



Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
98.711 K			
Requerente (71): NOVO NORDISK A/S, dinamarquesa, industrial, com sede em Novo Allé, 2880 Bagsvaerd, Dinamarca			
Inventores (72): LARS SKRIVER, KIM RY HEJNAES e HENRIK DALBØGE			
Reivindicação de prioridade(s) (30)			Figura (para interpretação do resumo)
Data do pedido	País de Origem	N.º de pedido	
20.08.1990	DK	1989/90	
16.10.1990	DK	2497/90	
Epígrafe: (54) "MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE AlaGlu-IGF-1 E PARA A SUA RENATURAÇÃO E MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE IGF-1 HUMANO"			
Resumo: (máx. 150 palavras) (57) <p>Descreve-se um método para a preparação de IGF-1 humano biologicamente activo, a partir de um novo composto precursor, AlaGlu-IGF-1.</p> <p>Este novo composto, AlaGlu-IGF-1, pode ser convertido, com bom rendimento, em IGF-1 por renaturação deste precursor sob condições específicas, com posterior separação da extensão AlaGlu.</p> <p>O método é caracterizado pelo facto:</p> <p>i) de se exprimir um terminal amino de IGF-1 com extensão em um microrganismo transformado com um vector de expressão contendo um promotor induzível ligado directamente ao</p>			

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS



Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido (22)	Classificação Internacional (51)
-----------------------	-----	---------------------	----------------------------------

Resumo (continuação) (57)

2

ADN que codifica para IGF-1 humano comportando uma extensão no terminal amino e uma sequência de sinal que proporciona a secreção do produto expresso;

ii) de se extrair IGF-1 de terminal amino prolongado a pH > 6,0 mediante a utilização de ureia na presença de um agente de redução e, eventualmente, um agente quelante;

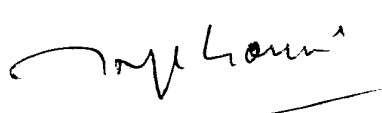
iii) de se submeter o extracto a uma cromatografia sobre gel de permuta aniónica, escolhido entre DEAE, DE e FF-Q, utilizando o tampão como descrito na fase ii) ajustado para 1,8-2,2 mS e pH de 7,8-8,2;

iv) de se renaturar o IGF-1 de terminal amino prolongado isolado por alteração do potencial redox da mistura reacção linearmente de -40 mV para +20-40 mV, por diálise contra um tampão contendo etanol em uma concentração compreendida entre 20 e 40% V/V, durante um intervalo de tempo de até 5 horas, com uma concentração de proteína compreendida entre 0,1 e 0,6 mg/ml e uma condutividade compreendida entre 0,15 e 0,3 mS, à temperatura ambiente e a um pH compreendido entre 7,5 e 10,0 e, finalmente, de se acidificar a mistura para um pH inferior a 5;

v) de se separar a extensão do terminal amino usando-se DAPI (EC 3,4,14,1);

vi) de se isolar IGF-1 autêntico renaturado do



Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido (22)	Classificação Internacional (51)
Resumo (continuação) (57)			<u>3</u>
<p>IGF-1 de terminal amino prolongado por meio de HPLC de fase inversa e cromatografia de permuta catiónica; e</p> <p>vii) de se filtrar sobre gel e liofilizar o IGF-1 humano, isolado.</p>			
			
(Dr. Jorge Garin)			

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS

4.

**"MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE AlaGlu-IGF-1 E PARA A SUA RENATU-
RAÇÃO E MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE IGF-1 HUMANO"**

A presente invenção refere-se a um novo factor do crescimento semelhante a insulina (FCI-1) que possui uma extensão amino-terminal, a uma sequência de ADN que codifica o FCI-1 que possui a referida extensão amino-terminal, a um plasmido recombinante constituído pelo ADN que codifica o FCI-1 humano que possui a extensão amino-terminal, a um microrganismo transformante que contém o referido plasmido recombinante, a um método para a renaturação de AlaGlu-FCI-1, a um método para se produzir FCI-1 humano e à utilização de um FCI-1 com uma extensão amino-terminal para a preparação de um FCI-1 maduro. A presente invenção é especialmente adequada na produção em larga escala do FCI-1.

ANTECEDENTES DA PRESENTE INVENÇÃO

Os factores do crescimento semelhantes a insulina (FCI) constituem uma família de proteínas que possuem propriedades de estimulação do crescimento e semelhantes às

4

através da sua fixação aos receptores da superfície celular nos tecidos alvo (Salmon, W.D.Jr., e Daughaday, W.H.: J. Lab. Clin. Med., 49, 825-836, 1957). A principal acção biológica local dos FCI consiste na sua acção como um potente agente mitogénico apesar do seu efeito ser inferior ao medido, por exemplo para FCDP e FCF (Froesch e outros.: Ann. Rev. Physiol. 47, 443-467 (1985). Conjuntamente com o FCDP, o FCI-1 apresenta efeitos biológicos sinérgicos (Kato e outros.: Eur. J. Biochem., 129,685-690 (1983), Stiles e outros.: P.N.A.S., Estados Unidos da América, 76, 1279-1283 ,1979). Os principais efeitos biológicos do FCI-1 foram por isso considerados como uma função de propagação de reacções mitogénicas e de manutenção do crescimento iniciado por outros factores, sob condições devidamente controladas (O Keefe e outros.: Mol. Cell. Endocrinol., 31, 167-186 (1983).

A potência do FCI-1 como um factor mitogénico e a sua ampla e potencial utilização por exemplo na cicatrização de feridas e no metabolismo do azoto, encorajou um grande número de empresas biofarmacêuticas a tentar exprimir o FCI-1 em diversos organismos, devido ao facto de no plasma humano apenas se encontrar presente uma pequena quantidade. A produção do FCI-1 em leveduras é favorecida por uma purificação muito simples de um polipeptido correctamente reconstituído. No entanto existem determinadas desvantagens significativas associadas à utilização destes

4

sistemas de expressão. O rendimento da fermentação é baixo (alguns mg por litro de caldo de fermentação) e o risco de se obterem formas glicosiladas ligadas ao O da molécula é significativo (Gillerfors e outros.: J. Biol. Chem., 264, 2748-53, 1989).

A expressão nas bactérias foi até à data a abordagem melhor sucedida e que proporcionou produções elevadas de FCI-1 e do FCI-2, mas na sua maioria em formas associadas a células. Também se tentou exprimir o FCI-1 fundido com um peptido estabilizante. Um peptido como este possui normalmente as mesmas dimensões do próprio FCI-1, e pode possuir propriedades fisico-químicas que facilitem a purificação da proteína resultante. Clivou-se a proteína de fusão quer por clivagem química quer por clivagem enzimática, deixando a proteína madura pronta a ser isolada.

A extração do peptido recombinante (peptido de fusão) encontra-se normalmente associada a um passo de desnaturação seguido da renaturação in vitro do FCI-1 extraído, o que origina a conformação nativa do FCI-1.

Nos sistemas bacterianos descritos até este momento, foram descritos rendimentos de produção de 1,5 gramas por litro de caldo de fermentação, por expressão biossintética de HCh. No entanto, apesar do elevado rendimento de expressão, apenas se obtiveram pequenas quantidades do FCI-1 nativo devido à formação não controlada de pontes dissulfeto intra e

intermoleculares. Em consequência, à expressão bacteriana de produtos contendo as referidas pontes dissulfeto segue-se a renaturação in vitro durante a última fase de purificação dos polipeptidos o que origina normalmente grandes perdas de produto.

O objectivo da presente invenção consiste, em primeiro lugar, na ultrapassagem dos problemas descritos na técnica anterior no que se refere à produção do FCI-1 em microrganismos, em grandes quantidades.

No contexto da presente invenção utiliza-se a palavra "reconstituição" para se designar o processo de acordo com o qual se estabelece a estrutura terciária da proteína, incluindo a formação das pontes dissulfeto intramoleculares.

A palavra "renaturação" utiliza-se para se referir o estabelecimento da estrutura terciária nativa das proteínas.

A palavra "desnaturação" utiliza-se para se designar a ruptura da estrutura terciária das moléculas, rompendo as pontes dissulfeto e/ou o desenrolar das proteínas.

BREVE DESCRIÇÃO DA PRESENTE INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao FCI-1 humano que possui uma extensão amino-terminal AlaGlu.

A extensão amino-terminal permite a elevada expressão do FCI-1 prolongado, a fácil renaturação ou a

reconstituição do FCI-1 e facilita a sua completa clivagem utilizando o enzima dipeptidil-amino-peptidase (DAP-1, EC 3.4.14.1) para formar o FCI-1 maduro.

Descobriu-se então, com surpresa, que a extensão amino-terminal AlaGlu permite ultrapassar os problemas da técnica anterior. Para além disso, é possível purificar o FCI-1 que possui uma extremidade N-terminal correcta, a partir da mistura de reacção. Pode isolar-se AlaGlu-FCI-1 como um produto intermédio com uma pureza de 80%, de preferência de 90% e que apresenta quando correctamente reconstituído a actividade biológica do FCI-1.

A porção de ADN que codifica o FCI-1 pode consistir em ADNc, ADN cromossómico ou ADN inteira ou parcialmente de síntese em que qualquer porção restante do ADN pode consistir nos correspondentes ADNc ou ADN cromossómico.

As sequências nucleotídicas utilizadas para a extensão amino-terminal e qualquer porção do ADN de síntese que codifique o FCI-1 são preferencialmente seleccionadas de modo a proporcionarem os codões preferenciais para o microrganismo seleccionado.

A expressão de AlaGlu-FCI-1, do amino-terminal prolongado origina um nível de expressão de 1,5 g/litro (0,2 mM) de AlaGlu-FCI-1 antes da extracção. Isto representa aproximadamente 4 a 5 vezes a expressão específica obtida em sistemas em que se aplicam proteínas de fusão mais longas. No

entanto, nem todas as extensões amino-terminais de cadeia curta proporcionam elevados níveis de expressão. A expressão de , por exemplo, MetGluAlaGlu-FCI-1, (AlaGlu)₆-FCI-1, ou do próprio FCI-1 origina níveis de expressão 10 a 25 vezes menores que o nível obtido quando se expressa AlaGlu-FCI-1.

Pode preparar-se o ADN que codifica AlaGlu-FCI-1 a partir de uma sequência de ADN clonado que codifica os 70 aminoácidos do FCI-1 que se encontra acoplado à sequência seguinte de ADN de cordão duplo, produzida por síntese, de tal modo que a extremidade 3' do cordão + esteja acoplado à extremidade + 5' do gene que codifica o FCI-1 e a extremidade 5' do cordão de ADN de síntese se encontre acoplada à extremidade 3' do gene por uma ligação complementar

+5' CGATG GCT GAA

-3' TAC CGA CTT

em que os dois primeiros nucleótidos do cordão + são uma projecção do sítio de restrição ClaI e a sequência nucleotídica seguinte codifica os aminoácidos MetAlaGlu.

De acordo com um outro aspecto da presente invenção proporciona-se um gene, apto para produção industrial, que codifica um FCI-1 terminalmente prolongado por um grupo amino que assegura a formação de um produto estável e a sua secreção no espaço periplasmático ou directamente no meio.

De acordo com um terceiro aspecto, a presente invenção refere-se a um vector recombinante que engloba ADN

que codifica o FCI-1 humano e que possui uma extensão amino-terminal AlaGlu. O vector pode apresentar-se na forma de um plasmido que engloba um promotor a jusante do ADN que codifica AlaGlu-FCI-1 e que engloba preferencialmente o promotor sensível à temperatura, λ PR, directamente acoplado ao ADN que codifica AlaGlu-IGF-1 e a sequência sinal OmpA que proporciona a secreção de AlaGlu-FCI-1 no espaço periplasmático ou directamente no meio. Demonstrou-se que este vector se encontrava apto para a produção industrial quando inserido na E. coli.

De acordo com um quarto aspecto, a presente invenção proporciona microrganismos transformantes que englobam os referidos plasmidos recombinantes.

De acordo com um quinto aspecto, a presente invenção, refere-se a um método para a renaturação de AlaGlu-FCI-1 em que AlaGlu-FCI-1, na sua forma reduzida e desnaturada, é reconstituído na presença de um reagente mercapto, na sua forma reduzida, numa solução aquosa tampão. A renaturação ocorre durante a alteração controlada do potencial redox de -40 mV para + 20 mV subindo até aos +40 mV por diálise em presença de um tampão contendo entre 20 e 40%, v/v, de etanol durante um período superior a 5 horas, para uma concentração proteica compreendida entre 0,1 e 0,6 mg/ml e para uma condutividade compreendida entre 0,15 e 0,3 mS, à temperatura ambiente e a um pH compreendido entre 7,5 e

10,0 e finalmente por acidificação da mistura para um pH inferior a 5.


O reagente mercapto utilizado, de acordo com o método da presente invenção, pode ser constituído por qualquer reagente do grupo mercapto que não forme produtos intermédios indesejáveis, por exemplo, 2-mercapto -etanol, cisteína, cisteamina, dando-se preferência à cisteína.

De acordo com a presente invenção, utiliza-se o reagente mercapto numa concentração compreendida entre 0,01-10 mM, de preferência numa concentração compreendida entre 0,1 e 5 mM e preferencialmente a uma concentração de 1 mM.

A solução aquosa tamponada na qual se efectua a reconstituição ou renaturação, de acordo com a presente invenção, é tamponada a um pH que se situa no intervalo compreendido entre 8,0 e 10,0, preferencialmente a um pH de 9,0.

Nalguns casos é preferível efectuar a renaturação de acordo com a presente invenção na presença de etanol, numa quantidade superior a 40% e de preferência cerca de 25%. Esta adição aumenta o rendimento do método e o eventual efeito benéfico do etanol torna-se facilmente demonstrável por simples experiências preliminares.

De acordo com um sexto aspecto a presente invenção refere-se a um processo para a produção do FCI-1 caracterizado por:

- 
- i) se fazer a expressão de um FCI-1 com uma extensão amino-terminal, num microrganismo transformado com um vector de expressão que engloba um promotor susceptível de ser induzido, directamente acoplado ao ADN que codifica o FCI-1 humano que possua uma extensão amino-terminal e uma sequência sinal que proporcione a secreção do produto expressado,
- ii) se fazer a extracção do FCI-1 com a extensão amino-terminal, a um pH de 6,0 utilizando uma elevada concentração de ureia na presença de um agente de redução e, eventualmente de um agente quelante,
- iii) se submeter o produto extraído a cromatografia num gel de permuta de aniões seleccionado entre grupo constituido por DEAE, DE e FF-Q utilizando o mesmo tampão a que se fez referência no passo ii), ajustado para 1,8-2,2 mS e a um pH compreendido entre 7,8 e 8,2,
- iv) se fazer a renaturação do FCI-1 que possui a extensão amino-terminal, alterando o potencial redox da mistura de reacção, linearmente de -40 mV para +20 até +40 mV por diálise na presença de um tampão que contenha entre 20 e 40% de etanol, durante um período de tempo superior a 5 horas, conservando a concentração de proteínas compreendida entre 0,1 e 0,6 mg/ml e para uma condutividade de 0,15-0,3 mS, à temperatura ambiente encontrando-se o pH compreendido entre 7,5 e 10,0 e finalmente acidificando a mistura para um pH

inferior a 5.

v) se fazer a clivagem da extensão amino-terminal utilizando DAP-1,

vi) se fazer o isolamento e a renaturação do autêntico FCI-1 humano renaturado recorrendo à cromatografia em líquido a elevada pressão-fase inversa (CLEP-FI) e à cromatografia de permuta catiónica e

vii) se fazer a filtração em gel e a liofilização do FCI-1 humano isolado.

Pode levar-se a efeito o método da presente invenção, por expressão do FCI-1 que possui a extensão amino-terminal, num microrganismo tal como uma bactéria gram-positiva ou numa bactéria gram-negativa tal como a *Escherichia*, de preferência a *E. coli*, que constitui um hospedeiro muito conveniente devido à sua aplicabilidade industrial.

De acordo com a presente invenção, o promotor pode consistir num promotor sensível à temperatura tal como λ_{PR} , λ_{PL} ou $\lambda_{PR'}$ e a sequência sinal pode consistir numa das sequências LamB, OmpA ou OmpF, com a finalidade assegurar uma expressão e secreção adequadas.

O Ala-Glu-FCI-1 expressa-se em níveis elevados, utilizando-se o promotor λ_{PR} directamente acoplado ao gene que codifica AlaGlu-FCI-1 e a sequência sinal OmpA proporciona a secreção de proteína numa forma estável.

Efectua-se a extracção de Ala-Glu-FCI-1 sob condições de redução e de renaturação utilizando ureia, agentes redutores tais como cisteína, 2-mercapto-etanol ou ditiotreitól e eventualmente um agente ou agentes quelantes tais como EDTA, no sentido de se destruir a estrutura terciária imposta em AlaGlu-FCI-1 pelo sistema de expressão.

A extracção de Ala-Glu-FCI-1 numa forma totalmente desnaturada efectua-se preferencialmente utilizando um tampão que contenha 7M de ureia, 50 mM de Cys no ponto isoeléctrico (8,4) ou pH 8,0.

A maioria das proteínas contaminantes provenientes de E.coli são removidas do AlaGlu-CIF-1 reduzido e desnaturado por cromatografia de permuta aniónica no ponto isoeléctrico. Efectua-se preferencialmente esta cromatografia para valores de condutividade de 2,0 mS, a pH 8,0 e preferencialmente por cromatografia por lotes sobre DE-52 (Whatman) repetida em Sefarose de tipo Q de Fluxo Rápido (FF-Q^R).

Renatura-se o AlaGlu-FCI-1 desnaturado e reduzido, obtendo-se AlaGlu-FCI-1 estável e correctamente reconstituído.

Efectua-se o processo de renaturação utilizando uma diálise sob condições controladas de potencial redox, pH, concentração de proteínas e temperatura na presença de reagentes quelantes, de desnaturação e mercapto e na presença



de solventes orgânicos.

O tampão de diálise caracteriza-se pela presença de pequenas quantidades de agente redutor (como por exemplo DDT, Cys ou 2-mercapto-etanol), de um agente quelante, de um composto orgânico que interactue com a ligação hidrofóbica (tal como o terc-butanol, 2-propanol, etanol, metanol) e finalmente uma substância tampão para conservar um intervalo de pH bem definido, habitualmente compreendido entre 8,8 e 9,0. De acordo com um dos aspectos da presente invenção, utiliza-se a seguinte composição tampão: 50 mM de Tris-HCl, 1 mM de Cys, 2 mM de EDTA e etanol a 25% a um pH de 9,5.

Preferencialmente leva-se a efeito a renaturação alterando linearmente o potencial redox de aproximadamente - 30 mV para aproximadamente +25 e +30 mV durante um período de 3 horas. Calibraram-se os eléctrodos redox utilizando uma solução de hidroquinona que possui um potencial redox bem definido de 463 mV.

É preferível efectuar a renaturação para valores de condutividade de 0,2 mS uma concentração de proteínas compreendida entre 0,1 e 0,4 mg/ml e um valor de pH que varie entre 8,5 e 9,5, de preferência a um valor de pH compreendido entre 8,5 e 9,0 de acordo com a medição efectuada em tampão antes da adição de etanol numa concentração compreendida entre 20% e 40% (v/v), a uma temperatura compreendida entre 20 e 22°C.

4.

De acordo com um aspecto mais preferencial efectua-se a renaturação de AlaGlu-FCI-1 fazendo passar o polipeptido através de um dispositivo de fibras ocas (Nephross Presto, H.P., Organon Teknika) a um débito que varie entre 25 e 250 ml/minuto, de preferência entre cerca de 100 ml/minuto, enquanto se altera o potencial redox, até se pôr cobro ao processo mediante a adição de ácido acético 5M até se obter um pH inferior a 5, de preferência um pH de 4,0.

Concentrou-se então a solução resultante por cromatografia de permuta catiónica na presença de solventes orgânicos antes de se clivar a extensão amino-terminal. Efectuou-se a permuta catiónica utilizando de preferência um material forte de permuta iónica, tal como FF-S^R ou FF-SP_R, na presença de um álcool a 10-40%, tal como o metanol, etanol, propanol ou butanol, de preferência etanol a 25% e utilizando um gradiente de pH compreendido entre 3,5 e 7,5.

Efectua-se, a clivagem do AlaGlu-FCI-1 renaturado utilizando de preferência a exopeptidase (DAP-1) para se proporcionar uma clivagem rápida e eficiente do precursor do FCI-1. Utiliza-se a exopeptidase preferencialmente numa concentração de 0,08 unidades de DAP-1 por mg de proteína, na presença de NaCl, ajustando-se a concentração da proteína para, aproximadamente 1 mg/ml em tampão acetato 40 mM a pH 4,0 e a 37°C.


A purificação do FCI-1 por CLEP de fase inversa

após a clivagem utilizando DAP-1 pode ser efectuada alternativamente em coluna PR18 de tipo comercial (Lichosorb) ou em coluna de tipo RP 18 de silanoilo C18 feita por encomenda. De preferência utiliza-se uma coluna RP18 de silanoilo A/S de 15 µm da "Novo Nordisk" cuja eluição é efectuada a pH 3,0 em tampão fosfato de sódio 0,1 M com gradiente linear de etanol variando entre 30 e 50%

Todos os FCI-1 que não se encontrem correctamente reconstituídos serão removidos por cromatografia de fase inversa numa coluna RP18 de tipo comercial por exemplo "Lichrosorb", ou numa coluna RP18 de silanoilo C18, feita por encomenda utilizando etanol como fase móvel e removendo o AlaGlu-FCI-1 por cromatografia de permuta catiónica, partindo de condições ácidas e aplicando um gradiente de pH compreendido entre 4,0 e 7,0, utilizando o mesmo sistema tampão que se usou no anterior procedimento de permuta catiónica.

Submete-se depois o CIF-1 purificado a liofilização e filtração através de gel. O FCI-1 liofilizado é capturado em ureia 7 M e aplicado a uma coluna Sephadex GPC G50F equilibrada com ácido acético 0,1 M, a 4°C. Armazena-se o material purificado a 4°C.

Finalmente submete-se o FCI-1 altamente purificado a diálise, filtração através de gel e a liofilização dando origem a um pó quimicamente estável.



De acordo com um outro aspecto da presente invenção, purifica-se parcialmente o FCI-1 que possui a extensão amino-terminal, para se obter uma forma totalmente desnaturada e reduzida.

Obtém-se uma separação selectiva do FCI-1 com a extensão amino-terminal e a sequência aminoácida correctas, utilizando uma cromatografia de permuta catiónica, após clivagem da extensão amino-terminal utilizando DAP-1 de acordo com o princípio descrito por Dalboege, H. e outros FEBS Lett. 246 (1,2) 89-93, 1989.

Obtem-se a remoção das formas do FCI-1 incorrectamente renaturadas (reconstituídas) por CLEP de fase inversa, utilizando uma matriz de sílica octadecil-dimetil-silil-substituída constituída por partículas esféricas de 15 μ , sendo o diâmetro dos poros de 300 Å .

Efectuou-se a caracterização do FCI-1 renaturado, no que se refere ao correcto posicionamento das pontes dissulfeto, utilizando duas clivagens enzimáticas seguidas de análise da carta peptídica e análise sequencial.

O processo, de acordo com a presente invenção possui ainda a vantagem de poder ser utilizado directamente.

Um dos aspectos importantes da presente invenção reside no facto do procedimento de extracção proporcionar um elevado rendimento (próximo dos 100%) de AlaGlu-FCI-1. Purifica-se então o FCI-1 que possui a extensão amino-

4.

-terminal utilizando um passo que consiste especificamente na cromatografia por permuta aniónica de tipo FF-Q^R sob condições de pI tais que o AlaGlu-FCI-1 não se fixa à resina, considerando que sob estas condições específicas se removem as proteínas originadas na E.Coli e um polipeptido que exhibe características fisico-químicas semelhantes às do AlaGlu-FCI-1 .

Um outro aspecto importante da presente invenção reside no passo de renaturação específica. Este passo caracteriza-se pelo controlo contínuo do potencial redox, rigor iónico e temperatura durante a renaturação do Ala-Glu-FCI-1.

Descobriu-se que as modificações da pré-sequência alteram drásticamente as condições de renaturação.

A presente invenção proporciona, também um novo conceito para a clivagem de uma extensão N-terminal do FCI-1, em que se utiliza DAP-1 (EC 3.4.14.1) e, se efectua uma desnaturação moderada do FCI-1 correctamente reconstituído antes do passo final de cromatografia por permeação em gel.

Deste modo, na presente invenção, aplica-se uma série de condições únicas que tomadas em conjunto melhoram a qualidade do produto e o rendimento de todo o processo que decorre a seguir à fermentação.

Pode levar-se a efeito o referido processo em quantidades que podem ascender a gramas por ensaio, obtendo-se um elevado grau de purificação, tal como é demonstrado

pelo baixo teor de proteínas originadas pela E. coli (< 1 ppm).

Verificou-se que o produto possuía uma composição aminoácida, uma sequência aminoácida, pontes dissulfeto e uma cartografia peptídica idêntica às observadas para o FCI-1 purificado a partir do plasma humano.

Caracterizou-se posteriormente o produto, pelo facto de existir uma banda única sobre gel de SDS-poliacrilamida e sobre os geles nativos. Finalmente verificou-se por CLEP e por CGP analíticas de fase inversa, que o produto possuía uma pureza superior a 95%

A presente invenção refere-se também à utilização do FCI-1 possuindo a extensão amino-terminal AlaGlu, na preparação do FCI-1 maduro.

A actividade biológica do produto obtido, de acordo com o método descrito na presente invenção, é igual à do FCI-1 nativo, purificado, a partir do plasma. Pode-se utilizar o produto, por exemplo, para o tratamento de feridas durante o período de cicatrização das referidas feridas, cicatrização de fracturas ósseas, distúrbios de carácter metabólico e de diabetes do tipo II (NIDDM). Pode-se formular o FCI-1, de acordo com métodos conhecidos na formulação de preparações farmacêuticas ou de formas de administração, que incorporem o FCI-1.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A descrição das Figuras , que a seguir se efectua, contribuirá para melhor ilustrar a presente invenção:

A Fig 1 apresenta a estratégia de clonagem de um vector que codifica Ala-Glu-FCI-1;

A Fig. 2 apresenta um diagrama de uma CLEP de Ala-Glu-FCI-1 parcialmente purificado, nas suas formas desnaturada e reduzida;

A Fig. 3 apresenta um diagrama de uma CLEP de Ala-Glu-FCI-1 parcialmente purificado, na sua forma renaturada;

A Fig. 4 apresenta um diagrama de uma CLEP do FCI-1 com um grau de pureza superior a 95%;

A Fig. 5 apresenta uma sequência de ADN do pHD 147 que codifica o FCI-1;

A Fig.6 apresenta um diagrama de Ala-Glu-FCI-1 por CLEP-FI após renaturação por diálise num dispositivo de fibras ocas;

A Fig. 7 apresenta um diagrama de Ala-Glu-FCI-1 por CLEP-FI após renaturação por diluição;

A Fig.8 apresenta um diagrama de Ala-Glu-FCI-1 por CLEP-FI após renaturação por dessalinização;

A Fig. 9 apresenta um diagrama de Ala-Glu-FCI-1 por CLEP-FI após renaturação por diálise.

A partir deste momento proceder-se-à à exemplificação da presente invenção tendo como finalidade uma

melhor compreensão da mesma.

PARTE EXPERIMENTAL

EXEMPLOS

Exemplo 1

Construção do gene do FCI-1

Construiu-se um gene de síntese para o MetGlu-FCI-1 com base numa sequência aminoácida publicada (Jansen e outros, 1983). Utilizando códons óptimos de E. coli construiu-se o gene a partir de fragmentos de síntese os quais depois de recozidos e purificados sobre gel foram clonados, gradualmente entre os sítios de restrição únicos nos vectores de clonagem adequados (Fig.1).

Construção do plasmido pHD145 (plasmido que codifica aa 1-30 de MetGlu-FCI-1):

Preparação do ligante: trataram-se separadamente com quinase 0,4 µg de ligantes na placa superior a, na placa inferior a e na placa superior b, adicionando-lhes 1 µl de tampão quinase (10 X), 1 µl de ATP 10 mM, 1 µl de PNK T4 (10 unidades) e 6 µl de H₂O. Incubou-se a 37°C, durante 30 minutos. Aqueceu-se depois a mistura até aos 65°C durante 10 minutos.

Efectuou-se o recozimento de 10 µl do ligante na posição superior a tratado com quinase e 10 µl do ligante na posição inferior a tratado com quinase, por aquecimento até se atingirem os 100 °C durante 3 minutos e arrefecimento

em gelo.

Efectuou-se o recozimento de 10 μ l do ligante na placa superior b tratado com quinase e de 0,4 μ g do ligante na placa inferior b (não tratado com quinase) por aquecimento até aos 100°C durante 3 minutos e por arrefecimento em gelo.

União dos ligantes: misturou-se 20 μ l de a, 11 μ l de b, 4 μ l da mistura ligase (10 X), 1 μ l de ligase (0,5 unidades) e 4 μ l de H₂O e, incubou-se a 15°C durante 2 horas. Fez-se passar a mistura, através de um gel de agarose a 1,8%, de baixo ponto de fusão. Isolou-se um fragmento de 100 pb que se purificou utilizando um agente de eluição. Após precipitação, dissolveu-se o fragmento em 50 μ l de H₂O. Tomaram-se 2 μ l da solução que se examinaram sobre gel de agarose a 2%.

Preparação do plasmido

Clonou-se o ligante anteriormente purificado, no plasmido pBR322, digerido com ClaI/BalI. Para facilitar a digestão de pBR322 com BalI é necessário efectuar a cultura deste plasmido numa estirpe não metilante de E. coli. Por consequência, o pBR322 foi transformado utilizando a estirpe bacteriana E. coli GC117 que é DCM menos e DAM menos. Digeriu-se 10 μ l de pBR322 (de GC117) utilizando 5 U de ClaI/3 U de BalI num tampão de um sal inferior , num volume final de 100 μ l. A incubação realizou-se a 37°C, durante 2

dias e 2 noites.

Purificou-se um fragmento de ADN que possuía aproximadamente 1900 pb (fragmento do plsmido), sobre gel de agarose a 0,7%, de baixo ponto de fusão. Após a eluição com um agente de eluição, dissolveu-se o ADN em 40 µl de H₂O. Examinou-se sobre gel uma alíquota de 1 µl da referida solução.

Ligação do pHD145:

Efectuaram-se as seguintes ligações:

	A	B	C
ADN 100 pb	3 µl	3 µl	3 µl
Ligante a+b			
pBR322 ClaI/BalI	1 µl	0,05 µl	0,05 µl
ADN ligase T4	0,05 unid. (1 µl)	0,05 unid. (1 µl)	1 unid. (1 µl)
mist.lig. (10X)	1 µl	1 µl	1 µl
H ₂ O	4 µl	4 µl	4 µl
	Controlo A	Controlo B	Controlo C
ADN 100 pb	0	0	0
ligante			
pBR322 ClaI/BalI	1 µl	0,05 µl	0,05 µl
ADN ligase T4	0,05 unid.	0,05 unid.	1 unid.
mist.lig. (10X)	1 µl	1 µl	1 µl
H ₂ O	7 µl	7 µl	7 µl

Todos os produtos ligados foram incubados a 15°C durante 3 horas, transformados utilizando MC1061, colocados em placas de agar contendo LB + ampicilina (LBA) sobre filtro de nitrocelulose e incubados a 37°C durante a noite. A leitura das placas efectuada no dia seguinte demonstrou que o

número de colónias nas placas de controlo era superior ao das placas às quais se tinha adicionado o fragmento de 100 pb. Por este motivo se decidiu fazer o rastreio dos transformantes positivos por hibridação do ADN.

Hibridação das colónias:

Replicou-se uma cópia de cada um dos filtros sobre nitrocelulose recém-preparada transferiram-se ambos os filtros para placas contendo LBA e incubaram-se a 37°C durante a noite. Efectuou-se a lise das bactérias existentes sobre um dos filtros durante 2 minutos em NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M, seguindo-se a lavagem com Tris 0,5M, a pH 8, NaCl 1,5 M, durante 2 minutos e 2 X SSC durante 2 minutos. Secaram-se os filtros recozeram-se durante 1 hora a 80°C e hibridaram-se com uma sonda.

Preparação da sonda:

Misturou-se 1 µl (0,4 µg) de FCI-1 na placa superior a, 1 µl (0,4 µg) do FCI-1 na placa superior b, 100 µCi de ATP (10 µl) 2 µl de tampão quinase (10 X), 1 µl (5 unidades) de PNK, misturou-se H₂O até 20 µl e incubou-se a 37°C durante 30 minutos. Adicionaram-se os filtros recozidos após hibridação prévia a 65°C, adicionou-se à sonda anterior os filtros cozidos num volume de hibridação de 50 ml. Efectuou-se a hibridação a 60°C durante a noite . Lavou-se os filtros com 2 X SSC efectuando-se em seguida a sua lavagem em 0,1 X SSC a 50°C ,secagem e colocação sobre uma película.

4

Efectuou-se a cultura de 15 colónias positivas em LBA, a 37°C durante a noite. A análise do ADN de uma minipreparação, utilizando os enzimas ClaI/PvuII demonstrou, após passagem por gel de agarose a 1,5%, que todas os clones com excepção do clone 11 incorporavam o fragmento de ADN esperado de 745 pb. No sentido de se analisarem alguns dos clones, inclusivamente quanto à presença do fragmento BlaI/ClaI de aproximadamente 100 pb, transformaram-se os clones 1,2, 3 e 4 na E. coli GC117 e colocaram-se em placas de agar que continham LBA. Seleccionou-se apenas uma colónia de cada uma das quatro placas e utilizou-se para se efectuar a propagação do ADN de uma maxipreparação. A digestão das preparações dos quatro plasmidos demonstrou que as construções 1,2 e 3 possuíam os sítios de restrição esperados, mas no clone 4 não existia o sítio BalI.

Construção de pHD146 (plasmido que possui uma sequência que codifica aa 1-56 de MetGlu-FCI-1):

Digeriu-se 100 µl de ADN de uma maxipreparação respectivamente de pHD146-1, -2 e -3 com 20 unidades de BalI durante a noite a 37°C, num sal inferior. Depois de se ter examinado a digestão em gel de agarose, digeriu-se o ADN com 20 unidades de PvuI durante a noite a 37°C num sal superior. Após a digestão, fraccionou-se o ADN numa preparação de gel de agarose a 0,7%. Isolou-se um fragmento de ADN de 750 pb, a partir de cada colónia, que se eluiu, precipitou e dissolveu

em 20 μ l de H₂O à temperatura de ebulição durante 5 minutos e arrefeceu-se com gelo. O ligante recozido foi depois purificado sobre uma preparação de agarose a 2,5%, isolou-se uma banda de 70 pb, eluiu-se a partir do gel utilizando um agente de eluição, precipitou-se e dissolveu-se em 20 μ l de H₂O.

Adicionou-se ao ligante purificado 1 μ l de tampão quinase diluído 10 vezes, 1 μ l de ATP 10 mM, 5 unidades de PNK e um volume de H₂O até perfazer 10 μ l, ao que se seguiu a sua incubação a 37°C, durante 1 hora.

Digeriu-se 20 μ l de ADN do pBR322 com 50 unidades de PvuI/50 unidades de NruI num sal superior até perfazer um volume final de 100 μ l. Após a digestão, fraccionou-se o ADN sobre um gel e isolou-se um fragmento de aproximadamente 2800 pb, purificou-se com um agente de eluição, precipitou-se e dissolveu-se em 20 μ l de H₂O.

As ligações que a seguir se indicam, A, B, controlo C e controlo D foram efectuadas com fragmentos isolados de pHD145-1, -2 e -3 respectivamente

	A	B	Controlo C	Controlo D
mist. lig.10X	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
frag. 2800 pb	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
frag. 750 pb	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0
lig.c+d tratado c/ cinase, 70 pb	10 μ l	1 μ l	0	0
H ₂ O	6 μ l	15 μ l	16 μ l	16,5 μ l
ADN T4 ligase 0,1 U/ μ l	0,1 U	0,1 U	0,1 U	0,1 U

4

Incubaram-se as ligações anteriores a 15°C durante a noite, transformaram-se com MC1061 e colocaram-se em placas contendo LBA sobre um filtro de nitrocelulose. Utilizaram-se cinco placas por ligação.

Após incubação durante a noite a 37°C, replicaram-se e trataram-se todas as placas tal como anteriormente se descreveu para a construção do pHD145. Utilizou-se como sonda 1 µl (0,4 µg) de ligante na placa superior c e 1 µl (0,4 µl) de ligante na placa superior d, marcados tal como se descreveu para o pHD145. As condições de hibridação e de lavagem foram idênticas às anteriormente descritas. Após desenvolvimento da película, seleccionaram-se 24 colónias positivas que se propagaram numa minipreparação de ADN em meio LBA. Analisou-se o ADN por digestão com NruI/EcoRI e verteu-se sobre gel de agarose a 1,5%. Os clones 3,4,5,8,13,16,18,19,20 e 21 pareciam correctos. Seleccionou-se os clones 3 e 13 para uma análise mais rigorosa e propagação numa minipreparação de ADN.

Os 24 clones isolados foram obtidos a partir das seguintes ligações:

	Reacção de Ligação	pHD145-de 750 pb	Placa Nº
1	A	1	b
2, 3, 4, 5, 6	B	1	a
7, 8	B	1	c
9	A	2	b
10	A	2	c
11, 12, 13, 14	B	2	c
15, 16	B	2	e
17	A	3	c
18	A	3	d
19, 20, 21	B	3	c
22, 23, 24	B	3	d

Clonagem de pHD147 (plasmido que possui a sequência que codifica aa 1-70 de MetGlu-FCI-1 (Fig. 1):

Digeriu-se 50 µl da maxipreoparação de ADN de pHD146-3 e pHD146-13 respectivamente com 20 unidades de NruI e 15 unidades de PvuI num volume final de 55 µl (meio salino). Digeriu-se 10 unidades de ADN do plasmido pBR322 com 15 unidades de PvuI e 36 unidades de HindIII , num volume final de 55 µl (meio salino). Fraccionaram-se as duas digestões sobre gel de agarose a 0,8% de baixo ponto de fusão. A partir dos clones pHD146-3 e -13 isolou-se um fragmento de 800 pb que se eluiu, precipitou e dissolveu em 50 µl de H₂O. A partir de pBR322 isolou-se um fragmento de 3500 pb que se eluiu, precipitou e dissolveu em 50 µl de H₂O.

Examinou-se o ligante FCI-1 que se recozeu e purificou sobre uma preparação de gel de agarose a 2,5%, tal como se descreveu para os ligantes anteriores.

Isolou-se um fragmento de 20 pb que se dissolveu em

50 μ l de H₂O. Todos os fragmentos anteriormente referidos foram examinados sobre gel de agarose .

Ligação de pHD147:

	A	B
pBR322-frag. 3 500 pb	1,5 μ l	1,5 μ l
pHD146-3- frag 3800 pb	10 μ l	10 μ l
ligante e de 50 pb	2 μ l	0 μ l
mist. lig. (10 X 10)	1,5 μ l	1,5 μ l
ADN T4 ligase 1 U/ μ l	1 unid.	1 unid.

Efectuou-se a reacção de ligação utilizando o fragmento de 800 pb do pHD146-3 assim como do pHD146-13. Incubou-se a reacção de ligação durante 3 horas a 15°C, transformou-se por introdução na E. coli MC1061 e colocou-se em placas LBA. Replicaram-se os filtros, lavaram-se e hibridaram-se, tal como anteriormente descrito. Utilizaram-se 2 μ l do FCI-1 e de ADN inferior como uma sonda. Seleccionaram-se 6 clones positivos dos filtros em que se tinha utilizado respectivamente o ADN dos clones pHD146-3 e pHD146-13. Designaram-se estes clones por pHD-1-> 6 (pHD146-3 +ligante e) e pHD147-7-> 12 (pHD146-13 + ligante e). A análise duma minipreparação de ADN de 12 clones utilizando a mistura de enzimas de restrição EcoRI/HindIII demonstrou que todos os clones possuíam o fragmento esperado. Seleccionaram-se os clones 1, 2, 7 e 8 para uma análise mais rigorosa em que se utilizou a digestão com os enzimas de restrição HindIII/ClaI,

PvuII/BamHI, PstI/BamHI. Segundo parecia todos os clones possuíam o padrão de restrição esperado. Propagaram-se os clones pHD147-1 e pHD147-7 numa maxipreparação de ADN. Isolou-se simultâneamenteo ADN de uma minipreparação a partir dos clones 1,2,7 e 8 digeridos com as enzimas EcoRI, HindIII e isolou-se um fragmento de 220 pb que se clonou em M13, MP18 e MP19 e se submeteu a análise sequencial. A análise sequencial do ADN demonstrou que os clones englobavam a sequência de ADN esperada.

Exemplo 2

Produção Citoplasmática de MetGlu-FCI-1

Digeriu-se o plasmídeo pHD-147-1 com HindIII na presença de ADN-polimerase de Klenow e dNTP, extraiu-se com fenol, precipitou-se e digeriu-se com ClaI. Introduziu-se o gene excisado no plasmídeo de expressão pHD86SP13 (Dalboge e outros, 1987). Biotechnol. 5, fs 161) e introduziu-se na E.coli MC1061.

Analisaram-se extractos de bactéria contendo o plasmídeo de expressão num ensaio radioimunológico (ERI) específico para FCI-1 e pelas bandas Western. Em nenhuma das análises se detectaram clones que expressassem quantidades detectáveis do FCI-1. Na E. coli, existe uma tendência para a desintegração de pequenos polipeptidos citoplasmáticos estranhos (com um número de aminoácidos inferior a 90-100), uma vez que são reconhecidos como proteínas incorrectamente

7-

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836

837

838

839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860

861

862

863

864

865

866

867

868

869

870

871

872

873

874

875

876

877

878

879

880

881

882

883

884

885

886

887

888

889

890

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

901

902

903

904

905

906

907

908

909

910

911

912

913

914

915

916

917

918

919

920

921

922

923

924

925

926

927

928

929

930

931

932

933

934

935

936

937

938

939

940

941

942

943

944

945

946

947

948

949

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

965

966

967

968

969

970

971

972

973

974

975

976

977

978

979

980

981

982

983

984

985

986

987

988

989

990

991

992

993

994

995

996

997

998

999

1000

1001

1002

1003

1004

1005

1006

1007

1008

1009

1010

1011

1012

1013

1014

1015

1016

1017

1018

1019

1020

1021

1022

1023

1024

1025

1026

1027

1028

1029

1030

1031

1032

1033

1034

1035

1036

1037

1038

1039

1040

1041

1042

1043

1044

1045

1046

1047

1048

1049

1050

1051

1052

1053

1054

1055

1056

1057

1058

1059

1060

1061

1062

1063

1064

1065

1066

1067

1068

1069

1070

1071

1072

1073

1074

1075

1076

1077

1078

1079

1080

1081

1082

1083

1084

1085

1086

1087

1088

1089

1090

1091

1092

1093

1094

1095

1096

1097

1098

1099

1100

1101

1102

1103

1104

1105

1106

1107

1108

1109

1110

1111

1112

1113

1114

1115

1116

1117

1118

1119

1120

1121

1122

1123

1124

1125

1126

1127

1128

1129

1130

1131

1132

1133

1134

1135

1136

1137

1138

1139

1140

1141

1142

1143

1144

1145

1146

1147

1148

1149

1150

1151

1152

1153

1154

1155

1156

1157

1158

1159

1160

1161

1162

1163

1164

1165

1166

1167

1168

1169

1170

1171

1172

1173

1174

1175

1176

1177

1178

1179

1180

1181

1182

1183

1184

1185

1186

1187

1188

1189

1190

1191

1192

1193

1194

1195

1196

1197

1198

1199

1200

1201

1202

1203

1204

1205

1206

1207

1208

1209

1210

1211

1212

1213

1214

1215

1216

1217

1218

1219

1220

1221

1222

1223

1224

1225

1226

1227

1228

1229

1230

1231

1232

1233

1234

1235

1236

1237

1238

1239

1240

1241

1242

1243

1244

1245

1246

1247

1248

1249

1250

1251

1252

1253

1254

1255

1256

1257

1258

1259

1260

1261

1262

1263

1264

1265

1266

1267

1268

1269

1270

1271

1272

1273

1274

1275

1276

1277

1278

1279

1280

1281

1282

1283

1284

1285

1286

1287

1288

1289

1290

1291

1292

1293

1294

1295

1296

1297

1298

1299

1300

1301

1302

1303

1304

1305

1306

1307

1308

1309

1310

1311

1312

1313

1314

1315

1316

1317

1318

1319

1320

1321

1322

1323

1324

1325

1326

1327

1328

1329

1330

1331

1332

1333

1334

1335

1336

1337

1338

1339

1340

1341

1342

1343

1344

1345

1346

1347

1348

1349

1350

1351

1352

1353

1354

1355

1356

1357

1358

1359

1360

1361

1362

1363

1364

1365

1366

1367

1368

1369

1370

1371

1372

1373

1374

1375

1376

1377

1378

1379

1380

1381

1382

1383

1384

1385

1386

1387

1388

1389

1390

1391

1392

1393

1394

1395

1396

1397

1398

1399

1400

1401

1402

1403

1404

1405

1406

1407

1408

1409

1410

1411

1412

1413

1414

1415

1416

1417

1418

1419

1420

1421

1422

1423

1424

1425

1426

1427

1428

1429

1430

1431

1432

1433

1434

1435

1436

1437

1438

1439

1440

1441

1442

1443

1444

1445

1446

1447

1448

1449

1450

1451

1452

1453

1454

1455

1456

1457

1458

1459

1460

1461

1462

1463

1464

1465

1466

1467

1468

1469

1470

1471

1472

1473

1474

1475

1476

1477

1478

1479

1480

1481

1482

1483

1484

1485

1486

1487

1488

1489

1490

1491


1492

1493

1494

1495

1496



7 M. Extraíu-se a cultura celular a pH 8,0 durante 30 minutos entre 6 e 10°C. Centrifugou-se o extracto durante 30 minutos (4 000 rpm) e o sobrenadante foi congelado ou então imediatamente processado.

Exemplo 5

Diálise

Diluiu-se um litro de extracto de cultura celular do Exemplo 1 até ao volume de 1,5 litros utilizando 0,5 litros de ureia 7M e de cisteína 50 mM. Dialisou-se o extracto diluído fazendo-o passar através de um filtro de fibras ocas (Nephros Presto, H.F. Organon). O fluxo foi de 100 ml por minuto. Efectuou-se a mudança de tampão invertendo a passagem da ureia 7 M e da cisteína 50 mM, a pH 8,0, a um débito de 133 ml por minuto. Reciclou-se o extracto e o tampão até se atingir o equilíbrio. Pôs-se cobro à diálise ao atingir-se uma intensidade iónica correspondente a 2,0 mS.

Exemplo 6

Permuta Aniónica de AlaGlu-FCI-1 Impura


Equilibrou-se material de permuta aniónica DE-52 (Whatman) utilizando 50 mM de Tris-HCl 50 ,7 M de ureia e 50 mM de cisteína a uma condutividade de 2,0 mS. Misturou-se o material de permuta aniónica equilibrado com o extracto bruto dialisado obtido no Exemplo 2 (proteína/gel numa proporção de 1 g para 30 ml). O extracto bruto foi absorvido durante 2 horas à temperatura ambiente ou durante a noite a

4°C. A seguir à absorção, recolheram-se as proteínas não absorvidas, por filtração num filtro Millipore A25. O filtrado foi reabsorvido durante 3 horas à temperatura ambiente, em Sefarose de tipo FF-Q, que se havia previamente equilibrado utilizando o mesmo tampão (proteína/gel, numa proporção de 1g/200 ml). Determinou-se a qualidade e a quantidade de AlaGlu-FCI-1 desnaturado, por cromatografia de fase inversa. A coluna aplicada foi uma coluna de "Nucleosil" C4, de 5µm e de 4,6 X 250 mm, em TFA, e acetonitrilo. Condições iniciais para TFA: 0,085% em H₂O, (tampão A), tampão B em TFA a 0,1%, 80% de acetonitrilo. Eluiu-se a coluna utilizando uma mistura de tampões A e B num gradiente isocrático durante 0-5 minutos para o tampão B a 30% e um gradiente linear durante 5 - 25 minutos para o tampão B variando entre 30-75%, débito: 1,0 ml/minuto; detecção: absorção a 215 nm; temperatura ambiente. Na Figura 2 apresenta-se o AlaGlu-FCI-1 desnaturado e reduzido.

Exemplo 7

Renaturação de AlaGlu-FCI-1 desnaturado por diálise em fibras ocas

Ajustaram-se os lotes reduzidos e desnaturados de AlaGlu-FCI-1 obtidos tal como se descreveu no Exemplo 3, para uma concentração de proteínas de 0,2 mg/ml utilizando 7M de ureia e 50 mM de cisteína. Ajustou-se o pH para 9,5 utilizando NaOH. Dialisou-se a solução em presença de um



tampão constituído por 50 mM de Tris-HCl, 2 mM de cisteína, 2 mM de EDTA, a pH 9,5 e etanol a 25%. Efectuou-se a diálise utilizando um dispositivo de diálise em fibras ocas (Nephros Prosto H.F. Organon) com um débito de 100 ml/minuto. Mudou-se o tampão de diálise quando se obteve o equilíbrio entre a solução e o tampão. Prosseguiu-se com o processo até se atingir uma condutividade de 150 μ S e um potencial redox de 25 mV. Após a fase inicial durante a qual se duplicou a maior parte da quantidade de AlaGlu-FCI-1, deixou-se estabilizar a solução a 4°C durante a noite. Decorridas 16 horas pôs-se termo à reacção ajustando o pH para 4,0 utilizando ácido acético 5M. Após a diálise, a intensidade iónica correspondia a 0,2 mS e a concentração de ureia calculada foi menor do que 0,05M.

Na Figura 3 fornece-se um exemplo da renaturação de uma aliquota de AlaGlu-FCI-1 desnaturada e reduzida. O pico correspondente ao tempo de retenção (TR) de 14,86 minutos representa uma forma desordenada de AlaGlu-FCI-1 (TR de 15,68) com um valor de M^r de 7 845 u.m.a.. Os picos que apareceram posteriormente a AlaGlu-FCI-1 representam, provavelmente, formas desorganizadas da molécula.

Ajustou-se o eléctrodo redox que se utilizou neste passo, utilizando uma solução de hidroquinona 5 mM que possuía um potencial redox definido de 463 mV a um pH de 4,0.

Faz-se referência à Figura 6, que diz respeito à

CLEP-FI em fibras ocas.

No diagrama da Fig.6, o pico correspondente ao TR de 15,99 refere-se ao AlaGlu-FCI-1. O pico correspondente ao TR de 15,21 representa uma forma desorganizada da molécula de AlaGlu-FCI-1 que possui um valor de M^r de 7845 u.m.a..


A renaturação de AlaGlu-FCI-1 desnaturada foi também efectuada de acordo com os três procedimentos que se seguem:

1) diluição da amostra desnaturada, 2mg/ml em 50 mM de Tris, 2 mM de EDTA, pH 9,0 e etanol a 25% até se atingir uma concentração final de 0,2 mg/ml (ensaio BioRad) e deixando prosseguir a reacção durante 18 horas a 4°C.

2) dessalinização da amostra desnaturada numa coluna "NAP 5" (Pharmacia -LKB) em 50 mM de Tris, 1 mM de cisteína, 2 mM de EDTA, pH 9,0, etanol a 25%. O volume da solução era de 1,00 ml. A concentração de proteínas era de 0,3 mg/ml (ensaio BioRad) e deixou-se prosseguir a reacção durante 18 horas a 4°C.

3) diálise da amostra desnaturada (Spectapor, valor de transição: 3,5 KD) em presença de 50 mM de Tris, 1 mM de cisteína, 2 mM de EDTA, pH 9,0, etanol a 25%, a 4°C, durante 18 horas. A concentração inicial de proteínas era de 0,3 mg/ml.

Em cada um dos ensaios, acidificou-se 200 μ l da solução resultante com 30 μ l de ácido acético 5M e filtraram-



-se 200 μ l da referida solução num filtro "Millex" de 0,22 μ m e, submeteu-se a análise por CLEP-FI numa coluna "Nucleosil C4", de 5 μ e 4,6 X 260 mm, Machery-Nagel 720059, tampão A: ácido trifluoroacético (TFA), tampão B: TFA a 0,1% e acetonitrilo a 80% utilizando um gradiente isocrático durante 0 - 5 minutos para o tampão B a 30% e um gradiente linear entre 5 e 25 minutos para o tampão B variando entre 30-75% e um débito de 1,0 ml/minuto; detecção a 215 nm à temperatura ambiente.

Referência às Figuras 7-9

No diagrama da Figura 7, o pico correspondente ao TR de 16,07 minutos representa AlaGlu-FCI-1. O pico correspondente ao TR de 15,1 minutos representa uma forma desorganizada de AlaGlu-FCI-1 que possui um valor de M^r de 7845 u.m.a. Os picos que surgem imediatamente após AlaGlu-FCI-1 representam provavelmente formas desorganizadas da molécula.

No diagrama da Figura 8, o pico correspondente ao TR de 16,07 minutos representa AlaGlu-FCI-1. O pico correspondente ao TR de 15,10 minutos representa uma forma desorganizada com um valor de M^r de 7845 u.m.a.. Os picos que surgem imediatamente após AlaGlu-FCI-1 representam provavelmente formas desorganizadas da molécula. Os picos que surgem depois dos 20,00 minutos representam, provavelmente formas irreversivelmente desorganizadas ou poliméricas

de AlaGlu-FCI-1.

No diagrama da Figura 9, o picocorrespondente ao TR de 16,21 minutos representa AlaGlu-FCI-1. O pico correspondente ao TR de 15,43 minutos representa uma forma desorganizada com uma M^r de 7845 u.m.a. . Os picos que surgem imediatamente após AlaGlu-FCI-1 representam, provavelmente, formas desorganizadas da molécula.

Exemplo 8

Permuta catiónica de Ala-Glu-FCI 1 renaturada

Equilibrou-se 70 ml de Sefarose (Pharmacia-LKB) em 25 mM de fosfato de sódio, 25 mM de citrato de sódio que se ajustou para pH 4,0 com NaOH ,dissolvidos em etanol a 25%.

Aplicou-se 2 litros da mistura de renaturação obtida, de acordo com a descrição efectuada no Exemplo 7, na coluna de Sefarose de tipo FF-S. Mexeu-se suavemente a suspensão, durante 10 minutos à temperatura ambiente e depois colocou-se o gel numa coluna (3,5 X20 cm²). Os tampões utilizados consistiam em:

Tampão A: 25 mM de fosfato de sódio, 25 mM de citrato de sódio, a pH 4,0, dissolvido em etanol a 25%.

Tampão B: 25 mM de fosfato de sódio, 25 mM de citrato de sódio, a pH 7,0 em etanol a 25% .

Os dois tampões foram ajustados mediante a utilização de NaOH 5M.

O débito foi de 0,15 ml/minuto, a detecção foi

efectuada a 280 nm e a temperatura foi de 4°C. Aplicou-se um gradiente de tampão B variando entre 0-100% durante 60 minutos.

Recolheram-se as fracções que continham AlaGlu-FCI-1 tendo sido efectuada a determinação das referidas fracções por absorção a 280 nm.

Exemplo 9

Conversão de AlaGlu-FCI-1 utilizando DAP-1

Dialisou-se a AlaGlu-FCI-1 obtida no Exemplo 8, em presença de 40 mM de citrato de sódio, 200 mM de NaCl, pH 4,0 (que se ajustou com NaOH 5 M) a 4°C durante 18 horas.

Fez-se subir a temperatura para 37°C e adicionaram-se 0,08 unidades de Catepsina C (3.4.14.1. Boehringer Mannheim) por miligrama de proteína.

Decorridos 10 minutos aplicou-se a mistura de reacção numa coluna para análise por CLEP-FI.

Para pôr termo à reacção e para purificação do material obtido, aplicou-se a mistura numa coluna para CLEP-FI (Novo Nordisk A/S RP18, 15µ, 10 X 250 mm) em 100 mM de tampão fosfato de sódio a pH 3,0 e eluiu-se com um gradiente de de etanol variando entre 30 e 50% durante um período de tempo compreendido entre 30 e 60 minutos. O débito foi de 0,75 ml/minuto a 280 nm à temperatura ambiente.

Recolheram-se as fracções que incorporavam FCI, fraccões essas que se determinaram por absorção a 280 nm.

Exemplo 10

Permuta Catiónica do FCI-1

Aplicou-se numa coluna de Sefarose de tipo FF-Q^R HR/10/10 de "Pharmacia -LKB", as fracções recolhidas que incorporavam FCI-1 e que se obtiveram da purificação por CLEP-FI tal como descrito no Exemplo 9.

Os tampões utilizados consistiam em:

Tampão A: 25 mM de fosfato de sódio, 25 mM de citrato de sódio, a pH 4,0, em etanol a 25%.

Tampão B: 25 mM de fosfato de sódio, 25 mM de citrato de sódio, a pH 7,0, em etanol a 25%.

Ajustaram-se os dois tampões com NaOH 5M.

O débito foi de 0,15 ml/minuto, a detecção efectuou-se a 280 nm, a temperatura foi de 4°C.

Utilizou-se um gradiente linear de tampão B variando entre 0-100% durante 100 minutos.


Recolheram-se as fracções que continham o FCI-1, determinação esta que foi efectuada por absorção a 280 nm.

Exemplo 11

Diálise e filtração em gel do FCI-1

Dialisaram-se as fracções do FCI-1 obtidas no Exemplo 10 (Spectrapor, valor de transição de 3,5 KD) em presença de ácido acético 0,1 M a 4°C durante 18 horas e depois liofilizaram-se.

Dissolveu-se o pó liofilizado em ureia 7 M para se



obter uma concentração de 5 mg/ml e aplicou-se numa coluna "Sefadex" G50F (0,9 X 60 cm, Pharmacia-LKB) em ácido acético 0,4 M. O débito foi de 0,2 ml/minuto, a detecção efectuou-se a 280 nm e a temperatura foi de 4°C.

Recolheram-se as fracções que continham o FCI-1, determinação esta que foi efectuada por absorção a 280 nm.

Pode liofilizar-se a solução obtida utilizando agentes de liofilização convencionais de modo a formar um pó liofilizado e estável. Pode utilizar-se o referido pó na preparação de composições farmacêuticas de acordo com os procedimentos conhecidos para a formulação de preparações farmacêuticas que incorporem o FCI-1.

1
K

REIVINDICAÇÕES

1.- Factor de crescimento semelhante a insulina humano (IGF-1), caracterizado pelo facto de conter a extensão AlaGlu no terminal amino.

2.- Sequência de ADN, caracterizada pelo facto de codificar para IGF-1 contendo a extensão AlaGlu no terminal amino.

3.- Vector recombinante, caracterizado pelo facto de conter ADN que codifica para IGF-1 humano contendo a extensão AlaGlu no terminal amino.

...

4.- Vector de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de conter o promotor λ PR sensível à temperatura directamente ligado ao ADN que codifica para a sequência AlaGlu-IGF-1 e para a sequência sinal OmpA.

5.- Microrganismo transformado, caracterizado pelo facto de comportar um vector que contém ADN que codifica para IGF-1 humano contendo a extensão AlaGlu no terminal amino.

6.- Microrganismo transformado de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de ser E. coli.

7.- Método para a renaturação de AlaGlu-IGF-1, caracterizado pelo facto de se "dobrar" uma forma desnaturada e reduzida de AlaGlu-IGF-1 durante a modificação do potencial redox de :40 mV para um valor compreendido entre +20 e +40 mV, por diálise contra um tampão contendo entre 20-40% V/V de etanol, durante um intervalo de tempo de até 5 horas, com uma concentração de proteína compreendida entre 0,1 e 0,6 mg/ml e uma condutividade compreendida entre 0,15 e 0,3 mS à temperatura ambiente, a um pH compreendido entre 7,5 e 10 e, finalmente, de se acidificar a mistura para um valor de pH inferior a 5.

8.- Método para a produção de IGF-1 humano, caracterizado pelo facto:

i) de se exprimir um terminal amino de IGF-1 com extensão em um microrganismo transformado com um vector de expressão contendo um promotor induzível ligado directamente ao ADN que codifica para IGF-1 humano comportando uma extensão no terminal amino e uma sequência de sinal que proporciona a secreção do produto expresso;

ii) de se extrair IGF-1 de terminal amino prolongado a $\text{pH} > 6,0$ mediante a utilização de ureia na presença de um agente de redução e, eventualmente, um agente quelante;

iii) de se submeter o extracto a uma cromatografia sobre gel de permuta aniônica, escolhido entre DEAE, DE e FF-Q, utilizando o tampão como descrito na fase ii) ajustado para 1,8-2,2 mS e pH de 7,8-8,2;

iv) de se renaturar o IGF-1 de terminal amino prolongado isolado por alteração do potencial redox da mistura reacional linearmente de -40 mV para +20-40 mV, por diálise contra um tampão contendo etanol em uma concentração compreendida entre 20 e 40% V/V, durante um intervalo de tempo de até 5 horas, com uma concentração de proteína compreendida entre 0,1 e 0,6mg/ml e uma condutividade compreendida entre 0,15 e 0,3 mS à temperatura ambiente e a um pH compreendido entre 7,5 e 10,0 e, finalmente, de se acidificar a mistura para um pH inferior a 5;

v) de se separar a extensão do terminal amino usando-se DAPI (EC 3,4,14,1);

vi) de se isolar IGF-1 autêntico renaturado do

IGF-1 de terminal amino prolongado por meio de HPLC de fase inversa e cromatografia de permuta catiónica; e

vii) de se filtrar sobre gel e liofilizar o IGF-1 humano, isolado.

9.- Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de o microrganismo ser E. coli.

10.- Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de se utilizar um promotor sensível à temperatura, tal como λ PR, λ PL ou λ PR e de a sequência de sinal ser LamB, OmpA ou OmpF.

11.- Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo facto de o promotor ser λ PR e de a sequência de sinal ser a sequência OmpA.

12.- Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de se realizar a extracção de AlaGlu-IGF-1 na fase II utilizando-se um tampão com uma concentração em ureia maior do que 4M.

13.- Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de se realizar a extracção de AlaGlu-IGF-1 na fase ii) usando um tampão de ureia 7M, 50mM Cys e pH8,0.

14.- Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de se realizar a cromatografia do extracto proveniente da fase iii) para valores da condutividade de 2,0 mS a pH 8,0.

15.- Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de se realizar a cromatografia do extracto proveniente da fase iii) como cromatografia descontínua (uma só quantidade) em DE e de se repetir em FF-Q.

16.- Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de se realizar a renaturação de AlaGlu-IGF-1 na fase iv) com uma condutividade de 0,2 mS.

17.- Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de se realizar a renaturação na fase iv) alterando-se o potencial redox linearmente de cerca de -40 mV até um valor compreendido entre +25 e + 30 mV, durante 3 horas.

18.- Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de se realizar a renaturação da fase iv) com uma condutividade de 0,2 mS, uma concentração de proteínas de 0,2 mg/ml e um pH compreendido entre 8,5 e 9,5, especialmente entre 8,5 e 9,0.

19.- Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de se realizar a renaturação da fase iv) a uma temperatura compreendida entre 20 e 22°C.

20.- Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de se realizar a renaturação da fase iv) fazendo passar AlaGlu-IGF-1 através de um dispositivo de fibra óca com um débito compreendido entre 25 e 250 ml/minuto, de preferência igual a cerca de 100 ml/minuto.

21.- Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de se realizar a acidificação na fase iv) mediante adição de ácido acético 5M.

22.- Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de se realizar a separação na fase v) utilizando DAP-I, em uma concentração de 0,08 unidades de DAP-I por mg de proteína, na presença de cloreto de sódio e ajustando a concentração de proteína para aproximadamente 1 mg/ml, em um tampão de acetato 40mM a pH 4,0 e à temperatura de 37°C.

23.- Processo para a preparação de IGF-1 maduro, caracterizado pelo facto de se utilizar IGF-1 com a extensão AlaGlu no terminal amino.

○ Agente Oficial da Propriedade Industrial

