

Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESSELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D - 3550 Marburg, Alemanha Ocidental, (inventores: Ulrich Grundmann e Egon Amann, residentes na Alemanha Ocidental), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DA PROTEÍNA DE PLACENTA 11 (PP11) A PARTIR DO SEU cDNA CODIFICANTE ISOLADO, E DE MEIOS DE DIAGNÓSTICO E COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE A CONTEM":

DESCRIÇÃO

A invenção refere-se ao isolamento do gene que codifica para a proteína 11, específica da placenta (PP11) e a sua utilização para a preparação da PP11 por engenharia genética.

A PP11 possui as seguintes propriedades, de acordo com a descrição da EP-B1-0 029191:

- a) um teor em hidratos de carbono de $3,9 \pm 0,9\%$, consistindo em $2,6 \pm 0,5\%$ de hexoses, $1,0 \pm 0,3\%$ de hexosaminas, $0,05 \pm 0,03\%$ de fucose e $0,26 \pm 0,07\%$ de ácido neuramínico;
- b) um coeficiente de sedimentação 5 de $3,5 \pm 0,25$;
- c) um peso molecular, determinado por ultracentrifugação, de 44300 ± 6000 ;
- d) um peso molecular, determinado num gel de poliacrilamida contendo doceilsulfato de sódio (SDS), de 62000 ± 3000 ;
- e) um coeficiente de extinção E (280nm) de $13,4 \pm 1,0$; e
- f) uma mobilidade electroforética na zona da alfa ₁ - globulina, sendo ainda caracterizada pela composição em aminoácidos apresentada na

Tabela 1.

Composição em aminoácidos da PP11 (grupos por 100 grupos em percentagem molar)

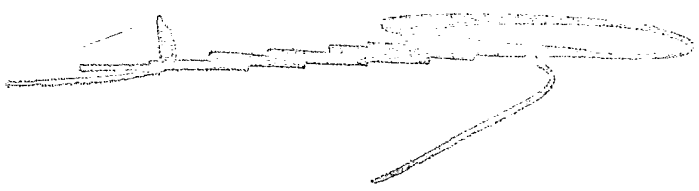
		VK% (coeficiente de variação)
Lisina	6,26	7,00
Histidina	3,34	1,72
Arginina	3,31	5,60
Ácido aspártico	10,75	2,43
Treonina	3,31	10,49
Serina	9,63	1,84
Ácido glutâmico	13,81	2,09
Prolina	4,10	4,68
Glicina	6,23	6,26
Alamina	6,30	1,82
1/2 de Cisteína	3,37	4,53
Valina	4,53	5,40
Metionina	1,00	26,22
Isoleucina	3,60	2,24
Leucina	6,74	1,05
Tirosina	5,90	3,02
Fenilalanina	6,06	2,52
Triptofano	1,66	20,87

Uma vez que o processo de isolamento convencional da PP11 descrito na patente acima referida é extremamente trabalhoso, existe a necessidade de isolar o gene codificante da PP11 de modo a possi-

bilitar a preparação da PP11 por engenharia genética.

Prepararam-se em primeiro lugar anticorpos policlonais com a PP11 purificada pelo método convencional acima descrito, que se utilizaram para pesquisar clonos positivos num banco de expressão de cDNA de placenta humana, obtido comercialmente (Genofit GmbH, Heidelberg; HL 1008 Human Placenta gt 11 Placental tissue, 34 weeks old). De entre 1,2 milhões de clonos recombinantes um clono reage com o antisoro. Designou-se por PP11-93 e continha uma inserção de cerca de 1800 pares de bases (bp). Esta inserção tinha um código de leitura aberto de cerca de 860 bp, mas não tinha qualquer metionina de início. Por isso, marcou-se a inserção do PP11-93 e utilizou-se, como sonda num banco de cDNA de placenta especialmente preparado, no lambda gt10. Descobriram-se dois outros clonos (PP11-166 e PP11-169) coalescentes com o PP11-93 e determinaram-se as respectivas sequências. O clono PP11-169 é mais curto do que o clono PP11-93, mas coincide com ele no extremo 5' em 270 bp e possui uma metionina que deve ser a metionina de início. Por meio de um oligonucleótido de 46 membros 5' terminal do clono PP11-169 (5'- CTCCAACTGGGCACCATGAGGG CCTGCATCTCCCTGTTATTGGCCG) descobriu-se em seguida no clono PP11-318 a sequência total 5' não translacionada, o que mostra que antes da pressuposta metionina de início acima mencionada já só existem códões de fim ou que não aparece outra metionina. O cDNA completo da PP11, incluindo a sequência de poli (A), tem também um comprimento de 2399 bp e possui um código de leitura aberto para 369 aminoácidos, o que corresponde a uma proteína de 42120 D. No extremo 5' encontram-se 154 bp não translacionadas, no extremo 3' 1138 bp não translacionadas incluindo uma sequência codificante de 1107 pares de bases. A sequência de cDNA completa apresenta-se na Tabela 2, a posição dos clonos isolados no interior do cDNA bem como a região codificante encontram-se indicados na Figura. "N" assinala o terminus azotado, "C" o terminus carbonado da região codificante, "A" assinala a sequência de poli (A).

De acordo com a invenção pode utilizar-se o cDNA codificante para exprimir a PP11 através de sistemas de expressão apropriados. Por meio da escolha do hospedeiro pode ainda influenciar-se a forma da modificação da PP11. Desta modo, a glicosilação que se verifica em células encarióticas superiores, não ocorre em bactérias e é diferente em células de levedura. É especialmente vantajoso efectuar a expressão



da PP11 em E. coli com o vector de expressão pTrc 99A ou pTrc 99C. (vide Exemplo 11). Descobriu-se ainda que a PP11, especialmente a preparada por engenharia genética em E. coli ou leveduras como acima mencionado, se pode empregar para o tratamento de distúrbios de coagulação, distúrbios do sistema complementar ou em relação a distúrbios da fibrinólise, uma vez que possui actividade amidolítica.

Conhecendo a sequência de aminoácidos da PP11 é possível, de acordo com métodos convencionais ou genéticos, preparar sequências parciais de aminoácidos que sirvam como antígenos para a preparação de anticorpos policlonais ou monoclonais. Tais anticorpos podem utilizar-se não só para fins diagnósticos, mas também para a preparação de colunas de anticorpos. A PP11 pode assim separar-se a partir de soluções que a contêm para além de outras proteínas. Por meio do cDNA ou de partes dele pode também isolar-se facilmente clono genómico que codifica a PP11 a partir de um banco de genes, facilitando-se assim uma expressão em células encarióticas, e possibilitando também outras aplicações diagnósticas.

A invenção encontra-se ainda definida nas reivindicações da patente e ilustrada nos exemplos seguintes.

Salvo indicação em contrário, utilizam-se as seguintes abreviaturas:

EDTA = etilenodiaminotetraacetato de sódio
SDS = dodecilsulfato de sódio
DTT = ditionitrositol
BSA = albumina de soro bovino.

Exemplos:

1. Isolamento de RNA a partir de placenta humana.

Obteve-se o RNA a partir de placenta humana madura (segundo Chirgwin et al., Biochemistry 18 (1979) 5294-5299). Esmagaram-se cerca de 10g de tecido de placenta em azoto líquido, suspenderam-se em 80ml de tiocianato de guanidínio 4 M com mercaptoetanol 0,1 M e trataram-se durante 90 segundos a 20 000 rpm num homogeneizador (Ultraturrax). Centrifugou-se o lisado durante 15 minutos a 7000 rpm (Rotor Sorvall-GSA) e precipitou-se a camada sobrenadante com 2 ml de ácido acético 1 M e 60 ml de etanol absoluto a - 20°C, durante a noite. Após sedimentação a

6000 rpm e - 10°C durante 10 minutos dissolveram-se completamente os ácidos nucleicos em 40 ml de cloridrato de guanidínio 7,5 M (pH 7,0) e precipitou-se com uma mistura de 1 ml de ácido acético 1 M e 20 ml de etanol absoluto. Para a separação do DNA repetiu-se a precipitação mais uma vez com metade dos volumes anteriores. Dissolveu-se o RNA em 12 ml de H₂O, precipitou-se com uma mistura de 1,2 ml de acetato de potássio 4 M e 24 ml de etanol absoluto, sedimentou-se e tomou-se de novo em 10 ml de H₂O (1 ml por g de tecido).

2. Isolamento de mRNA de placenta contendo poli (A)

Para a obtenção de mRNA contendo poli (A) separou-se o RNA de placenta por cromatografia de oligo (dT)-celulose (Aviv e Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (1973) 1408-1412) em pipetas de Pasteur de 2 ml com LiCl. Aplicaram-se cerca de 5 mg de RNA de placenta em tampão 1 (500 mM LiCl; 20 mM Tris (pH 7,5); 1 mM EDTA; 0,1% SDS) à coluna. Enquanto que o poli (A)⁺ - RNA se ligou à oligo (dT) - celulose, continuou a eluir-se o poli (A)⁻ - RNA. Após um passo de lavagem com tampão 2 (100 mM LiCl; 29 mM Tris (pH 7,5); 1 mM EDTA; 0,1% SDS) eluiu-se o poli (A)⁺ - RNA (RNA de placenta) com tampão 3 (5 mM Tris (pH 7,5); 1 mM EDTA; 0,05% SDS) da coluna.

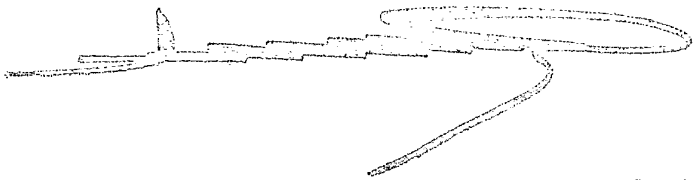
Para posterior purificação colocou-se o poli (A)⁺ - RNA em tampão 1 e cromatografou-se de novo em oligo (dT)-celulose. O rendimento em poli (A)⁺ - RNA de placenta era, após este segundo passo de purificação, de cerca de 4% do RNA inicial.

3. Síntese de cDNA de placenta humana (cDNA de placenta) e de cDNA de cadeia dupla (ds DNA)

O mRNA de placenta contendo poli (A) testou-se em relação à sua constituição, num gel de agarose a 1,5%, antes da síntese do cDNA.

Em seguida dissolveram-se 4 µg de mRNA de placenta em 65,5 µl de H₂O, desnaturaram-se durante 10 minutos a 70°C e arrefeceu-se em gelo.

A síntese do cDNA efectuou-se numa mistura reaccional de 100 µl após adição de 20 µl de tampão RT₁ (250 mM Tris (pH 8,2) a



42°C, 250 mM KCl, 30 mM MgCl₂), 2,5 µl de dNTP 20 mM (isto é, todos os quatro trifosfatos de desoxinucleóido), 1 µl de oligo (dT) de 1 µg/ml, 1 µl de DTT 1M, 2 µl de RNAsina e 8 µl de transcriptase reversa (24 U/µl) durante 90 minutos a 42°C. O cDNA de cadeia dupla (dsDNA) sintetizou-se de acordo com o método de Gubler e Hoffmann (Gene 25 (1983) 263-269). A síntese efectuou-se imediatamente a seguir à síntese do cDNA, por meio de adição de 305,5 µl de H₂O, 80 µl de tampão RT₂ (100 mM Tris (pH 7,5), 25 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 50 mM DTT, 250 µg/ml BSA), 2 µl de RNase H (2 U/µl), 2,5 µl de DNA Ligase de E. coli (5 U/µl), 5 µl de β-NAD 15 mM e 5 µl de DNA polimerase I (5 U/µl) e incubação durante 5 horas a 15°C. A reacção terminou-se por meio de inactivação térmica (70°C, 30 minutos).

Incubou-se a mistura reaccional, após adição de 50 µl de dNTP 250 µM, 55 µl de Tris 10 mM (pH 7,5), 10 mM de MgCl₂, 10 µg /ml de BSA, 3 µl T4 DNA polimerase I (1 U/µl), 2 µl de RNase H (2 U/µl) e 2 µl de RNase A (2 µg/ml), durante mais 30 minutos, a 37°C, de modo a garantir a síntese completa da segunda cadeia de DNA ("Repair Reaction").

4. Ligação de lincantes EcoRI do dsDNA e abertura dos lincantes.

Para a obtenção de um banco de cDNA de placenta proviu-se o dsDNA com extremos EcoRI, de modo a possibilitar ligá-lo na posição de corte EcoRI do Fovovector lambda gt 10 (T. Maniatis et al. (1982), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor). Para tal

- a) tratou-se o dsDNA com EcoRI-metilase, de modo a proteger as posições de corte EcoRI internas do dsDNA,
- b) proviu-se o dsDNA com lincantes EcoRI,
- c) e abriram-se em seguida com EcoRI.

a):

Actuação de metilase do dsDNA efectuou-se directamente a seguir à "Repair Reaction", após adição de 25 µl de EDTA 500 mM (pH 8,0), 60 µl de tampão de metilase (100 mM NaOAc (pH 5,2), 2 mg de S-adenosil-L-metionina) e 2 µl de EcoRI-metilase (20 U/µl), por incubação a 37°C durante 30 minutos.

- Extraiu-se a mistura reaccional com fenol e precipitou-se o dsDNA com 60
- µl de NaOAc 4M e 1300 µl de etanol. Lavou-se o dsDNA duas vezes com eta-

no1. Lavou-se o dsDNA duas vezes com etanol a 70%, agitou-se uma vez com éter e secou-se.

b):

Dissolveu-se o dsDNA EcoRI-metilado em 88 μ l de H₂O e, após adição de 10 μ l de tampão de ligase (500 mM Tris (pH 7,4), 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM espermidina, 10 mM ATP, 1 mg/ml BSA), 1 μ l de T4 DNA-ligase (10 U/ μ l), ligou-se com 1 μ l de lincantes EcoRI (0,5 μ g/ μ l) (pCGAATTCC ou pAGAATTCT), durante a noite, a 15°C.

c):

Ajustou-se o volume da mistura reaccional de ligase a 120 μ l com 6 μ l de H₂O, 12 μ l de 10 $\times$ tampão EcoRI e 2 μ l de EcoRI (120 U/ μ l). Efectuou-se a digestão com EcoRI durante 2 horas, a 37°C.

5. Separação dos lincantes não ligados por meio de gradientes de acetato de potássio e selecção de tamanhos de dsDNA.

Para a separação de todos os lincantes EcoRI não ligados do dsDNA submeteu-se a mistura reaccional EcoRI na totalidade a um gradiente de acetato de potássio (5-20% KAc, 1 mM EDTA, 1 μ l/ml brometo de etídio) e centrifugou-se durante 3 horas a 50 000 rpm e 20°C (Rotor Beckman SW 65).

Fracccionou-se o gradiente a partir de baixo de modo que as primeiras cinco fracções fossem de 500 μ l e as restantes de 100 μ l. Precipitaram-se as fracções com 0,01 volumes de acrilamida (2 mg/ml) e 2,5 volumes de etanol, lavaram-se uma vez com etanol a 70%, secaram-se e tomou-se cada uma delas em 5 μ l de H₂O.

Para a determinação de tamanho do dsDNA analisou-se 1 μ l de cada fracção num gel de agarose a 1,5%. Determinou-se ainda a quantidade em dsDNA com 1 μ l de cada fracção.

Reuniram-se as fracções com dsDNA maior do que 1000 bp e concentrou-se a amostra de modo que a concentração final fosse de 27 μ g/ml.

6. Introdução do dsDNA no fagovector lambda gt 10 e reacção "in vitro packaging".

A introdução do dsDNA na posição de corte EcoRI do fagovector lambda gt 10 (Vector Cloning Systems, San Diego, CA) efectuou-se numa mistura reaccional de ligase de 4 µl: 2 µl de dsDNA, 1 µl de lambda gt 10 × EcoRI (1 µg/ml), 0,4 µl de tampão de ligase, 0,5 µl de H₂O, 0,1 µl de T4 DNA-ligase. Incubou-se a mistura durante 4 horas a 15°C.

Para o estabelecimento do banco de cDNA de placenta no fagovector lambda gt 10, seguiu-se uma reacção "in vitro packaging" da mistura de ligase com os extractos celulares lambda-lisogénicos E.coli NS428 e NS433, à temperatura ambiente durante 2 horas (Vector Cloning Systems, San Diego, CA; Enquist e Sternberg, Methods in Enzymology 68, (1979) 281-289). Parou-se a reacção com 500 µl de meio de suspensão (SM: 0,1 M NaCl, 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris (pH 7,5), 0,01% gelatina) e 2 gotas de clorofórmio.

7. Determinação do título e análise do banco de cDNA de placenta.

O número das "plaque forming units" (PFU) do banco de cDNA de placenta determinou-se com células apropriadas de E.coli K 12 da estirpe C600HFL: verificou-se ser igual a 1×10^6 PFU. Cerca de 80% de todos os fagos continham inserções de DNA superiores a 1000 pares de bases.

8. Screening (selecção) de um banco de expressão de cDNA de placenta humana com anticorpos anti-PP11.

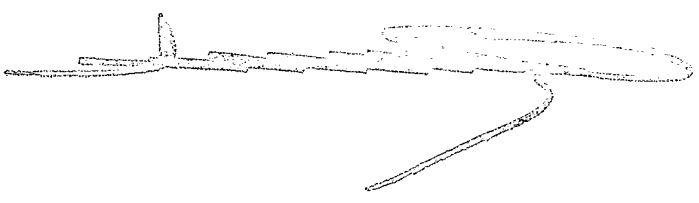
Colocou-se em placas um banco de expressão de cDNA no fago lambda gt 11 da firma Genofit (vide acima) com uma densidade de cerca de 30 000 PFU por placa de agar (13,5 cm de diâmetro). Para isso infectaram-se células adequadas de E. coli da estirpe Y 1090 (ATCC 37197) (R.A.Young e R. W. Davis, Science vol. 222, 778-782/1983) com os fagos, durante 30 minutos a 37°C e colocaram-se em placas L-Broth de Top-agar. Incubaram-se as placas durante 4 horas a 42°C e cobriu-se depois cada uma delas com um filtro de nitrocelulose seco (Schleicher e Schnell, BA 85, Ref. No. 401124). Os filtros tinham sido previamente saturados com uma solução aquosa 10 mM de IPTG. Incubaram-se novamente as placas com os filtros, durante 4 horas a 37°C. Antes de se retirarem os filtros, marca-



ram-se os filtros e as placas igualmente com uma agulha enferrujada. Incubaram-se então os filtros em TBST (10 mM Tris - HCL, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20 e 5% de leite em pó magro), durante a noite a 4°C. Em seguida lavaram-se ainda os filtros por três vezes durante 10 minutos em TBST à temperatura ambiente e incubaram-se depois com anti-corpos de coelho anti-PP11 em 15 ml de TBST/por filtro, à temperatura ambiente durante 1 hora. (A solução dos anticorpos tinha sido previamente diluída a 1:200 e saturada com células de E.coli lisadas com lambda gt 11 não recombinantes sobre filtros de nitrocelulose, durante 1 hora). Após a incubação com os anticorpos primários lavaram-se os filtros 4 x durante 10 minutos com TBST. Incubaram-se então os filtros com o anti-corpo secundário anti-coelho, conjugado com fosfatase alcalina (firma Promega, USA - distribuição da firma Atlanta, Heidelberg) e previamente diluído a 1:5000 em TBST, sob agitação durante 1 hora. Lavaram-se de novo os filtros 4 x 10 minutos com TBST. Em seguida efectuou-se a reacção de coloração de modo a tornar visíveis os clones positivos PP11, aos quais se ligaram os anticorpos primários e secundários, através da reacção da fosfatase alcalina com um reagente corante (ProtoBlot System da firma Protogen). Por reacção de coloração utilizaram-se, para um filtro de nitrocelulose, 15 ml de tampão AP (100 mM Tris-HCl, pH 9,5 100 mM NaCl, 5 mM MgCl 2) com 99 µl de substrato NBT (nitrotetrazólio azul) (50 mg/ml em dimetilformamida a 70%) e 49,5 µl de substrato BCIP (fosfato de 5-bromo - 4 - cloro - 3 - indolilo) (50 mg/ml em dimetilformamida a 70%). Agitaram-se os filtros, na ausência de luz, na solução de coloração, durante cerca de 20 minutos a 1 hora até que as "Plaques" positivas mostrassem uma coloração nítida. Terminou-se a reacção de coloração mergulhando os filtros numa solução de terminação (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM EDTA).

Atribuíram-se os sinais positivos às "Plaques" nas placas de agar correspondentes. Removeram-se as "Plaques" com uma pipeta de Pasteur, ressuspenderam-se em 1 ml de tampão SM (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl 2) e isolaram-se até se obter uma única "Plaque" positiva. A partir do banco de expressão de genes mencionado descobriu-se um clono (PP11-93), que não continha ainda o gene completo, mas que apresentava um código de leitura aberto de 860 bp - sem metionina de início - com cerca de 1800 bp do comprimento total da inserção.

9 a) Preparação de uma sonda específica da PP11.



De acordo com métodos conhecidos isolou-se o cDNA a partir do clono PP11-93 e marcou-se com ^{32}P da maneira seguinte.

Marcaram-se 10 ng de DNA de acordo com o "Multiprime DNA labelling System" (Firma Amersham, Braunschweig) com polimerase de Klenow na presença de alfa- ^{32}P dCTP (utilizaram-se 35 $\mu\text{Ci}/25\text{ ul}$ de mistura reaccional). A sonda de DNA tinha uma actividade específica de 330 MBq/pMol.

9 b) "Screening" do banco de cDNA de placenta, preparado de acordo com os passos 1. a 7., com sondas específicas da PP11.

Para tal colocaram-se 3×10^4 PFU com células de E. coli K 12 da estirpe C 600 HFL em agar mole em caixas de Petri de 13,5 cm e incubaram-se durante 6 horas a 37°C . Nesta altura não ocorrera ainda qualquer lisagem completa. Incubaram-se as placas durante a noite no frigorífico e transferiram-se os fagos para filtros de nitrocelulose (Scheicher e Schüll, BA 85, Ref. No. 401124) (duplicatas). Marcaram-se os filtros de nitrocelulose e as caixas de Petri com uma cânula de injeção de modo a permitir a posterior identificação. Guardaram-se as caixas de Petri no frigorífico durante o processamento dos filtros de nitrocelulose. Desnaturou-se o DNA que se encontrava sobre os filtros de nitrocelulose, colocando os filtros durante 5 minutos sobre papel de filtro (Whatman-M3) embebido em 1,5 M NaCl e 0,5 M NaOH. Em seguida renaturaram-se os filtros do mesmo modo, com 1,5 M NaCl e 0,5 M Tris (pH 8,0) e lavaram-se com $2 \times \text{SSPE}$ (0,36 M NaCl, 16 mM NaOH, 20 mM Na_2PO_4 , 2 mM EDTA). Secaram-se depois os filtros durante 2 horas a 80°C em vácuo. Pré-hibridizaram-se os filtros durante 4 horas a 65°C (solução de pré-hibridação: 0,6 M NaCl, 0,06 M Tris (pH 8,3), 6 mM EDTA, 0,2% de polímero de sacarose sintético não iónico ($^R\text{Ficoll}$), 0,2% de polivinilpirrolidona 40, 0,2% BSA, 0,1 SDS, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de esperma de salmão desnaturado). Em seguida incubaram-se os filtros durante a noite, por meio de adição de 100 000 - 200 000 bq do oligonucleótido marcado/ml de solução de hibridação (como a solução de pré-hibridação mas sem DNA de esperma de salmão), em copos de vidro ou em filmes de polietileno humedecidos, sob ligeira agitação. A temperatura de hibridação foi de 65°C . Lavaram-se os filtros de nitrocelulose com $6 \times \text{SSC}$, 0,05 M pirofosfato de sódio, durante uma hora à temperatura ambiente, e durante mais uma hora à temperatura de hibridação utilizada. Seca-



ram-se os filtros e auto-radiografaram-se durante a noite. Atribuíram-se às caixas de Petri os sinais dos filmes de raios X que apareciam em ambas as duplicatas e removeu-se a região (cerca de 50 "Plaques" com o extremo largo de uma pipeta de Pasteur e ressuspenderam-se os fagos em 1 ml de tampão SM. Isolaram-se os fagos positivos em três etapas sucessivas até se obter um único clono.

Testou-se um total de 1×10^6 PFU do banco de cDNA de placenta. Identificaram-se dois outros sinais sobre os filtros duplicata (clonos PP11-166 e PP11-169). Por meio do oligômero de 46 membros da PP 11-169 acima mencionado (pág. 3) descobriu-se finalmente o clono PP11-318 que coincide com a totalidade do extremo 5' do cDNA da PP11. Estes quatro clonos contêm em conjunto uma sequência codificante da PP11 como se mostra na Tab. 2 e na figura.

10. Análise sequencial do DNA

Multiplicaram-se os fagoclonos (clonos PP11-93, PP 11-166, PP11-169 e PP11-318) e extraiu-se o DNA de cada um deles. Isolou-se de cada um o respectivo fragmento EcoRI e ligou-se na posição EcoRI do vector Bluescript M13 (Stratagene, San Diego, CA, USA) para análises de restrição e análises sequenciais por meio do método didesoxienzimático segundo Sanger. A sequência mostra um código de leitura aberto e codifica para uma proteína com um máximo de 369 aminoácidos. No extremo 5' estão também 154 bp não translacionados, depois seguem-se 1107 bp de sequência codificante e por fim encontram-se 1138 bp da sequência não translacionada do extremo 3'.

11. Expressão da PP11 em células bacterianas

a) Expressão de uma proteína de fusão PP11

Digeriu-se completamente pTrc99C (E. Amann et al., Gene 69 (1988) 301-315) com EcoRI e XbaI e isolou-se o fragmento de 4149 pares de bases por meio de electroforese de gel. Digeriu-se o clono PP11 lambda gt 11-269 com EcoRI e isolou-se também a inserção EcoRI com 1785 pares de bases incluindo a parte dos lincantes. O cDNA de PP11 do clono lambda gt 11-169 começa, como se mostra na figura, na posição 140. O fragmento obtido cortou-se com XbaI e isolou-se o fragmento EcoRI-XbaI de 1339 pares de bases e ligou-se com o fragmento vector pTrc 99 C acima des

crito. O plasmídeo pTrc99C-PP11 assim obtido, com 5488 pares de bases, é capaz de induzir a síntese de uma proteína de cerca de 42 KD em células de *Escherichia coli*. Esta proteína pode precipitar-se imunologicamente de modo específico por meio de um anti-soro anti-PP11 de coelho monoespecífico, que se preparou por imunização com PP11 isolada a partir de placenta humana. Uma outra prova da expressão de PP11 em células de *Escherichia coli* efectuou-se por meio de análises Western-Blot, utilizando o soro anterior. Nesta experiência reagiu apenas o extracto das células induzidas IPTG contendo o plasmídeo pTrc99C-PP11, tendo-se observado de novo uma banda de proteína de cerca de 42 KD. Os extractos de controle de *Escherichia coli* sem plasmídeo ou os extractos contendo pTrc99C-PP11 não induzidos por IPTG não reagiram com o anti-soro anti-PP11 acima mencionado. A proteína de fusão PP11 descrita pela construção de plasmídeos acima preparada, tem a seguinte sequência de aminoácidos N-terminais, definida pela seguinte sequência de nucleótidos:

Vector/linçante / Região 5' UT									/ PP11		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3
Met	Gly	Asn	Ser	Leu	Gln	Leu	Gly	Thr	Met	Arg	Ala
...CC. <u>ATG</u> GGG AAT TCT CTC CAA CTG GGC ACC <u>ATG</u> AGC GCC...											

A proteína de fusão PP11 definida por esta construção contém, para além da sequência total de aminoácidos da PP11 codificada pelo cDNA da PP11, nove aminoácidos ligados de modo N-terminal: quatro aminoácidos codificados pelo vector e cinco aminoácidos especificados através da região 5' não translacionada existente no cDNA da PP11. Para o controle efectuou-se também a construção acima mencionada com os vectores de expressão pTrc99A e pTr99B (registo de patente alemão P 38 19 463.5 e Amann et al., (1988) Gene 69, 301-315). Estes vectores distinguem-se do pTrc99C apenas em dois pares de bases (pTrc99A) e em 1 par de base (pTrc99B), o que provoca desvios do código de leitura de translação. Como é de esperar, nem a pTrc99A-PP11 nem a pTrc99B-PP11, foram capazes de induzir a síntese de proteínas PP11 que reagissem com anti-soros anti-PP11.

Descobriu-se surpreendentemente que se pode proces-



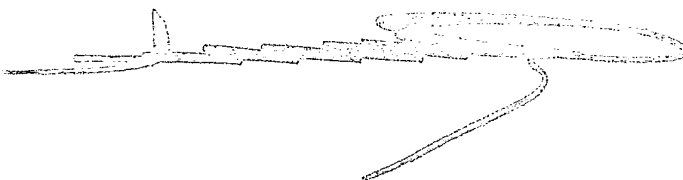
sar em *Escherichia coli* a proteína PP11 induzida pelo plasmídeo pTrc99C-PP11. A sequência de sinal que precede a proteína PP11 madura natural (também designada por sequência "Leader") é reconhecida pelas células de *E. coli* e cindida pela peptidase de sinal. Tal pode conduzir-se com base na observação de que se pode identificar, após fraccionamento de extratos celulares na fracção periplasmática em comparação com fracções associadas à membrana, uma proteína PP11 mais pequena, em que a diferença de peso molecular observada corresponde à diferença esperada após cisão da sequência de sinal.

b) Expressão da proteína madura não fundida

Para a expressão da proteína PP11 madura, encurtada da sequência de sinal naturalmente ocorrente, ligou-se o fragmento EcoRI-XbaI de 1339 pares de bases acima descrito com o vector de mutogénese pMa 5-8 digerido com os mesmos enzimas de restrição. O vector de mutogénese pMa5-8 tem, para além de uma origem de replicação bacteriana e de um marcador de resistência a antibióticos, uma região polilincante de clonagem e a origem de replicação do bacteriófago F1 de cadeia simples. A cadeia simples assim obtida do cDNA de PP11 clonado isolou-se então segundo métodos conhecidos e submeteu-se ao protocolo de mutagénese "gapped-duplex" publicado (Kramer et al. (1984) Nucl. Acids. Res. 12, 9441-9456) utilizando-se o oligodesoxinucleótido seguinte:

5' TTTGTGGTCCTCCATGGAGGCCAGGCCACA 3'

Identificou-se um clono que apresentava a desejada mutação NcoI (criação de uma nova posição NcoI não existente no cDNA inicialmente isolado, imediatamente antes da sequência codificante para a proteína PP11 madura), por meio da respectiva análise de restrição e designou-se por pMa5-8-PP11-NcoI. A partir deste plasmídeo, por meio de digestão parcial com NcoI e total com XbaI, isolou-se o fragmento NcoI-XbaI de 1268 bp e ligou-se ao vector pTrc-99A também cortado. O plasmídeo resultante contém 5412 bp e exprime, após indução do promotor trc com IPTG, a proteína PP11 madura não fundida, com um peso molecular de cerca de 42 KD, que reage mais uma vez especificamente com anti-soros anti-PP11 como anteriormente já descrito.



12. Actividade amidolítica da PP11

Para a PP11 pôde identificar-se uma actividade de protease no teste colorimétrico seguinte. Mediram-se fracções periplasmáticas ou citoplasmáticas de *E. coli* estirpe RB791 (R.Brent e M. Ptashne (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4204-4208), transformadas com pTrc99C-PP11 ou pTrc99C-PP11, num teste óptico utilizando o substrato cromogénico Chromozym TH^R (Boehringer Mannheim GmbH). Misturaram-se 400 µl de tampão de trietanolamina e 100 µl de substrato com 300 µl de cada um dos extractos de *E. coli*, diluindo-se estes extractos a uma concentração de proteína de 16 mg/ml. Incubou-se a célula de reacção a 37°C e mediu-se a variação de absorção por minuto a 405 nm. Em algumas experiências pré-incubou-se o extracto de *E. coli* e o extracto de controle com um anti-soro anti-PP11 de coelho e subtraiu-se a actividade amidolítica do anti-soro no cálculo das actividades amidolíticas dos extractos. A igual concentração de proteína total o extracto de *E. coli* contendo PP11 provoca um maior aumento de absorção ($\Delta A=0,04$ por minuto) do que o controle ($\Delta A=0,024$ por minuto), correspondendo a 32 mU/ml ou 19,2 mU/ml, respectivamente. A actividade amidolítica da PP11 foi quase completamente inibida pela pré-incubação com anti-soro anti-PP11. Além disso, a PP11 citoplasmática não processada, com o peso molecular de 45 KD, não mostrou esta actividade amidolítica. Uma vez que a actividade amidolítica é inibida pelo fluorofosfato de diisopropilo, a PP11 trata-se provavelmente de uma serino-protease.

REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a preparação da proteína de placenta 11 (PP11), caracterizado por se introduzir uma sequência de DNA codificante para a respectiva sequência de aminoácidos, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2

10 30 50
CTTCCTGAAAGCATCTGGAGACACCAGCTCCACAAGTCCTGGTGTCTTTAAAGGATCAG

70 90 110
CTTGAGGAATAAGGCTCGTCTGAGAGCTGTGACATTCATCTGACTCTAGTGAAAGTCCAA

130 150 170
CAGCCACTCCCTTTTGGCCTCCAACCTGGGCACCATGAGGGCCTGCATCTCCCTGGTATT
M R A C I S L V L

190 210 230
GGCCTGGCTGTGTGGCCTGGCCTGGGCTGAGGACCACAAAGAGTCAGAGCCATTGCCACA
A V L C G L A W A E D H K E S E P L P Q

250 270 290
GCTGGAGGAAGACACAGAAGAGGCCCTCGCCAGCAACTTGTA CTGGCACCACCTCCTG
L E E E T E E A L A S N L Y S A P T S C

310 330 350
CCAGGGCCGCTGCTACGAAGCCCTTTGACAAGCACCACCAATGTCACTGCAATGCCCGCTG
Q G R C Y E A F D K H H Q C H C N A R C

370 390 410
CCAAGAGTTTGGGAACTGCTGCAAGGATTTTGAGAGCCTGTGTAGTGACCACGAGGTCTC
Q E F G N C C K D F E S L C S D H E D S

430 450 470
CCACAGCAGTGATGCCATAACAAAAGAGGAGATTGAGAGCATCTCTGAGAAGATCTACAG
H S S D A I T K E E I Q S I S E K I Y R

490 510 530
GGCAGACACCAACAAAGCCCAGAAGGAAGACATCGTTCTCAATAGCCAAAACCTGCATCTC
A D T N K A Q K E D I V L N S Q N C I S

550 570 590
CCCGTCAGAGACCAGAAACCAAGTGGATCGCTGCCCAAAGCCACTCTTCACTTATGTCAA
P S E T R N Q V D R C P K P L F T Y V N

610 630 650
TGAGAAGCTGTTCTCCAAGCCCACCTATGCAGCCTTCATCAACCTCCTCAACAACCTACCA
E K L F S K P T Y A A F I N L L N N Y Q

670 690 710
GCGGGCAACAGGCCATGGGGAGCACTTCAGTGGCCAGGAGCTGGCCGAGCAGGACGCCTT
R A T G H G E H F S A Q E L A E Q D A F

730 750 770
CCTCAGAGACATCATGAAGACAGCAGTCATGAAGGAGCTCTACAGCTTCCTCCATCACCA
L R E I M K T A V M K E L Y S F L H H Q

790 810 830
GAATCGCTATGGCTCAGAGCAACAGTTTGTTCGATCACTTGAAGAACATGTGGTTTGGGCT
N R Y G S E Q E F V D D L K N M W F G L

850 870 890
CTATTCCAGAGGCAATCAACAGCGGGCACTCGAGTGGCTTTGAACATGTCTTCTCAGGTGA
Y S R G N E E G D S S G F E H V F S G E

910 930 950
GGTAAAAAAGGCAAGGTTACTGGCTTCCATAACTGGATCCGCTTCTACCTGGAGGAGAA
V K K G K V T G F H N W I R F Y L E E K

970 990 1010
GGAGGGTCTGCTTGAATATTACAGTCACATCTACGATGGGCCTTGGGATTCTTACCCCGA
E G L V D Y Y S H I Y D G P W D S Y P D

1030 1050 1070
TGTGCTGGCAATGCAGTTCAACTGGGACGGCTACTATAAGGAAGTGGGCTCTGCTTTTCAT
V L A M Q F N W D G Y Y K E V G S A F I

1090 1110 1130
CGGCAGCAGCCCTGAGTTTGAATTTGCACTCTACTCCCTGTGCTTCATCGCCAGGCCAGG
G S S P E F E F A L Y S L C F I A R P G

1150 1170 1190
CAAAGTGTGCCAGTTAAGCCTGGGAGGATATCCCTTAGCTGTCCGGACATATACCTGGGA
K V C Q L S L G G Y P L A V R T Y T W D

1210 1230 1250
CAAGTCCACCTATGGGAATGGCAAGAAGTACATCGCCACAGCCTACATAGTGTCTTCCAC
K S T Y G N G K K Y I A T A Y I V S S T

1270 1290 1310
CTAATAGAACTTCGAGCCAGAAAGGGGCATGAGGGCTCTTGCCGAGACTGAAGTGCTATCT

1330 1350 1370
TCTCTGGACTAGAGAGAAGAGGGAGAGCACTGGAAGGGATCACCAAATCTCAAAGCAATG

1390 1410 1430
AGAAGCATTCCTAAATCCCAAAGTGCCACATGCCAAAGACATAAAATGTACAAATTAGA

1450 1470 1490
AAAATGTGGATAAACAGTCAAACCTTTATCCTCTAGAATTTTGGCAATGTTGACTAAGAA

1510 1530 1550
ACAGACTCCAACCAGACAAGGTAGGAACCCCTCCATAGCTCTCTGCCCTGATGTGTGGGGG

1570 1590 1610
AACTAGGAAGAAGTCCTTTGACCTCACCAGGCCTCATGCTTCCCTTTAATGTAAAGGGAA

1630 1650 1670
GGGGTTTGGCCACTTTCCTCTTTTGGGGTTGCTGAGAGGGCAAACCCCTGATATTTTTAC

1690 1710 1730
TGTGAAGGTGTTTTTCAGTTGTTCTTAGGAAGAACAGCTGATAGAAATTCAAGATTACTAT

1750 1770 1790
AATGGCTGTTATTATACACAGCTCTGTAAACTACCACTAAGCCCTGTGTTGGGGTCTCA

1810 1830 1850
AAGAAGTAAGCCACAGTAATCAAGCAAGGGCCTTTGGTTTTTTCCAGAGTTAGATCCTC

1870 1890 1910
TCAGAACAGAGTCTGGGAGAACTCCAATGCTGAATGCAGAAGGGTAATAGGTTGGTTGCA

1930 1950 1970
GTGAATGGGCTGGGGTGGGGTGGCCTTCTCCAGGCCTGAGTGTTTTTGTGTCCAGCTCA

1990 2010 2030
GTATCTGCAACAAGAAGTTTCCCACTTGTGGATGTTTAGTGCAGCCACAGACTTGTATTT

2050 2070 2090
TGATCCCCAATTTTTTTTGAAGAGTTCTCCTCATAGCAGGATGATTACGCATCAGAAGA

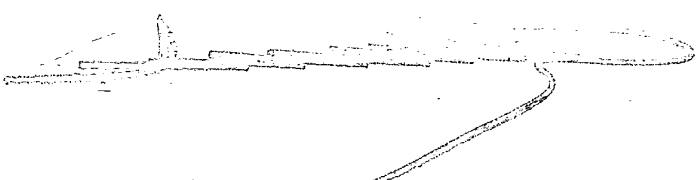
2110 2130 2150
AGAAGGAACCCATAGCTTGGTGTCAATAACATAATTATTTTAAGCCTTATCCAGCAGCCA

2170 2190 2210
TAATTTGAATAACTCTACCAGACCAGAGAGACTGTAGTTCCCTATTTTAACCTCAATTAT

A requerente reivindica a prioridade do pedido
alemão apresentado em 23 de Dezembro de 1988, sob o número P 38 43 513.
.6.

Lisboa, 21 de Dezembro de 1989
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in dark ink, consisting of a series of loops and strokes, positioned below the typed text.



R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DA PROTEÍNA DE PLACENTA 11 (PP11) A PARTIR DO SEU cDNA CODIFICANTE ISOLADO, E DE MEIOS DE DIAGNÓSTICO E COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE A CONTEM"

A invenção refere-se a um processo para a preparação da proteína de placenta 11 (PP11), que compreende introduzir-se uma sequência de DNA codificante para a respectiva sequência de aminoácidos, de acordo com a Tabela 2,

Tabela 2

10	30	50
CTTCCTGAAAGGATCTGGAGACACCAGCTCCACAAGTCCTGGTGTCTTTAAAAGGATCAG		
70	90	110
CTTGAGGAATAAGGCTCGTCTGAGAGCTGTGACATTCATCTGACTCTAGTCAAAGTCCAA		
130	150	170
CAGCCACTCCCTTTTGGCCTCCAACTGGGCACCATGAGGGCCTGCATCTCCCTGGTATT		
M R A C I S L V L		
190	210	230
GGCCGTGCTGTGTGGCCTGGCCTGGGTTGAGGACCACAAAGAGTCAGAGCCATTGCCACA		
A V L C G L A W A E D H K E S E P L P Q		
250	270	290
GCTGGAGGAAGAGACAGAAGAGGCCCTCGCCAGGAACCTGTACTCGGCACCCACCTCCTG		
L E E E T E E A L A S N L Y S A P T S C		

310 330 350
CCAGGGCCGCTGCTACGAAGCCTTTGACAAGCACCACCAATGTCACTGCAATGCCCGCTG
Q G R C Y E A F D K H H Q C H C N A R C

370 390 410
CCAAGAGTTTGGGAACTGCTGCAAGGATTTTGAGAGCCTGTGTAGTGACCAGGAGGTCTC
Q E F G N C C K D F E S L C S D H E V S

430 450 470
CCACAGCAGTGATGCCATAACAAAAGAGGAGATTTCAGAGCATCTCTGAGAAGATCTACAG
H S S D A I T K E E I Q S I S E K I Y R

490 510 530
GGCAGACACCAACAAAGCCCAGAAGGAAGACATCGTTCTCAATAGCCAAAAGTGCATCTT
A D T N K A Q K E D I V L N S Q N C I S

550 570 590
CCCCTCAGAGACCAGAAAACCAAGTGGATCGCTGCCCAAAGCCACTCTTCACCTTATGTCAA
P S E T R N Q V D R C P K P L F T Y V N

610 630 650
TGAGAAGCTGTTCTCCAAGCCCCACCTATGCAGCCTTCATCAACCTCCTCAACAACCTACCA
E K L F S K P T Y A A F I N L L N N Y Q

670 690 710
GGCGGCAACAGGCCATGGGGAGCACTTCAGTGCCCAAGGAGCTGGCCGAGCAGGACGCCTT
R A T G H G E H F S A Q E L A E Q D A F

730 750 770
CCTCAGAGAGATCATGAAGACAGCACTCATGAAGGAGCTCTACAGCTTCCTCCATCACCA
L R E I M K T A V M K E L Y S F L H H Q

790 810 830
GAATGGCTATGGCTCAGAGCAAGACTTTGTCGATGACTTGAAGAACATGTCGTTTGGGCT
N R Y G S E Q E F V D D L K N M W F G L

850 870 890
CTATTCGAGAGGCAATGAAGAGGGGGACTCGACTGGCTTTGAACATGTCTTCTCAGGTGA
Y S R G N E E G D S S G F E H V F S G E

910 930 950
GGTAAAAAAGGCAAGGTTACTGGCTTCATAACTGCATCCGCTTCTACCTGGAGGACAA
V K K G K V T G F H N W I R F Y L E E K

970 990 1010
GGAGGGTCTGGTTGACTATTACAGTCACATCTACGATGGGGCCTTGGGATTCTTACCCCGA
E G L V D Y Y S H I Y D G P W D S Y P D

1030 1050 1070
TGTGCTGGCAATGCAGTTCAACTGGGACGGCTACTATAAGGAAGTGGGCTCTGCTTTTCAT
V L A M Q F N W D G Y Y K E V G S A F I

1090 1110 1130
CGGCAGCAGCCCTGAGTTTGAGTTTGCACTCTACTCCCTGTGCTTCATCGCCAGGCCAGG
G S S P E F E F A L Y S L C F I A R P G

1150 1170 1190
CAAAGTGTGCCAGTTAAGCCTGGGAGGATATCCCTTAGCTGTCCGGACATATACCTGGGA
K V C Q L S L G G Y P L A V R T Y T W D

1210 1230 1250
CAAGTCCACCTATGGGAATGGCAAGAAGTACATCGCCACAGCCTACATAGTGTETTCAC
K S T Y G N G K K Y I A T A Y I V S S T

1270 1290 1310
CTAATAGAACTTCCAGCCAGAAAGGGGCATGAGGGCTCTTGCGAGACTGAAGTGCTATCT

1330 1350 1370
TCTCTGGACTAGAGACAAGAGCGGAGAGGACTGGAAGGGATCACCAAATCTCAAAGCAATG

1390 1410 1430
AGAAGCATTCCTAAATCCCAAAGTCCCCACATGGGAAAGAGATAAAATGTACAAATTAGA

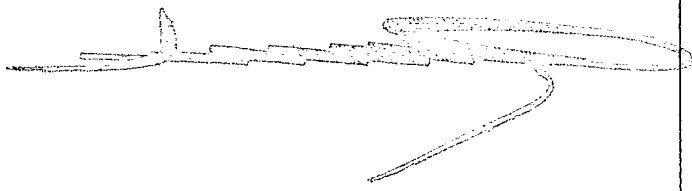
1450 1470 1490
AAAATGTGGATAAACAGTCAAACCTTTATCCTCTAGAATTTTGGCAATGTTGACTAAGAA

1510 1530 1550
ACAGAGTCCAAGCAGAGAAGGTAGGAACCCCTCCATAGCTCTCTGCCCTGATGTGTGGGGG

1570 1590 1610
AACTAGGAAGAAGTCCTTTGACCTCACCAGGCCTCATGCTTCCCTTTAATGTAAAGGGAA

1630 1650 1670
GGGGTTTGCCCACTTTCCTCTTTTGGGGTTGGTGAGAGGGCAAACCCGATATTTTAC

1690 1710 1730
TGTGAAGGTGTTTTAGTTGTTCTTAGGAAGAACAGCTGATAGAAATCAAGATTACTAT



1750 1770 1790
AATGGCTGTTATTATACACAGCTCTGTAAACTACCACTCAGCCCTGTGTTGGGGTCCTCA

1810 1830 1850
AAGAAGTAAGGCCACAGTAATCAAGCAAGGGCCTTTGGTTTTTTCCAGAGTTAGATCCTC

1870 1890 1910
TCAGAACAGAGTCTGGCAGAACTCCAATGCTGAATGCAGAAGGGTAATAGGTTGGTTGCA

1930 1950 1970
GTGAATGGGCTGGGGCTGGGCTGGCCTTCTCCAGGCCTGAGTGTTTTTGTGTCCAGCTCA

1990 2010 2030
GTATCTGCAACAAGAACTTTCCCACTTGTGGATGTTTAGTGCAGCCACAGACTTGTATTT

2050 2070 2090
TGATCCCCAATTTTTTTTGAAGAGCTTCTCCTCATAGCAGGATGATTGAGCATCAGAAGA

2110 2130 2150
AGAAGGAACCCATAGCTTGGTGTCAATTAACATAATTATTTTAAGCCTTATCCAGCAGCCA

2170 2190 2210
TAATTTGAATAACTCTACGAGACCAGAGAGACTGTAGTTCCCTATTTTAACCTCAATTAT

2230 2250 2270
GCATTTGTCCCCAACCCCACTGAGAACTAAATGCTGTACCACAGAGCCGGGTGTCAACTA

2290 2310 2330
TGGTTTAGAAGGTTCAAGTTTCCAATTAAAGTCATTGAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

2350 2370 2390
AAA

92660

