

A. N. n.º 89.438

5

F. HOFFMANN-LA ROCHE & Cie. SOCIÉTÉ ANONYME

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE POLIPÉPTIDOS
DE
INTERLEUQUINA-1 α HUMANA RECOMBINANTE"

Conhecem-se duas formas de interleuquina-1, as chamadas formas α e β [March et al., Nature, 315, 641-647 (1985)]. A análise da sequência de nucleótidos do ADN que codifica a interleuquina-1 α humana (hIL-1 α) revelou uma longa sequência de transcrição, aberta, de 271 aminoácidos que corresponde a um polipeptido precursor hIL-1 α , que possui um peso molecular de 30 606 Daltons. Na Fig. 1a/1b apresenta-se a sequência de nucleótidos e a sequência de aminoácidos do polipeptido precursor hIL-1 α , conforme determinado por Gubler et al., J. Immunol. 136, 2492-2497 (1986).

Na publicação do pedido de patente de invenção europeia N.º 188 864, descreve-se que a porção C-terminal do polipeptido precursor hIL-1 α , que se estende desde a Ser, na posição 113, até à Ala, na posição 271 (Fig. 1a/1b) é biologicamente activo. Na publicação do pedido de patente de invenção europeia N.º 188 920 descreve-se que o polipeptido precursor hIL-1 α , que difere, na sequência de aminoácidos, da sequência de aminoácidos apresentada na Fig. 1a/1b, por possuir uma Ser na posição 114, em vez de uma Ala, sendo esta Ser, codificada pelo codão TCA. Para além disto, o pedido de patente de invenção europeia N.º 188 920 descreve a preparação de diversos po-

4

lipeptidos hIL-1 α , nomeadamente, os polipeptidos hIL-1 α que possuem uma sequência de aminoácidos que se prolonga desde as posições 63 a 271, 113 a 271, 115 a 271, 123 a 271, 127 a 271, 128 a 271, 129 a 271, 113 a 267, 113 a 264, 113 a 266, 113 a 265 e 128 a 267, da sequência de aminoácidos apresentada na Fig. 1a/1b, mas, em que, conforme anteriormente mencionado, o resíduo alanina, na posição 114, quando presente, é substituído por um resíduo serina. A publicação do pedido de patente de invenção europeia Nº 200 986 descreve a preparação de um polipeptido hIL-1 α recombinante, que possui uma sequência de aminoácidos que se estende da posição 118 a 271 e que possui um resíduo metionina na posição 117, sendo esta metionina derivado do codão ATG que se utiliza para expressar um fragmento de ADN que codifica a sequência de aminoácidos desde a posição 118 até à 271. Uma vez que o polipeptido natural hIL-1 α possui um resíduo serina na posição 117 o polipeptido recombinante hIL-1 α preparado conforme descrito na publicação do pedido de patente de invenção europeia Nº 200 986, difere na extremidade N de um polipeptido hIL-1 α natural correspondente, isolado a partir de um fluido do corpo humano ou a partir de um sobrenadante de células humanas em cultura. A presença de um N-terminal modificado nos polipeptidos hIL-1 α recombinantes possibilita o aumento dos efeitos secundários num paciente tratado com o referido polipeptido recombinante. No sentido de se evitarem esses efeitos secundários, procuraram-se vias e meios para se obterem métodos para a preparação de polipeptidos hIL-1 α maduros recombinantes, que possuem uma sequência de aminoácidos idêntica à sequência de aminoácidos do

hIL-1 α maduro, natural. Descobriu-se, de modo surpreendente, que o polipeptido hIL-1 α maduro recombinante, que possui a sequência de aminoácidos

Ser Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe MET Arg Ile Ile Lys Tyr
Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile Ile Arg Ala Asn
Asp Gln Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu Asp Glu Ala Val
Lys Phe Asp MET Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp Asp Ala Lys Ile
Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr Val Thr Ala Gln
Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu MET Pro Glu Ile Pro Lys
Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp Glu Thr His
Gly Thr Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro Asn Leu Phe Ile
Ala Thr Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly Gly Pro Pro Ser
Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala (I)

sequência de aminoácidos essa que corresponde à sequência de aminoácidos que se estende da posição 117 à 271 da sequência de aminoácidos apresentada na Fig. 1a/1b e que o polipeptido maduro recombinante, hIL-1 α , que possui a sequência de aminoácidos

Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe MET Arg Ile Ile Lys Tyr Glu Phe Ile
Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile Ile Arg Ala Asn Asp Gln Tyr
Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu Asp Glu Ala Val Lys Phe Asp
MET Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp Asp Ala Lys Ile Thr Val Ile
Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr Val Thr Ala Gln Asp Glu Asp
Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu MET Pro Glu Ile Pro Lys Thr Ile Thr
Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp Glu Thr His Gly Thr Lys
Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys
Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly Gly Pro Pro Ser Ile Thr Asp
Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala (II)

sequência de aminoácidos essa que corresponde à sequência de aminoácidos que se estende da posição 120 à 271 da sequência de aminoácidos apresentada na Fig. 1a/1b, podem ser produzidos num organismo unicelular sem o resíduo metionina N-terminal.

Deste modo, a presente invenção, proporciona polipeptido

peptidos homogêneos de interleuquina-1 α humana recombinante, possuindo a sequência de aminoácidos (I) ou (II), os ADN's que codificam os referidos polipeptidos, vectores recombinantes que contêm ADN que codifica para os referidos polipeptidos e organismos unicelulares contendo um vector recombinante tal que o organismo unicelular seja capaz de expressar a referida sequência de ADN. Para além disso, a presente invenção refere-se a um processo para a produção dos referidos polipeptidos de interleuquina-1 α , a composições farmacêuticas que compreendam o referido polipeptido e a utilização dos referidos polipeptidos ou composições farmacêuticas para estimular o sistema imunológico de um hospedeiro, para a promoção da cicatrização de um ferimento ou para proporcionar a recuperação de doentes em estado crítico com desnutrição proteica.

É possível produzir os polipeptidos da presente invenção pelos métodos convencionais de síntese peptídica, em fase líquida ou, de preferência, em fase sólida, tal como os métodos de Merrifield [J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963)] ou por métodos equivalentes da especialidade.

Em alternativa, e de preferência, os polipeptidos da presente invenção produzem-se mediante métodos da tecnologia do ADN recombinante. Para isso, efectua-se a cultura de um organismo unicelular contendo o vector recombinante que contém a sequência de ADN que codifica para um polipeptido maduro de interleuquina-1 α humana, da presente invenção, sob condições adequadas para a expressão da referida sequência de ADN e, isola-se da cultura o polipeptido de interleuquina-1 α humana produzido pelo organismo unicelular.

O organismo unicelular pode ser uma célula procariótica ou eucariótica. Encontra-se disponível comercialmente ou sob a forma livre, um grande número de organismos unicelulares, em depósitos, tais como o American Type Culture Collection (ATCC) localizado em 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, USA. Exemplos de células procarióticas são as bactérias tais como a E. coli [por exemplo, a E. coli M15 descrita como DZ291 por Villarejo et al. in J. Bacteriol. 120, 466-474 (1974), a E. coli 294 (ATCC Nº 31446), a E. coli RR1 (ATCC Nº 31343) ou a E. coli W3110 (ATCC Nº 27325)], bacilos como o B. subtilis e a enterobacteriaceae entre os quais se podem mencionar exemplos como a Salmonella typhimurium e a Serratia marcescens. Dá-se especial preferência à estirpe MC1061 da E. coli que contém o plasmídeo pRK248cIts (ver Exemplo). Como alternativa, podem utilizar-se as células de levedura tais como a Saccharomyces cerevisiae, como organismos hospedeiros. É do conhecimento do especialista um elevado número de células eucarióticas adequadas para organismos hospedeiros de vectores recombinantes. Utilizam-se, de preferência, células de mamíferos tais como CV-1 (ATCC Nº CCL 70) e seus derivados tais como COS-1 (ATCC Nº CRL 1650) ou COS-7 (ATCC Nº CRL 1651). Além disso, é possível utilizarem-se células de insectos tais como as descritas por Smith et al. [Mol. Cell. Biol. 2, 2156-2165 (1983)].

Conhecem-se diversos métodos para se introduzir os vectores recombinantes dentro dos organismos unicelulares. São exemplos de tais métodos a micro-injecção, a transfecção e a transdução. O especialista na matéria não terá dificuldade em

seleccionar o método mais adequado para o organismo hospedeiro específico, utilizado.

Os vectores recombinantes utilizados na presente invenção são vectores que contêm um ADN que codifica para o polipeptido hIL-1 α da presente invenção, tal como ADNs que possuam a sequência de nucleótidos da posição 385 até à posição 852 ou da posição 394 à posição 852 da sequência de nucleótidos representada na Fig. 1a/1b. Pode sintetizar-se este ADN por métodos químicos convencionais, por exemplo, pelo método do fosfotriéster descrito por Narang et al., in Meth. Enzymol. 68, 90-108 (1979), ou pelo método do fosfodiéster [Brown et al., Meth. Enzymol. 68, 109-151 (1979)]. Em ambos os métodos sintetizam-se em primeiro lugar longos oligonucleótidos e, depois juntam-se de um modo previamente determinado. A sequência de nucleótidos do ADN pode ser idêntica às sequências do nucleótidos, anteriormente mencionadas, ou podem ser parcial ou completamente diferentes. Isto deve-se ao facto de o código genético ter degenerado o que significa que um aminoácido pode ser codificado por diversos codões. Podem adaptar-se os codões seleccionados ao uso preferido do codão do organismo hospedeiro que se utilizou para expressar o polipeptido hIL-1 α [Grosjean et al., Gene 18, 199-209 (1982)]. Deve ter-se cuidado para que o ADN obtido por esta via não contenha sequências parciais que tornam difícil a construção do vector recombinante, por exemplo, introduzindo um local de clivagem por enzimas de restrição indesejável, ou evitando a expressão do polipeptido.

Também se pode preparar o ADN que codifica para o po

lipeptido hIL-1 α , da presente invenção, isolando um ADN que codifique para o polipeptido precursor de hIL-1 α proveniente de uma biblioteca de cADN humano ou de uma biblioteca genômica humana de acordos com procedimentos conhecidos na especialidade (por exemplo, March et al., supra; Gubler et al., supra) e, depois, contando o ADN com o tamanho e a sequência de nucleôtidos desejados utilizando endonucleases de restrição e, possívelmente, pequenos oligonucleótidos de síntese, de acordo com métodos bem conhecidos na especialidade da tecnologia do ADN recombinantes.

Pode utilizar-se para a construção dos vectores recombinantes, mencionados antes, um grande número de vectores tais como os referidos na publicação do pedido de patente de invenção europeia Nº 200 986. Estes vectores contêm elementos necessários para a transcrição e tradução do ADN que codifica para o polipeptido hIL-1 α , bem como elementos necessários para a manutenção e replicação do vector no hospedeiro. A selecção de um vector adequado para a construção dos vectores recombinantes da presente invenção e a selecção de um organismo hospedeiro unicelular compatível com os referidos vectores recombinantes são conhecidas pelos especialistas na matéria.

De modo alternativo e preferencial, os vectores recombinantes da presente invenção, preparam-se modificando vectores recombinantes que contêm um ADN que codifica para um polipeptido hIL-1 α utilizando o método da mutagénese específica de um local dirigida por um oligonucleótido; descrito por Moririnaga et al., BIO/TECHNOLOGY 2, 636-639 (1984). Um exemplo de um vector recombinante contendo um vector e um ADN que codifici

ca para um polipeptido hIL-1~~6~~ é o plasmideo phil #1-154*. Na publicação do pedido de patente de invenção europeia N° 200 986, descreve-se a construção deste plasmideo.

O modo de efectuar a expressão dos polipeptidos, de acordo com a presente invenção, depende do vector de expressão e do organismo hospedeiro utilizado. Habitualmente, desenvolvem-se os organismos hospedeiros que contêm o vector de expressão, sob condições óptimas para o desenvolvimento do organismo hospedeiro. Próximo do fim do desenvolvimento exponencial, quando o aumento do número de células por unidade de tempo diminui, induz-se a expressão do polipeptido da presente invenção, isto é, efectua-se a transcrição do ADN que codifica para o polipeptido e traduz-se o mRNA transcrito. Pode efectuar-se a indução pela adição de um indutor ou de um desrepressor ao meio de desenvolvimento ou alternando um parâmetro físico, por exemplo, alternando a temperatura.

O polipeptido produzido nos organismos hospedeiros pode ser segregado pela célula por mecanismos especiais de transporte ou pode isolar-se por ruptura da célula. Pode romper-se a célula por meios mecânicos [Charm et al., Meth. Enzymol. 22, 476-556 (1971)], enzimáticos (tratamento com lisozi-
ma) ou químicos (tratamento com detergentes, tratamento com ureia ou guanidina HCL, etc.) ou pela combinação dos referidos meios.

Nos eucariotas, os polipeptidos segregados pela célula, sintetizam-se sob a forma de uma molécula precursora. O polipeptido maduro resulta da clivagem dos chamados peptidos de sinal. Como os organismos hospedeiros procariotas não são

capazes de clivar os peptidos de sinal eucarióticos a partir de moléculas precursoras, os polipeptidos eucarióticos devem expressar-se directamente na sua forma madura nos organismos hospedeiros procarióticos. O sinal AUG de início de tradução, que corresponde ao codão ATG ao nível do ADN, faz com que todos os polipeptidos sejam sintetizados num organismo hospedeiro procariótico com um resíduo de metionina N-terminal. Em determinados casos, dependendo do sistema de expressão utilizado e dependendo, possivelmente, do polipeptido que se pretende expressar, cliva-se este resíduo de metionina N-terminal.

Os polipeptidos, de acordo com a presente invenção, podem ser purificados até à homogeneidade por métodos bem conhecidos, tais como, por exemplo, por centrifugação a velocidades diferentes, por precipitação com sulfato de amónio, por diálise (sob pressão normal ou sob pressão reduzida), por focagem isoeléctrica preparativa, electroforese sobre gel preparativa ou mediante diversos métodos de cromatografia, tais como filtração em gel, cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), cromatografia de permuta iónica, cromatografia de fase inversa e cromatografia de afinidade (por exemplo em "SepharoseTM Blue CL-6B ou sobre anticorpos monoclonais ligados a um veículo, dirigidos contra um polipeptido hIL-1 α).

Podem utilizar-se os polipeptidos hIL-1 α recombinantes purificados, da presente invenção, num procedimento conhecido, para estimular o sistema imunológico de um hospedeiro, tal como, por exemplo, melhorando a resposta de defesa do hospedeiro aos agentes patogénicos, actuando como adjuvante de uma vacina ou intensificando a defesa do hospedeiro contra do

4.

enças neoplásicas. Outros usos clínicos que se identificaram, na especialidade, para hIL-1 α incluem a contribuição para cicatrização de ferimentos através da estimulação da proliferação dos fibroblastos e melhoramento na recuperação de pacientes em estado crítico de desnutrição proteica.

Os polipeptidos homogêneos hIL-1 α , preparados de acordo com a presente invenção podem administrar-se aos mamíferos de sangue quente para os usos clínicos, mencionados antes. A administração pode ser efectuada segundo qualquer método convencional, como a aplicação parentérica, intravenosa, subcutânea ou intramuscular. É obvio que a dose necessária varia consoante a situação particular que se pretende tratar, a gravidade da situação, a duração do tratamento e o método de administração. Pode obter-se uma forma adequada de dosagem para uso terapêutico a partir do polipeptido hIL-1 α filtrado de modo estéril e liofilizado, que se reconstitui antes de se utilizar segundo um método convencional. Também é da competência do especialista na matéria preparar composições farmacêuticas contendo a interleuquina-1 α humana homogênea, da presente invenção, misturando a referida interleuquina-1 α com veículos compatíveis, farmacêuticamente aceitáveis tais como tampões, estabilizadores, bacteriostatos e outros excipientes e aditivos convencionalmente utilizados em formas de dosagem farmacêuticas para administração por via parentérica.

EXEMPLO

O método da mutagênese especifica de um local dirigida por um oligonucleótido, descrito por Morinaga et al., BIO/

/TECHNOLOGY 2, 636-639 (1984) foi utilizado para se efectuar a mutação do plasmídeo phil #1-154* (publicação do pedido de patente de invenção europeia Nº 200 986) para se produzirem genes que codifiquem os polipeptidos hIL-1 α , possuindo uma sequência aminoácida que se estende da posição 117 à 271, da 119 à 271 e da 120 à 271 da Fig. 1a/1b. Para se levarem a efeito estes procedimentos, produziram-se oligonucleótidos sintéticos, possuindo as sequências nucleotídicas

GGA ATT AAT ATG AGC TTC CTG AGC (O. 117),

GGA ATT AAT ATG CTG AGC AAT GTG (O. 119) e

GGA ATT AAT ATG AGC AAT GTG AAA (O. 120)

de acordo com o método de suporte sólido de fosforamidite de Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 103, 3185-3191 (1981).

Converteu-se o plasmídeo phil #1-154* na sua forma de cadeia aberta, utilizando BglIII e SalI e na forma linearizada, utilizando PstI. Criaram-se cordões duplos heterólogos, abertos. Em três reacções, efectuadas separadamente, complementarizaram-se os oligonucleótidos descritos antes, converteram-se em uma forma de cordão duplo e ligaram-se e transformaram-se na estirpe MC1061 da E. coli K-12 [Casadaban et al., J. Mol. Biol. 138, 179-207 (1980)] contendo o plasmídeo pRK248cIts [Bernard et al., Meth. Enzym. 68, 482-492 (1979)] utilizando o método do CaCl₂ [Maniatis et al., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, pp. 250-251, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)]. A E. coli MC1061 e o plasmídeo pRK248cIts encontram-se disponíveis na American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, USA sob os números

4.

de depósito ATCC Nº 53338 e ATCC Nº 33766, respectivamente.

Identificaram-se as colônias que continham a mutação desejada, por hibridação conforme descrito por Maniatis et al., (supra, pp. 312-315). Utilizaram-se os mesmos oligonucleótidos utilizados para a mutagênese dirigida por um precursor como sondas para as hibridações, após marcação da extremidade 5' com γ -³²P-ATP utilizando polinucleótido-quinase, de acordo com o procedimento de Maniatis et al., supra, p. 396.

Os oligonucleótidos (0. 117) dirigiu a conversão de phil # 1-154* em pHuIL-1 α (117-271) com a seguinte modificação da sequência:

	Código para os amino- ácidos adicionais			
phil # 1-154*	ATGAATAGAAATTCGGATCCGC	118	119	120 121
Met		TTC	CTG	AGC AAT
		Phe	Leu	Ser Asn
pHuIL-1 α (117-271)	GGAATTAATATG	117	118	119 120
	Met	AGC	TTC	CTG AGC
		Ser	Phe	Leu Ser

De modo idêntico, o oligonucleótido (0. 119) deu origem a pHuIL-1 α (119-271) com a sequência seguinte:

	119 120 121 122
GGAATTAATATG	CTG AGC AAT GTG
Met	Leu Ser Asn Val;

e o oligonucleótido (0. 120) produziu pHuIL-1 α (120-271) com a seguinte sequência:

120 121 122 123
GGAATTAATATG AGC AAT GTG AAA
Met Ser Asn Val Lys.

A análise da sequência do ADN confirmou as mutações anteriores.

Desenvolveu-se, a MC1061 de E. coli/pRK248cIts contendo ϕ 1-154 [ver a publicação do pedido de patente de invenção europeia Nº 200 986, capaz de expressar hIL-1 α (118-271)], pHuIL-1 α (117-271), pHuIL-1 α (119-271) e pHuIL-1 α (120-271) em meio M9 (Maniatis et al., supra, pp. 68-69) contendo ampicilina a 30^o C até que a absorvência a 550 nm (A_{550}) atingisse 0,7, altura em que se submeteram as culturas à temperatura de 42^o C durante 3 horas. Recolheram-se por centrifugação as células bacterianas de 1 ml de cultura e solubilizaram-se em 50 μ l de guanidina-HCL 7M. Ensaíaram-se os extractos bacterianos brutos quanto à bioactividade da interleuquina-1 utilizando o ensaio de proliferação de timócitos de murino, de Mizel et al., J. Immunol. 120, 1497-1508 (1978). Os quatro extractos demonstraram ser activos.

Isolaram-se a partir das quatro culturas induzidas, partículas insolúveis de inclusão citoplasmática, purificaram-se, conforme se descreveu antes, solubilizaram-se e submeteram-se a electroforese SDS sobre gel de poliacrilamida [Laemmli, Nature 227, 680-685, (1970)]. Eluiu-se, a partir de cada gel, a faixa principal de interleuquina-1 α , de acordo com o método de Aebersold et al., J. Biol. Chem. 261, 4229-4238 (1986) e submeteu-se a análise da sequência de aminoácidos N-terminal, segundo o método de Hewick et al., J. Biol. Chem. 256, 7990-

-7997 (1981), com os seguintes resultados, após 10 ciclos:

hIL-1 α (117-271):

Ser Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe

hIL-1 α (118-271):

Met Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe

hIL-1 α (119-271):

Met Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met

hIL-1 α (120-271):

Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met Arg Ile

Pode observar-se facilmente que se clivou a metioni-
na inicial a partir de hIL-1 α (117-271) e de hIL-1 α (120-271)
mas não a partir de hIL-1 α (119-271) ou de hIL-1 α (118-271).

Para melhor se investigarem os polipeptidos hIL-1 α ,
hIL-1 α (117-271), hIL-1 α (118-271) e hIL-1 α (120-271), efectu-
ou-se, conforme a seguir se descreve, a purificação das frac-
ções sobrenadantes dos lisados dos transformantes MC1061/
/pRK248cIts que albergam pHuIL-1 α (117-271), pHIL 1-154 e
pHuIL-1 α (120-271):

1. Ajustaram-se para pH 1,8 com ácido sulfúrico e mantiveram-
-se à temperatura ambiente durante 30 minutos a 1 hora, as
culturas que continham 5 Kg de cada transformante e recu-
peraram-se por centrifugação as células mortas pelo ácido.
2. Fez-se uma suspensão das células mortas por ácido em 18 li-
tros de água e agitou-se durante 1 hora à temperatura am-
biente com um agitador mecânico de palhetas.
3. Filtrou-se o material em suspensão através de duas secções
de camada dupla de tecido leve de algodão de malha aperta-

da, para remover os detritos celulares

4. Passou-se duas vezes o material filtrado, através de um homogeneizador celular Manton-Gaulin [Meth. Enzymol. 22, 482-484 (1971)] a funcionar a 8000 psi (aproximadamente $5,5 \times 10^7$ Pa) em primeiro lugar a 15° C e, depois a cerca de 30° C.
5. Centrifugou-se o material numa centrifugadora Sorval (Du Pont, Wilmington, Delaware, USA) a 4° C, durante 1 hora a 8000 rpm, utilizando um rotor GS-3 (Du Pont). Recuperaram-se cerca de 16,6 litros de fluido sobrenadante e, pôs-se de parte o agregado.
6. Filtrou-se o fluido sobrenadante através de um filtro Sartorius de 0,8/0,2 micron (encontra-se disponível nos Sartorius Filters Inc., Hayward, California, USA ou nos Sartorius -Membranfilter GmbH, D-3400 Göttingen), após o que se ajustou o pH para 3,0 com uma solução de hidróxido de sódio a 50% (V/V).
7. Aplicou-se o fluido sobrenadante a uma coluna de sílica P-SP NuGel de 10 x 40 cm (um permutador catiónico de sulfopropilo; 40-60 micron, 200 Angstrom; Separation Industries, Metuchen, New Jersey, USA) que havia sido equilibrada com ácido acético 0,02 M. Após a aplicação da amostra, lavou-se a coluna com 31 litros de ácido acético 0,02 M e, depois, eluiu-se com Tris-HCL 30 mM a pH 8,0. Analisou-se espectrofotometricamente a 280 nm o efluente da coluna. Obtiveram-se, assim, dois picos de proteína. Um primeiro pico para o volume de 4,5 litros e um pico principal aos 7,5 litros.

8. Aplicou-se a fracção do pico principal do passo 7 a uma coluna de sílica P-DE NuGel de 10 x 40 cm (um permutador aniônico de dietilaminoetilo; 40-60 micron, 200 Angstrom; Separation Industries) que se havia equilibrado com Tris-HCL 30 mM, a pH 8,0. Lavou-se a coluna com 17 litros de Tris-HCL 30 mM e NaCl 0,075 M, a pH 8,0, e, depois, eluiu-se com 13 litros de Tris-HCL 30 mM e NaCl 0,25 M, a pH 8,0. Verificou-se a presença de proteínas no efluente pelo método espectrofotométrico a uma densidade óptica de 280 nm (O.D.₂₈₀). Obteve-se, deste modo, um pico de proteína de O.D.₂₈₀ contido num volume de 13 litros.
9. Diluiu-se, o material que se eluiu no passo 8, 4 vezes com ácido acético 3,7 mM, a pH 8,0 que se ajustou para pH 4,8 e se aplicou numa coluna P-SP HPLC NuGel de 5 x 250 cm (Separation Industries) a um caudal de 150 ml/minuto. Eluiu-se, depois, a coluna com um gradiente linear desde pH 4,8 (ácido acético 3,75 mM) a pH 6,8 (K₂HPO₄ 10 mM) durante um período de 120 minutos, a um caudal de 75 ml/minuto. Obteve-se, assim, um pico de O.D.₂₈₀ aos 9,3 litros.
10. Concentrou-se o material que se eluiu, a partir da coluna de HPLC para cerca de 225 ml num cartucho espiral Amicon (grau de admissão de peso molecular 1000, disponível na Amicon, Div. of W.R. Grace & Co., Danvers, Massachusetts, USA) e, aplicou-se, depois a duas colunas G-50 SephadexTM de 10 x 100 cm (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, New Jersey, USA) em série, equilibradas com K₂HPO₄ 50 mM e NaCl 0,1 M a pH 6,8. Obteve-se um pico de O.D.₂₈₀ para um volume de 800 ml, que se despirogenou num cartucho espiral

Amicon (grau de admissão de peso molecular 30 000). O produto final tinha um volume de cerca de 1,070 ml.

Salvo indicação em contrário, todos os passos de purificação descritos antes, efectuaram-se a 4° C, excepto para a coluna de HPCL onde decorreram à temperatura ambiente.

Submeteram-se as proteínas purificadas hIL-1 α (117-271), hIL-1 α (118-271) e hIL-1 α (120-271) a análise electroforética SDS sobre gel de poliacrilamida, conforme anteriormente descrito e, corou-se com azul de Coomassie. Verificou-se que se encontravam todas na forma homogênea.

Efectuaram-se ensaios de bioactividade nas proteínas purificadas utilizando o ensaio de proliferação de timócitos D10 de murino, de Kaye et al., J. Exp. Med. 158, 836-856 (1983), com os resultados que se apresentam no Quadro I.

Quadro I

Actividade dos Polipeptidos hIL-1 α

<u>Proteínas</u>	<u>hIL-1α solúvel num Homogenato Bruto ^a (mg/Kg)</u>	<u>Actividade Específica das Proteínas Purificadas (unidades/mg)</u>
hIL-1 α (117-271)	1800	2 x 10 ⁹
hIL-1 α (118-271)	600	2 x 10 ⁹
hIL-1 α (120-271)	600	2 x 10 ⁹

a - Calculou-se a quantidade de hIL-1 α solúvel num homogenato bruto, com base num ensaio imunológico, utilizando anticorpos específicos de hIL-1 α .

4.

Os dados do Quadro I (considerados em conjunto com os dados apresentados no Quadro I da publicação do pedido de patente de invenção europeia Nº 200 986) demonstram que o tamanho exacto da proteína hIL-1 α não é crítico, desde que se encontre presente na molécula a sequência carboxi-terminal mínima que se estende da posição 132 à 271 (Fig. 1a/1b). Todas as proteínas possuíam a mesma bioactividade específica. Os dados demonstram, também, que a presença ou ausência de uma metionina de iniciação N-terminal não afecta a actividade. O polipeptido hIL-1 α (118-271) que compreende uma metionina adicional na extremidade N mostrou-se tão activo quanto as outras proteínas, que não possuíam a referida metionina.

Os dados do Quadro I, também demonstraram, de modo surpreendente, que o nível de expressão da proteína solúvel hIL-1 α (117-271) era três vezes o nível de expressão das proteínas solúveis hIL-1 α (118-271) e hIL-1 α (120-271), embora os genes que codificam para as proteínas se encontrassem todos no mesmo vector e na mesma célula hospedeira, e de se terem cultivado e colhido as células do mesmo modo.

Compreender-se-á mais facilmente a presente invenção, por referência às Figuras 1a/1b em anexo, e que apresentam a sequência de nucleótidos e a sequência de aminoácidos prevista para o cADN da interleuquina-1 α humana.

Fig. 1a

1
CAT TTC ATT GGC GTT TGA GTC AGC AAA GAA GTC AAG ATG GCC AAA GTT CCA GAC
MET Ala Lys Val Pro Asp

ATG TTT GAA GAC CTG AAG AAC TGT TAC AGT GAA AAT GAA GAA GAC AGT TCC TCC
MET Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser Glu Asn Glu Glu Asp Ser Ser Ser
10 20

ATT GAT CAT CTG TCT CTG AAT CAG AAA TCC TTC TAT CAT GTA AGC TAT GGC CCA
Ile Asp His Leu Ser Leu Asn Gln Lys Ser Phe Tyr His Val Ser Tyr Gly Pro
30 40

CTC CAT GAA GGC TGC ATG GAT CAA TCT GTG TCT CTG AGT ATC TCT GAA ACC TCT
Leu His Glu Gly Cys MET Asp Gln Ser Val Ser Leu Ser Ile Ser Glu Thr Ser
50 60

AAA ACA TCC AAG CTT ACC TTC AAG GAG AGC ATG GTG GTA GTA GCA ACC AAC GGG
Lys Thr Ser Lys Leu Thr Phe Lys Glu Ser MET Val Val Val Ala Thr Asn Gly
70

AAG GTT CTG AAG AAG AGA CGG TTG AGT TTA AGC CAA TCC ATC ACT GAT GAT GAC
Lys Val Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Ser Gln Ser Ile Thr Asp Asp Asp
80 90

CTG GAG GCC ATC GCC AAT GAC TCA GAG GAA GAA ATC ATC AAG CCT AGG TCA GCA
Leu Glu Ala Ile Ala Asn Asp Ser Glu Glu Glu Ile Ile Lys Pro Arg Ser Ala
100 110

CCT TTT AGC TTC CTG AGC AAT GTG AAA TAC AAC TTT ATG AGG ATC ATC AAA TAC
Pro Phe Ser Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe MET Arg Ile Ile Lys Tyr
120 130

Fig. 1b

GAA TTC ATC CTG AAT GAC GCC CTC AAT CAA AGT ATA ATT CGA GCC AAT GAT CAG
Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile Ile Arg Ala Asn Asp Gln
140 150

TAC CTC ACG GCT GCT GCA TTA CAT AAT CTG GAT GAA GCA GTG AAA TTT GAC ATG
Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu Asp Glu Ala Val Lys Phe Asp MET
160

GGT GCT TAT AAG TCA TCA AAG GAT GAT GCT AAA ATT ACC GTG ATT CTA AGA ATC
Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp Asp Ala Lys Ile Thr Val Ile Leu Arg Ile
170 180

TCA AAA ACT CAA TTG TAT GTG ACT GCC CAA GAT GAA GAC CAA CCA GTG CTG CTG
Ser Lys Thr Gln Leu Tyr Val Thr Ala Gln Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu
190 200

AAG GAG ATG CCT GAG ATA CCC AAA ACC ATC ACA GGT AGT GAG ACC AAC CTC CTC
Lys Glu MET Pro Glu Ile Pro Lys Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu
210 220

TTC TTC TGG GAA ACT CAC GGC ACT AAG AAC TAT TTC ACA TCA GTT GCC CAT CCA
Phe Phe Trp Glu Thr His Gly Thr Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro
230 240

AAC TTG TTT ATT GCC ACA AAG CAA GAC TAC TGG GTG TGC TTG GCA GGG GGG CCA
Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly Gly Pro
250

CCC TCT ATC ACT GAC TTT CAG ATA CTG GAA AAC CAG GCG TAG GTC TGG AGT CTC
Pro Ser Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala
260 270



R e i v i n d i c a ç õ e s

1.- Processo para a preparação de um polipeptido de interleuquina-1~~α~~ humana recombinante homogêneo com a sequência de amônio-ácidos

```
Ser Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe MET Arg Ile Ile Lys Tyr
Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile Ile Arg Ala Asn
Asp Gln Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu Asp Glu Ala Val
Lys Phe Asp MET Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp Asp Ala Lys Ile
Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr Val Thr Ala Gln
Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu MET Pro Glu Ile Pro Lys
Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp Glu Thr His
Gly Thr Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro Asn Leu Phe Ile
Ala Thr Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly Gly Pro Pro Ser
Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala
```

ou

```
Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe MET Arg Ile Ile Lys Tyr Glu Phe Ile
Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile Ile Arg Ala Asn Asp Gln Tyr
Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu Asp Glu Ala Val Lys Phe Asp
MET Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp Asp Ala Lys Ile Thr Val Ile
Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr Val Thr Ala Gln Asp Glu Asp
Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu MET Pro Glu Ile Pro Lys Thr Ile Thr
Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp Glu Thr His Gly Thr Lys
Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys
Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly Gly Pro Pro Ser Ile Thr Asp
Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala
```

4.

caracterizado pelo facto:

- a) de se cultivar um organismo unicelular transformado com um vector recombinante contendo um DNA que codifica o referido polipeptido sob condições adequadas para a expressão do referido DNA; e
- b) de se isolar o polipeptido de interleuquina-1 α humana da cultura e de se purificar até à homogeneidade.

2.- Processo para a preparação de um polipeptido de interleuquina-1 α humana recombinante homogêneo de acordo com a reivindicação 1, com a sequência de amino-ácidos,

Ser Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe MET Arg Ile Ile Lys Tyr
 Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile Ile Arg Ala Asn
 Asp Gln Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu Asp Glu Ala Val
 Lys Phe Asp MET Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp Asp Ala Lys Ile
 Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr Val Thr Ala Gln
 Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu MET Pro Glu Ile Pro Lys
 Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp Glu Thr His
 Gly Thr Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro Asn Leu Phe Ile
 Ala Thr Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly Gly Pro Pro Ser
 Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala,

caracterizado pelo facto:

- a) de se cultivar um organismo unicelular transformado com um vector recombinante contendo um DNA que codifica o referido polipeptido sob condições adequadas para a expressão do referido DNA; e
- b) de se isolar o polipeptido de interleuquina-1 α humana da cultura e de se purificar até à homogeneidade.

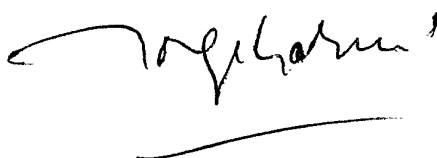
3.- Processo para a preparação de um organismo unicelular susceptível de expressar um polipeptido como definido na reivindi-

4.

cação 1 ou 2, caracterizado pelo facto de se transformar um organismo unicelular com um vector recombinante contendo um DNA que codifica o referido polipeptido.

4.- Processo para a preparação de uma composição farmacêutica contendo um polipeptido de interleuquina- 1α humana homogêneo tal como definido na reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo facto de se misturar o referido polipeptido de interleuquina- 1α com um veículo compatível farmacêuticamente aceitável,

Lisboa, 13 de Janeiro de 1989
O Agente Oficial da Propriedade Industrial



R E S U M O

"Processo para a preparação de polipeptidos de interleuquina-1 α humana recombinante"

A presente invenção proporciona polipeptidos de interleuquina-1 α humana recombinante homogêneos, sequências de DNA que codificam tais polipeptidos, vectores recombinantes que contêm as referidas sequências de DNA, organismos hospedeiros unicelulares contendo tais vectores recombinantes, e métodos para a preparação dos polipeptidos. Podem utilizar-se polipeptidos de interleuquina-1 α humana e composições farmacêuticas que os contêm, para a estimulação do sistema imunológico de um hospedeiro, para a promoção da cicatrização de feridas e para o melhoramento da recuperação de pacientes mal nutridos com proteínas, criticamente doentes.

O processo para a preparação dos referidos polipeptidos é caracterizado pelo facto:

- a) de se cultivar um organismo unicelular transformado com um vector recombinante contendo um DNA que codifica o referido polipeptido sob condições adequadas para a expressão do referido DNA; e
- b) de se isolar o polipeptido de interleuquina-1 α humana da cultura e de se purificar até à homogeneidade.

Lisboa, 13 de Janeiro de 1989
O Agente Oficial da Propriedade Industrial

