAQ. O sistema foi regulado para 30 ciclos para emparelhamento, desnaturação e síntese num volume total de reacção de 100 µl. Após PCR, o DNA foi separado num gel de 1% de agarose e o fragmento de 800 pb codificador do receptor do interferção gama foi visualizado por coloração com brometo de etídio e isolado da agarose.

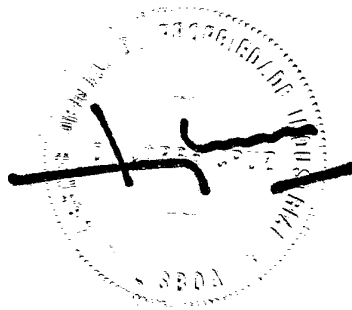
O plasmídeo p830-1 (pINIII, líder DmpA) (D. Lundell et al., "Cytoplasmic and Periplasmic Expression of a Highly Basic Protein, Human Interleukin 4, in E. coli", J. Indust. Microbiol., vol. 4 (1989) e podendo ser obtida quando pedida a R. Kastelein em DNAX Research Institute of molecular and Cellular Biology, Inc., 901 California Avenue, Palo Alto, CA 94304-1104) contem



sítios de restrição HindIII e BamHI, os quais foram usados para clonar o fragmento do receptor de IFN-gama na mesma grelha de leitura a jusante do líder OmpA como se segue: 20 µg de DNA do plasmídeo foram digeridos com 50 unidades da nuclease de restrição HindIII e depois com 40 unidades da nuclease de restrição BamHI. Após digestão, a mistura de fragmentos de restrição migrou num gel de 0,65% de agarose; isolou-se um fragmento de 7,5 Kb representando o esqueleto do plasmídeo. Qualquer outro plasmídeo adequado codificador de um sinal de secreção adequado poderia ter sido usado em lugar deste.

O fragmento de 7,5 Kb (0,1 µg) representando o esqueleto de plasmídeo e 1 µg do fragmento de 800 Kb codificador do receptor do interferon gama foram ligados numa mistura contendo ATP, DNA-ligase de T4 (100 unidades) e ditiotretol a 16°C e num volume de 40 µl durante 14 horas. Metade do produto foi então usado para transformar E. coli (K12) 294 preparada com  $\text{CaCl}_2$  (pode ser adquirida a E. coli Genetics Stock Center, Dept. of Biology, Yale University, P.O. Box 6666, New Haven, CT 06511-7444). A mistura de transformação foi semeada em placas de ampicilina e incubada a 30°C durante 16-24 horas. Várias colónias foram então repicadas e fermentadas e o DNA foi isolado e analisado por digestão com as enzimas referidas atrás (HindIII, bamHI) e seleccionado o clone pJFR105-6.

O clone pJFR105 tem o fragmento inserido a jusante de OmpA e sob o controle do promotor lpp/lac. O plasmídeo foi obtido a partir do pBR322 e é portador do gene LAC-I de tal forma que a expressão é induzida com isopropil-tio-β-galactosido (IPTG).



EXEMPLO 3. PURIFICAÇÃO DO RECEPTOR SOLÚVEL DO INTERFERÃO-GAMA HUMANO A PARTIR DE E. COLI

O domínio extracelular do receptor do IFN-gama humano foi purificado a partir de E. coli portadora do plasmídeo pJFR105-6. As células foram cultivadas a 30°C em meio M9 com casaminoácidos [1 x sais mínimos de M9 Gibco BRL Nº M29800B), 3% (p/v) de casaminoácidos, 2 g/l de glucose, 0,1 g/l de tiamina e 0,2 g/l de sulfato de magnésio] para  $A_{660} = 1,0$ . Adicionou-se IPTG para 0,5 mM e a fermentação continuou a 30°C durante a noite (cultura final  $A_{660} = 3,5$ ). Colheu-se o meio condicionado de 12 litros de cultura e clarificou-se por centrifugação. O sobrenadante clarificado foi ajustado a 5% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) e a proteína precipitada a 4°C durante 60 minutos. A fracção insolúvel foi colhida por centrifugação a 10000 xg e ressuspensa em 120 ml de 200 mM Tris (pH 8) para solubilização. Após incubação a 4°C durante 60 minutos, o resíduo da fracção ressolubilizada foi colhida por centrifugação. O sobrenadante foi ajustado a ureia 4M, 20 mM Tris (pH 8), incubado a 4°C durante 30 minutos e depois aplicado numa coluna de DEAE Sephadex Fast Flow (Pharmacia Nº 17-0709-01), equilibrada com um tampão de 20 mM Tris (pH 8), 4M ureia. A coluna foi então eluída com um gradiente linear de cloreto de sódio 0-0,3 M no mesmo tampão Tris/ureia. O domínio extracelular solúvel do receptor IFN-gama humano eluiu a aproximadamente 0,18 M NaCl. O conjunto de fracções do receptor solúvel foi dializado contra 20 mM Tris (pH 8) e aplicado numa coluna de 5 ml de IFN-gama-Affigel 10, equilibrada com 20 mM Tris. [IFN-gama humano foi acoplado covalentemente a Affigel 10 (Biorad Catalog Nº 153-6046), de acordo com os processos recomendados pelo fabricante. Esta resina de afinidade continha 4 mg de IFN-gama/ml de resina suporte]. A coluna foi lavada com 10 ml de 0,2M NaCl em 200 mM Tris (pH 8) e depois com 10 ml de 0,5 M NaCl em 200 mM Tris (pH 8). O receptor solúvel foi então eluído com

tampão carbonato de sódio 200 mM, pH 10,3, 0,6 M NaCl. As fracções foram neutralizadas e reunidas e depois dialisado contra fosfato de sódio 20 mM, pH 7,5.

Este processo deu entre 0,7 e 1 mg do receptor solúvel de IFN-gama por fermentação de 12 litros. No entanto, cerca de 50% do receptor solúvel de IFN-gama estava presente na fracção insolúvel em TCA. Este material pode ser desnaturado e reenrolado para dar mais proteína activa.

#### EXEMPLO 4.      ENSAIO PARA RECEPTORES SOLÚVEIS DE IFN-GAMA

##### A.      Purificação de Interferência gama humano

E. coli 294 portadora do plasmídeo pGIF4-137 (um vector de expressão baseado no pBR322 tendo o promotor da lipoproteína bacteriana (lpp) e codificador de um gene de interferência gama humano (aminoácidos 4-137 da proteína madura)) foi cultivado em meio GC modificado (20 g/l de glicerol, 30 g/l de casaminoácidos (Difco), 5 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 1 g/l de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a 37°C. A  $A_{660} = 7-10$ , as células foram colhidas e lisadas por ruptura com ultrassons. Uma fracção insolúvel acelular foi então isolada por centrifugação, ressuspensa em 20 mM Tris (pH 8), hidrocloreto de guanidina 6M e 5 mM ditiotreitól e ressolubilizado por aquecimento a 56°C durante 30 minutos.

Esta fracção solubilizada foi então aplicada numa coluna de Sephacryl 200-SF de 3 x 90 cm (Pharmacia AB), equilibrada em 20 mM Tris (pH 8), hidrocloreto de guanidina 6 mM à temperatura ambiente. Após fraccionamento as fracções contendo o interferência gama (e.g., como detectado por análise de transferências Western) foram reunidas, diluidas 120 vezes em 10 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (pH 7) e misturadas a 4°C durante a noite. A resina SP-Sephadex

(Sigma Chemical Co.) (10 ml como uma pasta de 1:1 em 20 mM Tris, pH 8) foi adicionado a esta amostra e misturado a 4°C durante 60 minutos. A resina foi retirada por filtração e lavada com 10 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (pH 7) e o interferão gama purificado foi eluído com 1 mM NaCl. A pureza da fracção deste interferão gama foi superior a 95%, como se mostra por electroforese em gel de SDS-poliacrilamida.

B. Marcacção do interferão-gama humano

Interferão-gama humano marcado com  $^{125}\text{I}$  foi preparado usando o reagente de Bolton Hunter (New England Nuclear) de acordo com os processos descritos pelo fornecedor (a reacção de marcação continha 70  $\mu\text{g/ml}$  de interferão-gama em fosfato de sódio 20 mM a pH 8). Retirou-se o sal à mistura de reacção final por diálise e aplicou-se numa coluna de 1 x 24 cm de Sephadex G75 equilibrada em BBS e 0,2% de gelatina para separar o interferão-gama polimerizado da proteína dimérica. O conjunto de fracções de interferão-gama marcado para 50  $\text{Ti/mM}$  foi guardado a 4°C até ser usado.

C. Preparação da amostra usando E. coli

E. coli 7321 (ATCC Nº de Acesso 53956), transformada com o plasmídeo pJFR105-6, foi cultivada em meio nutritivo a 37°C até  $A_{660} = 1$ . A cultura foi então induzida com 0,1M IPTG e o crescimento continuou a 37°C durante 3 horas. Os sobrenadantes das culturas induzidas foram testados relativamente à expressão do receptor solúvel do IFN-gama usando o ensaio de ligação descrito abaixo.

D. Ensaio de ligação

Células U-937 (ATCC Nº de Catálogo CRL 1593) foram inoculadas a partir de stocks congelados em 5% de dimetilsulfóxido, 95% de soro fetal bovino em meio RPMI 1640 previamente aquecido (Hazelton Biologics, Inc.) e depois cultivadas e passadas a 37°C até densidades celulares não superiores a  $1 \times 10^6$  células/ml. As células foram colhidas por centrifugação imediatamente antes de usar, ressuspensas para  $1,25 \times 10^7$  células/ml em meio RPMI 1640 contendo 0,02% de azida de sódio e guardado em gelo. Todos os processos subsequentes foram realizados a 4°C.

Os ensaios de ligação a receptores foram realizados como se segue:

Foram usadas por ensaio  $1,25 \times 10^6$  células U937. (Cada ensaio deu um ponto na Figura 5.). O  $^{125}\text{I}$ -IFN-gama foi adicionado a  $10^6$  cpm equivalentes. O sobrenadante da cultura das células transfectadas com o plasmídeo T892-58 (expressando o gene do receptor solúvel) foi adicionado em volumes crescentes variando de 0 a 100  $\mu\text{l}$ . Três componentes estavam presentes no ensaio: células U-937, IFN-gama marcado com  $^{125}\text{I}$  e uma amostra contendo o receptor solúvel de IFN-gama. As misturas contendo dois destes três componentes foram incubadas a 4°C durante 30 minutos. O terceiro componente foi então adicionado e a incubação continuou a 4°C durante 120 minutos. As células foram centrifugadas através de óleo [150  $\mu\text{l}$  de uma mistura de 1:1 de fetalato de dioctilo (Aldrich Chemical Co.) e fetalato de dibutilo (Eastman Kodak Co.)]. Os tubos foram então congelados rapidamente, os sedimentos de células foram retirados do fundo de cada tubo e a radioatividade associada a cada sedimento foi determinada num contador gama.

Como exemplo segue-se uma maneira de realizar o processo referido:

Diluições de meio condicionado suspeito de conter o receptor solúvel foram adicionadas (em 50 µl de meio RPMI) às cavidades de uma placa de microtitulação de 96 cavidades. O interferão-gama marcado (aproximadamente 50 000 rpm em 50 µl) foi adicionado a cada uma das cavidades seguido de 100 µl da suspensão de células U-937 ( $1,25 \times 10^7$  células/ml). Após incubação a 4°C durante duas horas cada uma das misturas de reacção foi pipetada para um tubo de ensaio de 0,4 ml (Bio-Rad) contendo 150 µl de ftalato dioctílico:fetalato dibutílico (1:1). Os tubos de ensaio foram centrifugados num rotor basculante e congelados em azoto líquido e a ponta do tubo (contendo o sedimento de células congelado separado do meio de reacção pela camada de óleo) foi retirado e analisada a radioactividade num contador gama. As fracções de meio capazes de inibir a ligação do interferão-gama a células U-937 foram identificadas como contendo o receptor solúvel de IFN-gama. Os resultados estão apresentados na Tabela I.

TABELA 1

DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR CLONADO DE  
TAMANHO COMPLETO DO INTERFERÇÃO GAMA EM CÉLULAS COS7

Exp. Nº	Plasmídeo Nº	Ligação de Fundo (1)	Ligação de Fundo (2)	Ligação Específica (3)
1	T884-5	1832,8	129,8	1703,0
1'	T884-5	1560,5	77,8	1482,7
2	T886-5	1985,0	150,4	1834,6
2	T886-5	2404,6	197,6	2207,0
3	T886-6	2525,9	230,9	2295,0
3'	T886-6	2072,8	69,8	2023,0
4	Sem Inserção	110,7	136,8	0
4'	Sem Inserção	159,4	160,0	0
5	Sem DNA	125,4	184,4	0
5'	Sem DNA e sem cloroquina	158,1	178,3	0

(1) cpm de  $^{125}\text{I}$  ligado a 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de IFN-gama não marcado.

(2) cpm de  $^{125}\text{I}$  ligado a 10  $\mu\text{g/ml}$  de IFN-gama não marcado.

(3) Ligação específica = (1) - (2).

A Figura 5 mostra os resultados de experiências em que a ligação do receptor de interferção-gama completo em células U937 com interferção-gama é comparada com a ligação do receptor solúvel de interferção-gama deste invento. Neste ensaio de ligação de receptores o receptor solúvel do interferção-gama, produzido em *E. coli*, competiu numa forma dependente da dose na prevenção da



ligação do interferão-gama marcado com  $^{125}\text{I}$  aos seus receptores celulares. Nos processos dos testes de laboratório (e.g., ensaios de detecção) usando esta inibição competitiva, o IFN-gama ou o seu receptor solúvel pode ser marcado com um marca que seja capaz de gerar um sinal, e.g., uma marca radioactiva ou uma marca química, especialmente uma marca fluorescente. Ainda, devido a esta inibição competitiva, o receptor solúvel do interferão gama do presente invento poderá ter utilização terapêutica no tratamento de doenças auto-imunes tais como artrite reumatóide, esclerose múltipla, síndrome de Sjogren e lúpus eritematoso.

O receptor solúvel do IFN-gama do invento pode ser administrado como uma composição farmacêutica. tais composições contêm uma quantidade terapêuticamente eficaz do receptor solúvel do invento e um veículo farmacêutico ou excipiente. Um veículo farmacêutico pode ser qualquer substância não tóxica compatível adequada para libertação do receptor solúvel do interferão gama do invento num doente. Num veículo pode-se incluir por exemplo água estéril, álcool, gorduras, cêras e sólidos inertes e podem igualmente ser incorporados adjuvantes aceitáveis (e.g., agentes tamponantes, agentes dispersantes). Geralmente, as composições úteis para administração parental de tais drogas são bem conhecidas, e.g. ver Remington's Pharmaceutical sciences, 14ª Ed. (Mack Publishing Company, Easton, PA 1980). Como alternativa, composições do invento podem ser introduzidas num doente através de um sistema de libertação de drogas implantável; e.g. ver Urquhart et al., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., vol. 24, pgs. 197-236 (1984).

O receptor solúvel de IFN-gama do invento é normalmente administrado parenteralmente, de preferência intravenosamente. Se bem que o receptor solúvel do interferão-gama não seja suposto ser imunogénico, ele é de preferência administrado lentamente,

através de uma administração IV convencional ou através de um depósito subcutâneo.

Quando administrado parenteralmente, o receptor solúvel do interferão gama será normalmente formulado com um veículo parenteral farmacologicamente aceitável numa forma de dosagem unitária adequada para injeção (e.g., uma solução, suspensão ou emulsão). Tais veículos são inerentemente não tóxicos e não terapêuticos. São exemplos de tais veículos soro fisiológico normal, solução de Ringer, solução de dextrose e solução de Hank. Podem também ser usados veículos não aquosos tais como óleos fixados e oleato de etilo. Um veículo preferido é 5% dextrose/soro fisiológico. O veículo poderá conter pequenas quantidades de aditivos como sejam substâncias que aumentam a isotonicidade e a estabilidade química, e.g., tampões e preservativos. O receptor de IFN-gama solúvel é de preferência formulado na forma purificada substancialmente livre de agregados, produtos de degradação e proteínas contaminantes, numa concentração entre cerca de 5 e cerca de 500 µg/ml, de preferência 20 a 250 µg/ml.

A selecção de um regime de administração para o receptor solúvel de IFN-gama depende de vários factores, incluindo a velocidade de reciclagem no soro do receptor solúvel do IFN-gama, do nível de IFN-gama no soro associado a doenças auto-imunes, qualquer possível imunogenicidade do receptor de IFN-gama solúvel, a acessibilidade do FN-gama alvo, a afinidade do IFN-gama ao(s) seu(s) receptor(res) celular(es) relativamente à do IFN-gama ao receptor solúvel de IFN-gama e similares.

A determinação da dosagem adequada de um composto do invento para uma situação particular pode ser realizada pelos familiarizados com a área. Geralmente, o tratamento é iniciado com dosagens inferiores à dose óptima. A partir daí a dosagem é

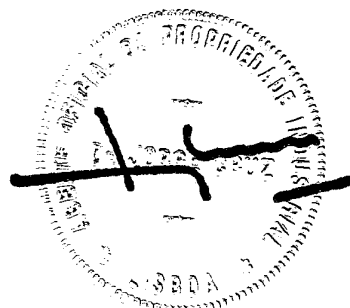
aumentada em pequenas quantidades até o efeito óptimo nas circunstâncias ser atingido. Por conveniência, a dose diária total pode ser dividida e administrada em fracções ao longo do dia caso se pretenda.

A quantidade e frequência de administração do receptor de IFN-gama solúvel será regulado de acordo com a avaliação do médico assistente considerando factores tais como idade, estado e tamanho do doente assim como gravidade dos sintomas a serem tratados.

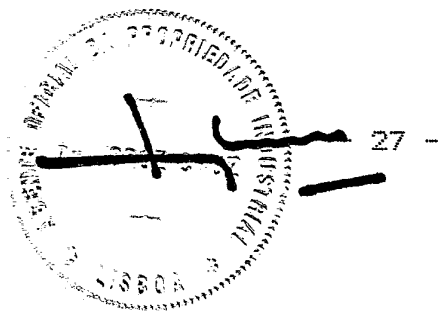
De acordo com o regime de administração, a quantidade de receptor solúvel de IFN-gama libertada num paciente é de preferência maximizada de forma consistente com um nível aceitável de efeitos secundários; e a quantidade libertada depende pois em parte da gravidade da doença a ser tratada. De preferência, a dose situa-se numa gama entre cerca de 0,1 e 500 µg/Kg por dia, mais preferencialmente cerca de 1 a 50 µg/Kg por dia.

Um regime de dosagem típico recomendado é administração parenteral de 1µg/dia a 5 mg/dia, de preferência 20 µg/dia a 1 mg/dia, em duas a quatro doses divididas para se conseguir alívio dos sintomas auto-imunes.

As descrições das realizações referidas do invento foram apresentadas com fins ilustrativos e descritivos. Elas não se destinam a ser exaustivas ou a limitar o invento às formas precisas divulgadas e obviamente muitas modificações e variações são possíveis face aos ensinamentos dados atrás. As realizações foram escolhidas e descritas para explicar os princípios do invento e a sua aplicação prática, de tal forma que outros familiarizados com a matéria poderão assim usar e realizar adequadamente tais realizações e modificações do invento conforme



adequado à utilização particular. Pretende-se que o âmbito do invento seja definido pelas reivindicações que lhe estão apensas.



REIVINDICAÇÕES:

1ª. - Processo para a preparação de um receptor solúvel para o interferão gama (IFN-gama), o qual consiste na fracção extracelular glicosilada ou não glicosilada do receptor celular transmembranar natural humano do IFN-gama sem outras proteínas e as suas variações funcionalmente equivalentes;

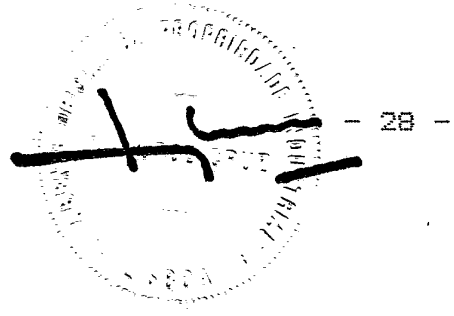
caracterizado por compreender os passos de:

construção de um vector que compreende uma sequencia de nucleotideos codificadora do referido receptor solúvel, em que a sequencia de nucleotideos é capaz de ser expressa por um hospedeiro contendo o vector;

incorporação do vector no hospedeiro; e

manutenção do hospedeiro contendo o vector sob condições adequadas para a expressão da sequencia de nucleotideos no receptor solúvel.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um receptor solúvel, que tem a fórmula:



(Ser)<sub>m</sub> (Y)<sub>n</sub> Ser Ser Val Pro Thr Pro Thr Asn Val Thr Ile Glu  
 1 13 15 20

Ser Tyr Asn Met Asn Pro Ile Val Tyr Trp Glu Tyr Gln Ile Met  
 25 30 35

Pro Gln Val Pro Val Phe Thr Val Glu Val Lys Asn Tyr Gly Val  
 40 45 50

Lys Asn Ser Glu Trp Ile Asp Ala Cys Ile Asn Ile Ser His His  
 55 60 65

Tyr Cys Asn Ile Ser Asp His Val Gly Asp Pro Ser Asn Ser Leu  
 70 75 80

Trp Val Arg Val Lys Ala Arg Val Gly Gln Lys Glu Ser Ala Tyr  
 85 90 95

Ala Lys Ser Glu Glu Phe Ala Val Cys Arg Asp Gly Lys Ile Gly  
 100 105 110

Pro Pro Lys Leu Asp Ile Arg Lys Glu Glu Lys Gln Ile Met Ile  
 115 120 125

Asp Ile Phe His Pro Ser Val Phe Val Asn Gly Asp Glu Gln Glu  
 130 135 140

Val Asp Tyr Asp Pro Glu Thr Thr Cys Tyr Ile Arg Val Tyr Asn  
 145 150 155

Val Tyr Val Arg Met Asn Gly Ser Glu Ile Gln Tyr Lys Ile Leu  
 160 165 170

Thr Gln Lys Glu Asp Asp Cys Asp Glu Ile Gln Cys Gln Leu Ala  
 175 180 185

Ile Pro Val Ser Ser Leu Asn Ser Gln Tyr Cys Val Ser Ala Glu  
 190 195 200

Gly Val Leu His Val Trp Gly Val Thr Thr Glu Lys Ser Lys Glu  
 205 210 215

Val Cys (Z)<sub>p</sub>  
 220

em que:

Y é uma subsequência de um ou mais aminoácidos começando no extremo carbonilo da sequência

Arg Ala Glu Met Gln Trp Ala Asp Leu Gln Pro;

Z é uma subsequência de um ou mais aminoácidos começando no extremo amina da sequência

Ile Trp Ile Phe Asn Ser Ser Ile Lys Gln;

e m, n e p são independentemente 0 ou 1.

33. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por se preparar um receptor solúvel, em que m e n são ambos 1 e a subsequência em Y é:

Gln Trp Ala Asp Leu Gln Pro.

43. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por se preparar um receptor solúvel, em que:

m, n e p são todos 1 e as sequências representadas por Y e Z estão totalmente presentes; i.e., o receptor solúvel de IFN-gama tem a sequência de aminoácidos 1-231; ou

m é 1 e n é 1 e p é 0 e a sequência representada por Y está totalmente presente; i.e., o receptor solúvel de IFN-gama tem a sequência de aminoácidos 1-221; ou

m é 0, n é 1 e p é 0, e a sequência representada por Y começa com <sup>(6)</sup>Gli; i.e. o receptor solúvel de IFN-gama tem a sequência de aminoácidos 6-221; ou

m é 0 e n e p são ambos 1, a sequência representada por Y começa com <sup>(6)</sup>Gli e a sequência representada por Z está totalmente presente; i.e., o receptor solúvel de IFN-gama tem a sequência de aminoácidos 6-231.

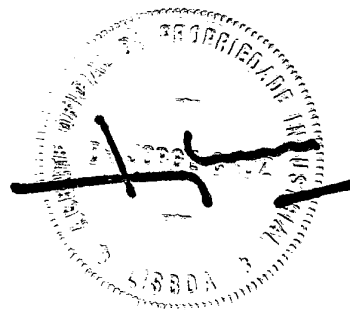
5a. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por se preparar um receptor solúvel, em que m é 1 e a sequência inclui um resíduo serina inicial.

6a. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por se preparar um receptor solúvel, em que m é 1, n é 1 e p é 0, e a sequência representada por Y começa com <sup>(6)</sup>Gli; i.e., o receptor solúvel de IFN-gama tem a sequência de aminoácidos Ser+6-221.

7a. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por se preparar um receptor solúvel, em que m é 1 e n e p são ambos 1, a sequência representada por Y começa com <sup>(6)</sup>Gli e a sequência representada por Z está totalmente presente; i.e., o receptor solúvel de IFN-gama tem a sequência de aminoácidos Ser+6-231.

8a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um receptor solúvel não glicosilado.

9a. - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica, caracterizado por se incluir na referida composição uma quantidade eficaz do receptor solúvel da reivindicação 1 e um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.



10A. - Processo para a preparação de composição farmacêutica, caracterizado por se incluir na referida composição uma quantidade eficaz do receptor solúvel da reivindicação 2 e um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

11A. - Plasmídeo, caracterizado por ser o plasmídeo pJFR105-6.

12A. - Método para inibição da ligação de IFN-gama a células tendo receptores para IFN-gama, caracterizado por compreender os passos de:

administração de uma quantidade eficaz do receptor solúvel de IFN-gama da reivindicação 1 a um meio contendo células tendo receptores para IFN-gama; e

deixar que o referido receptor solúvel compita para os receptores celulares;

sendo a gama de dosagem de substância activa de 0,1 µg até 500 µg por quilograma de peso corporal por dia, de preferência de cerca de 1 µg até 50 µg por quilograma de peso corporal por dia.

13A. - Método para inibição da ligação de IFN-gama a células tendo receptores para IFN-gama, caracterizado por compreender os passos de:

administração de uma quantidade eficaz do receptor solúvel de IFN-gama da reivindicação 2 a um meio contendo células tendo receptores para IFN-gama; e

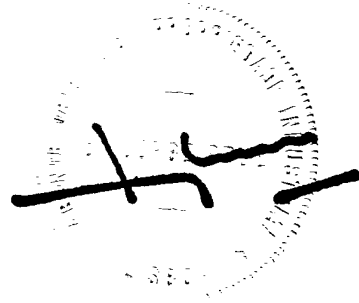
deixar que o referido receptor solúvel compita para os receptores celulares;



sendo agama de dosagem de substância activa de 0,1 µg até 500 µg por quilograma de peso corporal por dia, de preferência de cerca de 1 µg até 50 µg por quilograma de peso corporal por dia.

Lisboa, 23 de Abril de 1991

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



ATG	GCT	CTC	CTC	TTT	CTC	CTA	CCC	CTT	GTC	ATG	CAG	GGT	GTG	42	
Met	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Pro	Leu	Val	Met	Gln	Gly	Val		
				-10					-5						
AGC	AGG	GCT	GAG	ATG	GGC	ACC	GCG	GAT	CTG	GGG	CCG	TCC	TCA	GTG	87
Ser	Arg	Ala	Glu	Met	Gly	Thr	Ala	Asp	Leu	Gly	Pro	Ser	Ser	Val	
1				5					10					15	
CCT	ACA	CCA	ACT	AAT	GTT	ACA	ATT	GAA	TCC	TAT	AAC	ATG	AAC	CCT	132
Pro	Thr	Pro	Thr	Asn	Val	Thr	Ile	Glu	Ser	Tyr	Asn	Met	Asn	Pro	
				20					25					30	
ATC	GTA	TAT	TGG	GAG	TAC	CAG	ATC	ATG	CCA	CAG	GTC	CCT	GTT	TTT	177
Ile	Val	Tyr	Trp	Glu	Tyr	Gln	Ile	Met	Pro	Gln	Val	Pro	Val	Phe	
				35					40					45	
ACC	GTA	GAG	GTA	AAG	AAC	TAT	GGT	GTT	AAG	AAT	TCA	GAA	TGG	ATT	222
Thr	Val	Glu	Val	Lys	Asn	Tyr	Gly	Val	Lys	Asn	Ser	Glu	Trp	Ile	
				50					55					60	
GAT	GCC	TGC	ATC	AAT	ATT	TCT	CAT	CAT	TAT	TGT	AAT	ATT	TCT	GAT	267
Asp	Ala	Cys	Ile	Asn	Ile	Ser	His	His	Tyr	Cys	Asn	Ile	Ser	Asp	
				65					70					75	
CAT	GTT	GGT	GAT	CCA	TCA	AAT	TCT	CTT	TGG	GTC	AGA	GTT	AAA	GCC	312
His	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Asn	Ser	Leu	Trp	Val	Arg	Val	Lys	Ala	
				80					85					90	
AGG	GTT	GGA	CAA	AAA	GAA	TCT	GCC	TAT	GCA	AAG	TCA	GAA	GAA	TTT	357
Arg	Val	Gly	Gln	Lys	Glu	Ser	Ala	Tyr	Ala	Lys	Ser	Glu	Glu	Phe	
				95					100					105	
GCT	GTA	TGC	CGA	GAT	GGA	AAA	ATT	GGA	CCA	CCT	AAA	CTG	GAT	ATC	402
Ala	Val	Cys	Arg	Asp	Gly	Lys	Ile	Gly	Pro	Pro	Lys	Leu	Asp	Ile	
				110					115					120	

**FIGUR<sub>A</sub> 1 (PART<sub>E</sub> A)**

AGA	AAG	GAG	GAG	AAG	CAA	ATC	ATG	ATT	GAC	ATA	TTT	CAC	CCT	TCA	447
Arg	Lys	Glu	Glu	Lys	Gln	Ile	Met	Ile	Asp	Ile	Phe	His	Pro	Ser	
				125					130					135	
GTT	TTT	GTA	AAT	GGA	GAC	GAG	CAG	GAA	GTC	GAT	TAT	GAT	CCC	GAA	492
Val	Phe	Val	Asn	Gly	Asp	Glu	Gln	Glu	Val	Asp	Tyr	Asp	Pro	Glu	
				140					145					150	
ACT	ACC	TGT	TAC	ATT	AGG	GTG	TAC	AAT	GTG	TAT	GTG	AGA	ATG	AAC	537
Thr	Thr	Cys	Tyr	Ile	Arg	Val	Tyr	Asn	Val	Tyr	Val	Arg	Met	Asn	
				155					160					165	
GGA	AGT	GAG	ATC	CAG	TAT	AAA	ATA	CTC	ACG	CAG	AAG	GAA	GAT	GAT	582
Gly	Ser	Glu	Ile	Gln	Tyr	Lys	Ile	Leu	Thr	Gln	Lys	Glu	Asp	Asp	
				170					175					180	
TGT	GAC	GAG	ATT	CAG	TGC	CAG	TTA	GCG	ATT	CCA	GTA	TCC	TCA	CTG	627
Cys	Asp	Glu	Ile	Gln	Cys	Gln	Leu	Ala	Ile	Pro	Val	Ser	Ser	Leu	
				185					190					195	
AAT	TCT	CAG	TAC	TGT	GTT	TCA	GCA	GAA	GGA	GTC	TTA	CAT	GTG	TGG	672
Asn	Ser	Gln	Tyr	Cys	Val	Ser	Ala	Glu	Gly	Val	Leu	His	Val	Trp	
				200					205					210	
GGT	GTT	ACA	ACT	GAA	AAG	TCA	AAA	GAA	GTT	TGT	ATT	ACC	ATT	TTC	717
Gly	Val	Thr	Thr	Glu	Lys	Ser	Lys	Glu	Val	Cys	Ile	Thr	Ile	Phe	
				215					220					225	
AAT	AGC	AGT	ATA	AAA	GGT.										735
Asn	Ser	Ser	Ile	Lys	Gly.										
				230											

FIGUR<sub>A</sub> 1 (PART<sub>E</sub> B)



(Ser)<sub>n</sub> (Xaa)<sub>n</sub> Ser Ser Val Pro Thr Pro Thr Asn Val Thr Ile Glu  
 1 13 15 20

Ser Tyr Asn Met Asn Pro Ile Val Tyr Trp Glu Tyr Gln Ile Met  
 25 30 35

Pro Gln Val Pro Val Phe Thr Val Glu Val Lys Asn Tyr Gly Val  
 40 45 50

Lys Asn Ser Glu Trp Ile Asp Ala Cys Ile Asn Ile Ser His His  
 55 60 65

Tyr Cys Asn Ile Ser Asp His Val Gly Asp Pro Ser Asn Ser Leu  
 70 75 80

Trp Val Arg Val Lys Ala Arg Val Gly Gln Lys Glu Ser Ala Tyr  
 85 90 95

Ala Lys Ser Glu Glu Phe Ala Val Cys Arg Asp Gly Lys Ile Gly  
 100 105 110

Pro Pro Lys Leu Asp Ile Arg Lys Glu Glu Lys Gln Ile Met Ile  
 115 120 125

Asp Ile Phe His Pro Ser Val Phe Val Asn Gly Asp Glu Gln Glu  
 130 135 140

Val Asp Tyr Asp Pro Glu Thr Thr Cys Tyr Ile Arg Val Tyr Asn  
 145 150 155

Val Tyr Val Arg Met Asn Gly Ser Glu Ile Gln Tyr Lys Ile Leu  
 160 165 170

Thr Gln Lys Glu Asp Asp Cys Asp Glu Ile Gln Cys Gln Leu Ala  
 175 180 185

Ile Pro Val Ser Ser Leu Asn Ser Gln Tyr Cys Val Ser Ala Glu  
 190 195 200

Gly Val Leu His Val Trp Gly Val Thr Thr Glu Lys Ser Lys Glu  
 205 210 215

Val Cys (Xaa)<sub>p</sub>  
 220

FIGUR A 2

Handwritten signature and a circular stamp.

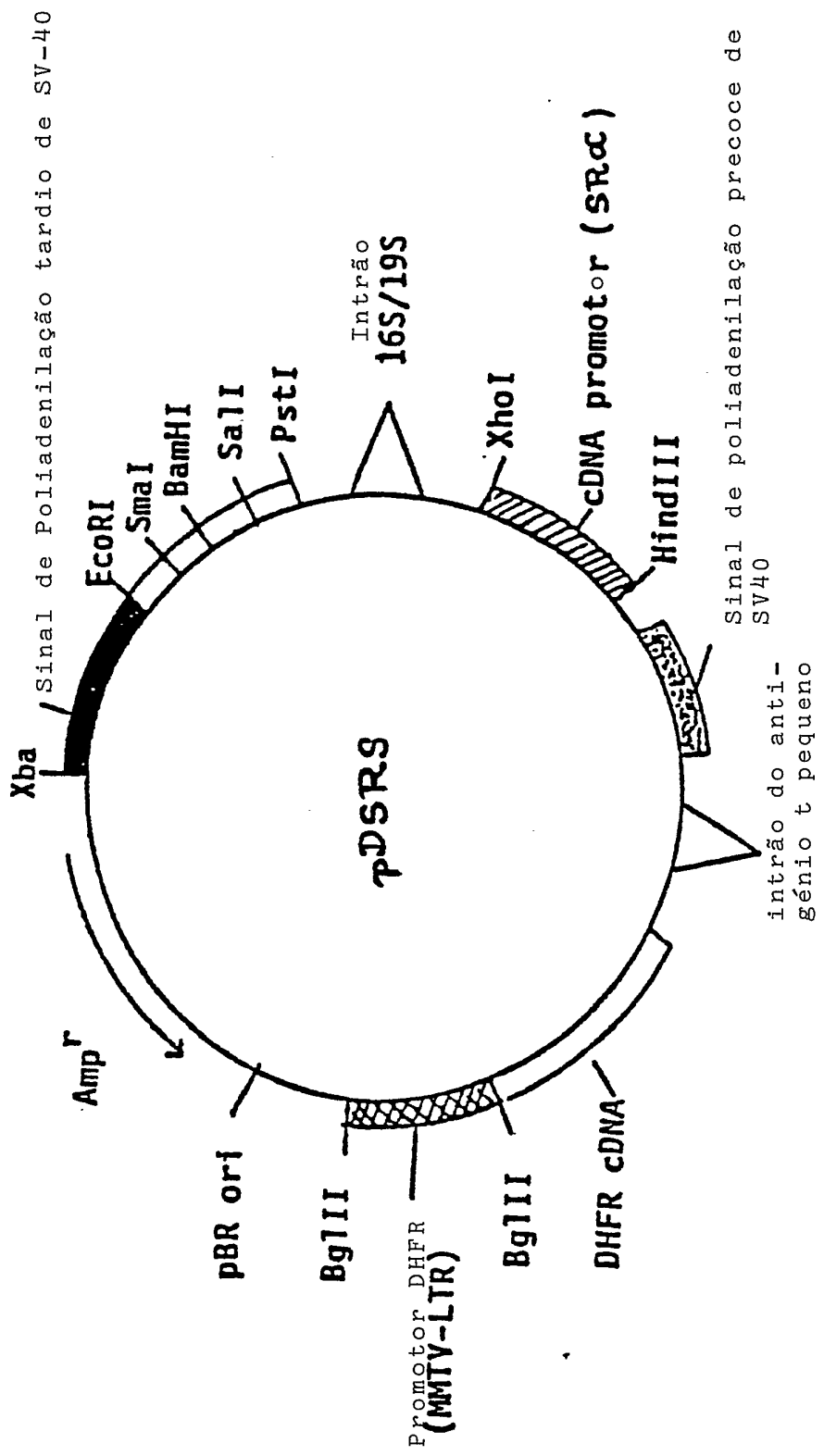
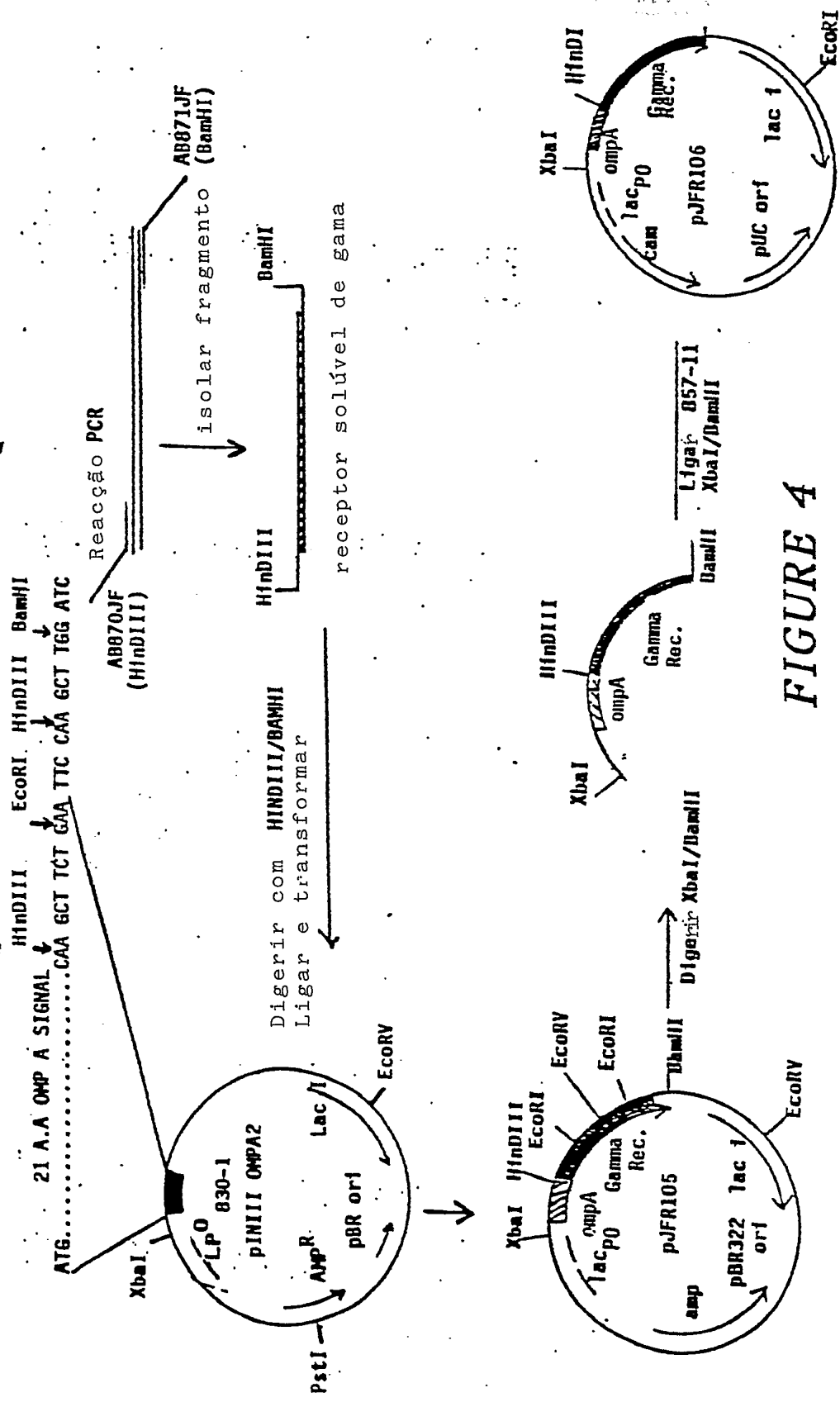
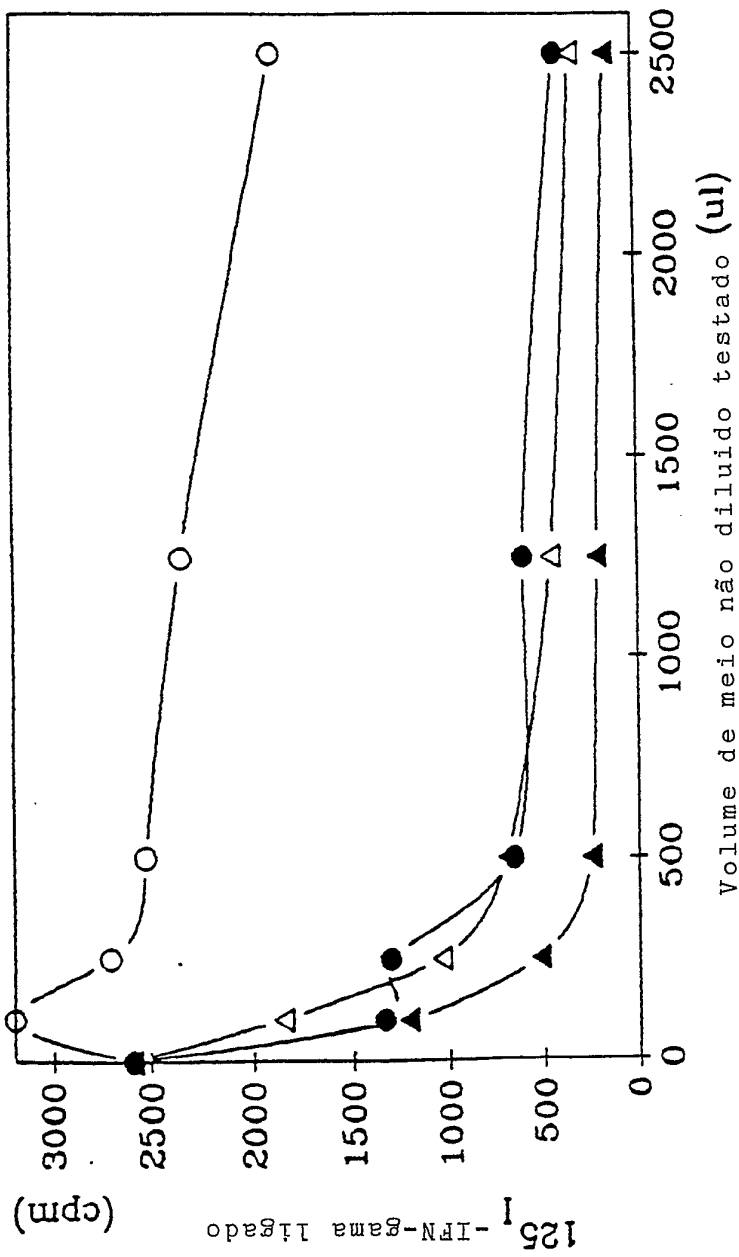


Fig. 3



71



O—O: testemunha negativa, meio de E. coli 732I  
●—●, Δ—Δ, ▲—▲: três clones irmãos de transformação de pJFR106

FIGURE 5