(19) INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 719328 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C12N015/12 A A61K048/00 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1994.05.09

(30) *Prioridade:* 1993.09.15 FR 9310971

(43) *Data de publicação do pedido:* 1996.07.03

(45) *Data e BPI da concessão:* 2000.10.11

(73) *Titular(es):*
AVENTIS PHARMA, S.A.
20 AVENUE RAYMOND ARON, 92160 ANTONY FR

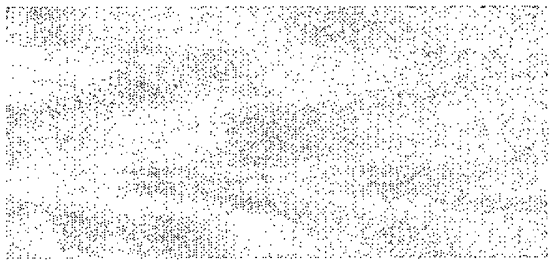
(72) *Inventor(es):*
FABIEN SCHWEIGHOFFER FR
BRUNO TOCQUE FR

(74) *Mandatário(s):*
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* GENE GRB3-3 SUAS VARIANTES E SUA UTILIZAÇÕES

(57) *Resumo:*

GENE GRB3-3 SUAS VARIANTES E SUAS UTILIZAÇÕES



DESCRIÇÃO

"Gene GRB3-3, suas variantes e suas utilizações"

A presente invenção refere-se a um novo gene, designado por Grb3-3, a suas variantes e suas utilizações, nomeadamente em terapia genética anti-cancerosa.

Diferentes genes, denominados oncogenes e genes supressores, estão implicados no controlo da divisão celular. De entre eles, os genes ras e os seus produtos designados de um modo geral por proteínas p21, desempenham um papel chave no controlo da proliferação celular em todos os organismos eucariotas onde foram pesquisadas. Em particular, mostrou-se que certas modificações específicas destas proteínas lhes fazem perder o seu controlo normal e os conduzem a tornar-se oncogénicos. Assim, um grande número de tumores humanos está associado à presença de genes ras modificados. Do mesmo modo, uma sobre-expressão destas proteínas p21 pode conduzir a um descontrolo da proliferação celular. A compreensão do papel exacto destas proteínas p21 nas células, do seu modo de funcionamento e das suas características constitui portanto um ganho principal para a compreensão e abordagem terapêutica da cancerogénese.

Foram identificados diferentes factores implicados na via de sinalização ras dependente. De entre eles figura o gene Grb2, que codifica para uma proteína de 23-25 kDa com uma estrutura SH3-SH2_SH3 (Lowenstein *et al.*, *Cell*, 70 (1992) 431; Matuoka *et al.*, *PNAS* 89 (1992) 9015). O produto do gene Grb2 parece interagir com as proteínas de tirosina fosforiladas, pelo seu domínio SH2, e com um factor de permuta do GDP da classe SOS, pelo seu domínio SH3 (Egan *et al.*, *Nature* 363 (1993) 45). Será assim um dos componentes da actividade transformante do produto do gene ras. A presente invenção resulta da identificação, da clonagem e da caracterização de uma isoforma do gene Grb2, designada Grb3-3, possuidora de uma deleção no domínio SH2. Este gene é expresso nos tecidos adultos: o ARNm correspondente está presente sob a forma de uma única banda de 1,5 kb, e é traduzido numa proteína de 19 kDa. Devido à sua deleção no domínio SH2, o produto do gene Grb3-3 deixa de ser capaz de interagir com as proteínas tirosina fosforiladas (receptor de EGF fosforilado), mas conserva a capacidade

de interagir com os domínios ricos em prolina das proteínas SOS. Devido à sua deleção, o produto do gene Grb3-3 é assim capaz de se opor aos efeitos celulares do produto do gene Grb2. A transferência deste gene *in vivo*, ou de variantes deste, compreende sequências anti-sentido, permite portanto interferir nos processos de proliferação, de diferenciação e/ou de morte celular.

Um primeiro objecto da invenção refere-se portanto a uma sequência nucleotídica compreendendo todo ou parte do gene Grb3-3 (sequência SEQ ID NO:1).

Um outro objecto da invenção refere-se a uma sequência nucleotídica derivada da sequência SEQ ID NO:1 e capaz de inibir, pelo menos em parte, a expressão da proteína Grb2 ou Grb3-3. Em particular, a invenção refere-se às sequências anti-sentido cuja expressão numa célula alvo permite controlar a transcrição de ARNm celulares. Tais sequências podem por exemplo ser transcritas, na célula alvo, em ARN complementares dos ARNm celulares Grb2 ou Grb3-3 e bloquear assim a sua tradução em proteína, de acordo com a técnica descrita na patente EP 140 380. Tais sequências podem ser constituídas por toda ou parte da sequência nucleica SEQ ID NO:1, transcritas na orientação inversa.

Como aqui indicado adiante, Grb2 é uma proteína pelo menos bifuncional que se fixa pelo seu domínio SH2 a sequências particulares fosforiladas em tirosina, e pelos seus dois domínios SH3, aos factores de permuta da família SOS. Grb3-3, tendo perdido a sua capacidade para se associar a proteínas fosforiladas em tirosina, pode portanto unicamente formar um complexo com as proteínas SOS. Grb3-3 pode portanto opor-se ao recrutamento do complexo Grb2-SOS pelos receptores dos factores de crescimento autofosforilados ou pelas proteínas associadas igualmente fosforiladas em tirosina tais como SHC ou IRS1. Sendo Grb3-3 capaz de bloquear este recrutamento, é capaz de bloquear as vias do mitogénio e induzir a morte celular. A requerente demonstrou com efeito que a proteína Grb3-3 era expressa no decorrer de certos processos fisiológicos como por exemplo a maturação do timo no rato. A requerente demonstrou igualmente que Grb3-3 é capaz de induzir a morte celular por apoptose de diferentes tipos celulares. Estas propriedades vantajosas puderam ser evidenciadas (i) por injecção da proteína recombinante nos fibroblastos 3T3 e (ii) por transferência da sequência codificante para Grb3-3

para as células 3T3 (exemplo 4). Grb3-3 é portanto capaz de induzir a morte celular de células viáveis tais como células imortalizadas, cancerosas ou embrionárias. Como mostrado nos exemplos, Grb2 é capaz de se opor aos efeitos de Grb3-3.

Por outro lado, uma pesquisa da expressão de Grb3-3 realizada no decorrer da infecção de células linfocitárias pelo vírus HIV permitiu mostrar que a produção viral maciça observada 7 dias após a infecção se correlaciona com uma sobre-expressão do ARNm de Grb3-3 pelas células infectadas (exemplo 5). Esta experiência mostra que eliminar ou contrariar os efeitos celulares de Grb3-3 pode igualmente permitir manter vivas as células infectadas, em particular pelo HIV, e assim permitir que os linfócitos T4 continuem no seu papel de defesa imunitária. A este respeito, a invenção refere-se igualmente à utilização de compostos capazes de eliminar ou contrariar pelo menos parcialmente os efeitos celulares de Grp3-3 na preparação de uma composição farmacêutica destinada ao tratamento da SIDA. Mais particularmente os compostos utilizados podem ser:

- sequências genéticas anti-sentido tais como definidas anteriormente,
- oligonucleótidos específicos de Grb3-3, modificados ou não para uma melhor estabilidade ou biodisponibilidade (fosforotioatos, agentes intercalantes, etc.). Pode-se tratar de preferência de oligonucleótidos que recobrem a sequência codificante localizada entre o domínio SH3 N-terminal e o domínio SH2 residual.
- qualquer sequência cuja transferência para as células infectadas induz uma sobre-expressão de Grb2.

As sequências nucleicas de acordo com a invenção podem ser utilizadas tal e qual, por exemplo após injecção no homem ou animal, para induzir uma protecção ou tratar os cancros. Em particular, podem ser injectadas sob a forma de ADN nu de acordo com a técnica descrita no pedido WO 90/11092. Podem igualmente ser administradas sob a forma complexada, por exemplo com DEAE-dextrano (Pagano *et al.*, *J. Virol.* 1 (1967) 891), com proteínas nucleares (Kaneda *et al.*, *Science* 243 (1989) 375), com lípidos (Felgner *et al.*, *PNAS* 84 (1987) 7413), sob a forma de lipossomas (Fraley *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255 (1980) 10431), etc.

Preferencialmente, as sequências nucleicas de acordo com a invenção fazem parte de um vector. O emprego de um tal vector permite com efeito melhorar a administração do ácido nucleico nas células a tratar, e igualmente aumentar a sua estabilidade nas referidas células, o que permite obter um efeito terapêutico durável. Adicionalmente, é possível introduzir várias sequências de ácido nucleico num mesmo vector, o que aumenta igualmente a eficácia do tratamento.

O vector utilizado pode ser de origem diversa, desde que seja capaz de transformar as células animais, de preferência as células tumorais humanas. Numa concretização preferida da invenção, utiliza-se um vector viral, que pode ser seleccionado de entre os adenovírus, os retrovírus, os vírus adenoassociados (AAV), o vírus do herpes, o citomegalovírus (CMV), o vírus da vacina, etc. Os vectores derivados dos adenovírus, retrovírus ou de AAV que incorporam sequências de ácidos nucleicos heterólogos foram descritos na literatura [Akli *et al.*, *Nature Genetics*, 3 (1993) 224; Stratford-Perricaudet *et al.*, *Human Gene Therapy*, 1 (1990) 241; EP 185 573, Levrero *et al.*, *Gene*, 101 (1991) 195; Le Gal la Salle *et al.*, *Science*, 259 (1993) 988; Roemer e Friedmann, *Eur. J. Biochem.* 208 (1992) 211; Dobson *et al.*, *Neuron*, 5 (1990) 353; Chiocca *et al.*, *New Biol.*, 2 (1990) 739; Miyanohara *et al.*, *New Biol.*, 4 (1992) 238; WO 91/18088].

A presente invenção refere-se portanto igualmente a qualquer vírus recombinante compreendendo, inserida no seu genoma, uma sequência nucleica tal como adiante definida.

De forma vantajosa, o vírus recombinante de acordo com a invenção é um vírus defectivo. A expressão "vírus defectivo" designa um vírus incapaz de se replicar na célula alvo. De um modo geral, o genoma dos vírus defectivos utilizados no âmbito da presente invenção está portanto desprovido pelo menos das sequências necessárias à replicação do referido vírus na célula infectada. Estas regiões podem ser eliminadas (total ou parcialmente), tornadas não funcionais, ou substituídas por outras sequências e em particular pelo ácido nucleico de acordo com a invenção. Preferencialmente, o vírus defectivo conserva contudo as sequências do seu genoma que são necessárias à encapsidação das partículas virais.

É particularmente vantajoso utilizar sequências nucleicas de acordo com a invenção sob a forma incorporada num adenovírus, um AAV ou um retrovírus recombinante defectivo.

No que respeita aos adenovírus, existem diferentes serótipos, cujas estrutura e propriedades variam pouco, mas que não são patogénicos para o homem, e em particular para os indivíduos imunodeprimidos. Por outro lado, estes vírus não se integram no genoma das células que infectam, e podem incorporar fragmentos importantes de ADN exógeno. De entre os diferentes serótipos, prefere-se utilizar no âmbito da presente invenção, os adenovírus do tipo 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5). No caso dos adenovírus Ad 5, as sequências necessárias à replicação são regiões E1A e E1B.

Os vírus recombinantes defectivos da invenção podem ser preparados por recombinação homóloga entre um vírus defectivo e um plasmídeo portador de, entre outra, a sequência nucleotídica tal como definida adiante (Levrero *et al.*, *Gene*, 101 (1991) 195; Graham, *EMBO J.*, 3(12) (1984) 2917). A recombinação homóloga produz-se após co-transfecção dos referidos vírus e plasmídeo numa linha celular apropriada. A linha celular utilizada deve de preferência (i) ser transformável pelos referidos elementos, e (ii), comportar as sequências capazes de complementar a parte do genoma do vírus defectivo, de preferência sob uma forma integrada para evitar os riscos de recombinação. A título de exemplo de uma linha utilizável para a preparação de adenovírus recombinantes defectivos, podem-se mencionar a linha de rim embrionário humano 293 (Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36 (1977) 59) que contém em particular, integrada no seu genoma, a parte esquerda do genoma de um adenovírus Ad5 (12%). A título de exemplo de uma linha utilizável para a preparação de retrovírus recombinantes defectivos, pode-se mencionar a linha CRIP (Danos e Mulligan, *PNAS*, 85 (1988) 6460).

Em seguida, os vírus que se multiplicaram são recuperados e purificados de acordo com as técnicas clássicas de biologia molecular.

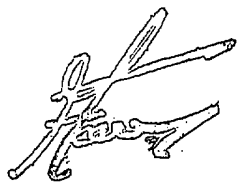
A presente invenção tem igualmente como objecto uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um vírus recombinante ou uma sequência nucleotídica tais como definidas acima.

As composições farmacêuticas de acordo com a invenção podem ser formuladas com vista na sua administração por via tópica, oral, parentérica, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intraocular, etc.

Preferencialmente, as composições farmacêuticas contêm veículos farmaceuticamente aceitáveis para uma formulação injectável, eventualmente directamente no tumor a tratar. Pode-se tratar em particular de soluções salinas (fosfato monossódico, dissódico, cloreto de sódio, potássio, cálcio ou magnésio, etc., ou misturas destes sais), estéreis, isotónicas, ou de composições secas, em particular liofilizadas, que, por adição de água estéril ou solução fisiológica, conforme o caso, permitem a constituição de solutos injectáveis.

As doses de ácidos nucleicos (sequência ou vector) utilizadas para a administração podem ser adaptadas em função de diferentes parâmetros, e em particular em função do modo de administração utilizado, da patologia em questão, do ácido nucleico a expressar, ou ainda da duração do tratamento pretendido. De um modo geral, em relação aos vírus recombinantes de acordo com a invenção, estes são formulados e administrados sob a forma de doses compreendidas entre 10^4 e 10^{14} pfu/ml, e de preferência 10^6 e 10^{10} pfu/ml. O termo pfu ("unidades formadoras de placas") corresponde ao poder infeccioso de uma solução de vírus, e é determinado por infecção de uma cultura celular apropriada, e medido, geralmente, após 48 horas, pelo número de placas fágicas de células infectadas. As técnicas de determinação do título de pfu de uma solução viral estão bem documentadas na literatura.

Tais composições farmacêuticas podem ser utilizadas no homem, para o tratamento e/ou prevenção de cancros. Em particular, os produtos de acordo com a invenção, sendo capazes de modular a actividade das proteínas ras, permitem intervir no processo de desenvolvimento dos cancros, e em particular, podem inibir a actividade de oncogenes cuja actividade transformante passa por uma interacção p21-Gap funcional. Numerosos cancros foram de facto associados à presença de proteínas ras oncogénicas. De entre os cancros que possuem muito frequentemente genes ras mutados, podem-se citar em particular os adenocarcinomas do pâncreas, dos quais 90% possuem um oncogene Ki-ras mutado no décimo segundo códão (Almoguera *et al.*, *Cell*, 53 (1988) 549), os adenocarcinomas do cólon e os cancros da tiróide (50%), ou os carcinomas do pulmão e as leucemias mielóides (30%, Bos, J.L. *Cancer Res.*,



49 (1989) 4682). Mais geralmente, as composições de acordo com a invenção podem ser utilizadas para tratar qualquer tipo de patologia em que seja observada uma proliferação celular anormal, por indução da apoptose, bem como qualquer patologia caracterizada por uma morte celular por apoptose (sida, coreia de Huntington, Parkinson), por meio de compostos bloqueadores dos efeitos de Grb3-3 (em particular anti-sentido).

A presente invenção será mais completamente descrita com o auxílio dos exemplos que se seguem, que devem ser considerados como ilustrativos e não limitativos.

Legenda das figuras

Figura 1: Representação esquemática dos domínios estruturais de Grb2 e Grb3-3.

Figura 2: Estudo de ligação de Grb3-3 ao receptor de EGF (figura 2a) e a péptidos ricos em prolina (figura 2b).

Figura 3: Efeito de Grb3-3 sobre a transactivação por ras de um RRE derivado do intensificador do vírus do polioma.

Figura 4: Evidência da morte celular induzida por Grb3-3 sobre os fibroblastos 3T3.

Figura 5: Evidência da expressão de Grb3-3 em células infectadas pelo vírus HIV.

Técnicas gerais de biologia molecular

Os métodos classicamente utilizados em biologia molecular tais como as extracções preparativas de ADN plasmídico, a centrifugação de ADN plasmídico em gradiente de cloreto de césio, a electroforese sobre geles de agarose ou acrilamida, a purificação de fragmentos de ADN por electroeluição, a extracção de proteínas com fenol ou com fenol-clorofórmio, a precipitação de ADN em meio salino com etanol ou isopropanol, a transformação em *Escherichia coli*, etc..., são bem conhecidas dos peritos na arte e estão abundantemente descritas na literatura [Maniatis T. *et al.*, "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. *et al.* (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Os plasmídeos do tipo pBR322, pUC e os fagos da série M13 são de origem comercial (Bethesda Research Laboratories).

Para as ligações, os fragmentos de ADN podem ser separados de acordo com o seu tamanho por electroforese em geles de agarose ou de acrilamida, extraídos com fenol ou para uma mistura de fenol/clorofórmio, precipitados com etanol e depois incubados na presença de ADN-ligase do fago T4 (Biolabs) de acordo com as instruções do fornecedor.

O preenchimento das extremidades 5' proeminentes pode ser efectuado através do fragmento de Klenow da ADN-polimerase I de *E. coli* (Biolabs) de acordo com as instruções do fornecedor. A destruição das extremidades 3' proeminentes é efectuada em presença da ADN-polimerase do fago T4 (Biolabs) utilizada de acordo com as instruções do fabricante. A destruição das extremidades 5' proeminentes é efectuada através de um tratamento com nuclease S1.

A mutagénese dirigida *in vitro* por oligodesoxinucleótidos sintéticos pode ser efectuada de acordo com o método desenvolvido por Taylor *et al.* [*Nucleic Acids Res.*, 13 (1985) 8749-8764] utilizando o estojo distribuído por Amersham.

A amplificação enzimática de fragmentos de ADN pela técnica dita de PCR [Polimerase-catalized Chain Reaction, Saiki R.K. *et al.*, *Science*, 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. e Faloona F.A., *Meth. Enzym.*, 155 (1987) 335-350] pode ser efectuada utilizando um "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) de acordo com as instruções do fabricante.

A verificação das sequências nucleotídicas pode ser efectuada pelo método desenvolvido por Sanger *et al.* [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 (1977) 5463-5467] utilizando o estojo distribuído por Amersham.

EXEMPLOS

1. Isolamento do gene Grb3-3

O gene Grb3-3 foi isolado por pesquisa de um banco de ADN humano por meio de uma sonda derivada da sequência do gene Grg2.

500 000 fagos recombinantes Lambda gt11 portadores dos fragmentos de ADN provenientes de um banco de placenta humana (Clontech) foram pesquisados por meio de uma sonda derivada da sequência do gene Grb2. A sonda utilizada corresponde aos 8 primeiros aminoácidos da proteína Grb2, e possui a sequência seguinte:

ATGGAAGCCATCGCCAAATATGAC (SEQ ID NO:2)

São assim identificados 10 clones positivos. A inserção destes 10 clones foi isolada sob a forma de fragmentos EcoRI, clonada no plasmídeo M13mp18 e sequenciada. De entre estes 10 clones, 9 eram portadores de inserções idênticas à sequência Grb2. Um único entre eles era portador de uma inserção com uma tamanho inferior ao gene Grb2, devido a uma deleção no domínio SH2 (Figura 1). A análise da sequência restante revelou uma identidade perfeita com as regiões correspondentes de Grb2, compreendidas nas regiões 5' e 3' não codificantes. A fase de leitura aberta deste clone codifica para uma proteína de 177 aminoácidos (SEQ ID NO:1), compreendendo 2 domínios SH3 flanqueando um domínio SH2 incompleto (figura 1). Os aminoácidos delecionados do domínio SH2 (resíduos 60 a 100 da proteína Grb2) correspondem aos resíduos implicados na ligação de Grb2 aos péptidos contendo tirosinas fosforiladas.

2. Actividade de ligação da proteína Grb3-3

Como acima indicado, a proteína Grb2 é o mediador da interacção entre os receptores de factores de crescimento fosforilados e os factores SOS. Este exemplo demonstra que a proteína Grb3-3 é incapaz de interagir com o receptor de EGF fosforilado, mas que conserva a sua faculdade de interagir com um péptido rico em prolina derivado da sequência do factor SOS1 humano.

A capacidade de ligação de Grb3-3 foi estudada utilizando proteínas de fusão com a Glutathion-S-Transferase (GST), biotiniladas. Este tipo de fusão permite uma purificação rápida e eficaz dos produtos recombinantes. Para isso, as sequências da invenção foram expressas na estirpe de *E. coli* TG1 sob a forma de proteínas de fusão com a GST de acordo com a técnica descrita por Smith e Johnson [*Gene*, 67 (1988) 31]. Em resumo, os genes Grb2 e Grb3-3 têm primeiro que ser modificados por introdução de parte e de outros dos códões de início e paragem de um local BamHI. Para isso, as fases abertas de leitura destes genes foram amplificadas por PCR por meio dos oligonucleótidos seguintes:

Oligonucleótido I (5')(SEQ ID NO:3):
GAATTCGGATCCATGGAAGCCATCGCCAAATATGACTTC

Oligonucleótido II (3')(SEQ ID NO:4):
GAATTCGGATCCTTAGACGTTCCGGTTCACGGGGGTGAC

A parte sublinhada corresponde ao local BamHI criado, seguido ou precedido por códões de início e paragem.

Os genes assim amplificados foram em seguida clonados sob a forma de fragmentos BamHI no vector pGEX 2T (Pharmacia) linearizado pela mesma enzima, em 3' e em fase com um ADNc que codifica para a GST. Os vectores assim obtidos foram em seguida utilizados para transformar a estirpe de *E. coli* TG1. As células assim transformadas foram pré-cultivadas uma noite a 37°C, diluídas de 1/10 em meio LB, adicionou-se-lhes IPTG para induzir a expressão (2 horas, 25°C), depois foram cultivadas 21 horas a cerca de 25°C. As células foram em seguida lisadas e as proteínas de fusão produzidas foram purificadas por afinidade sobre uma coluna de Agarose-GSH. Para isso, o lisado bacteriano é incubado em presença do gel (preparado e equilibrado com o tampão de lise) durante 15 minutos a 4°C. Depois de 3 lavagens com um tampão Tris-HCl, pH 7,4, as proteínas são eluídas em presença de um tampão Tris-HCl, pH 7,7 contendo um excesso de GST. O sobrenadante é recolhido e centrifugado.

Utilizou-se o mesmo protocolo para preparar um mutante de Grb2 no qual a glicina 203 é substituída por uma arginina (Grb2G203R) e um mutante de Grb3-3 no qual a glicina 162 é substituída por uma arginina (Grb3-3G162R). O

mutante Grb2G203R foi descrito como já não possuindo actividade num teste de reiniciação da síntese de ADN (Lowesntein *et al.*, citado acima). O mutante Grb3-3G162R possui a mesma mutação na mesma posição, e deveria portanto ser igualmente inactivo.

Estes mutantes foram preparados por mutagénese por PCR sobre os genes Grb2 e Grb3-3 utilizando, em 5', o oligonucleótido I descrito anteriormente, e em 3', o oligonucleótido III seguinte, no qual o códão mutado está sublinhado:

Oligonucleótido III (3') (SEQ ID NO:5)
GACGTTCCGGTTCACGGGGGTGACATAATTGCGGGGAAACATGCGGGTC

Os fragmentos assim amplificados foram em seguida eluídos, novamente amplificados por PCR por meio dos oligonucleótidos I e II, e depois clonados no vector pGEX 2T. Os mutantes foram em seguida produzidos como descrito acima.

As proteínas de fusão com a GST (GST-Grb2, GST-Grb3-3, GST-Grb3-3G162R e a GST) foram em seguida biotiniladas através das técnicas clássicas conhecidas dos peritos na arte (Cf técnicas gerais de biologia molecular assim como Mayer *et al.*, PNAS, 88 (1991) 627), e utilizadas como sondas para determinar a ligação ao receptor de EGF fosforilado imobilizado (2.1.) e depois a um péptido derivado de hSOS1 (2.2.).

2.1. Ligação ao receptor de EGF fosforilado

Protocolo: O receptor de EGF utilizado foi purificado a partir de células A431 por imobilização sobre WGA-Sepharose de acordo com a técnica descrita por Duchesne *et al.* (Science, 259 (1993) 525). Estimularam-se primeiro 2 µg deste receptor com EGF 1 µM, 10 min, a 22°C, e depois incubaram-se com ou sem ATP frio (10 µM), em presença de MnCl2 2,5 mM num tampão HNTG (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, Triton a 0,1%, Glicerol a 10%, pH = 7,5) a 4°C durante 2 min. A fosforilação do receptor é em seguida interrompida por adição de um tampão de degradação. As amostras são em seguida depositadas sobre um gel de SDS-PAGE a 4-20% e depois transferidas sobre membranas de

poli(difluoreto de vinilideno) (PVDF). Incubaram-se em seguida as manchas transferidas em presença das diferentes fusões de GST biotiniladas (2 μg/ml), depois revelaram-se por meio de estreptavidina acoplada a fosfatase alcalina (Promega). Os receptores de EGF foram igualmente submetidos a uma imunotransferência em presença de anticorpos anti-fosfotirosinas (anti-PY) para verificar que os receptores foram bem fosforilados.

Resultados: Os resultados obtidos estão apresentados na figura 2a. Mostram, como esperado, que a proteína Grb2 interage com o receptor de EGF apenas sob a forma fosforilada. Mostram em seguida que a proteína Grb3-3 não se liga ao receptor de EGF, qualquer que seja o seu grau de fosforilação.

2.2. Ligação a um péptido derivado de hSOS1

Protocolo: Sintetizaram-se os dois péptidos seguintes ricos em prolina:

Péptido hSOS1: GTPEVPVPPPVPPRRRPESA: Este péptido corresponde aos resíduos 1143 a 1162 da proteína hSOS1 (Li *et al.*, *Nature*, 363 (1993) 83), responsável pela interacção entre Grb2 e hSOS1 (SEQ ID NO:6).

Péptido 3BP1: PPPLPPLV: Este péptido é derivado da proteína 3BP1, que é conhecida por ligar de maneira eficaz o domínio SH3 de Ab1 e Scr (Cicchetti *et al.*, *Science* 257 (1992) 803) (SEQ ID NO:7).

Cada um destes péptidos (1 μl, 10 mg/ml) foi imobilizado sobre uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram em seguida incubadas num tampão bloqueador (Tris 20 mM, pH = 7,6, NaCl 150 mM, Tween a 0,1%, albumina bovina a 3%). As membranas são em seguida incubadas uma noite a 4°C em presença de diferentes fusões de GST biotiniladas (4 μg/ml) e depois reveladas por meio de estreptavidina acoplada a fosfatase alcalina (Promega).

Resultados: Os resultados obtidos estão apresentados na figura 2b. Mostram que Grb3-3, tal como a Grb2, é capaz de se ligar ao péptido hSOS1. Mostram também que esta interacção é específica uma vez que não é observada nenhuma ligação com o péptido 3BP1. Por outro lado, os resultados mostram igualmente que o mutante Grb3-3G162R já não é capaz de se ligar ao

péptido hSOS1, o que confirma a importância deste resíduo e o papel funcional desta interacção.

3. Actividade da proteína Grb3-3

Este exemplo mostra que, apesar da sua deleção no domínio SH2, a proteína Grb3-3 possui um efeito funcional.

A actividade da proteína Grb3-3 foi estudada através da determinação da sua capacidade para cooperar com ras para a transactivação de um promotor possuindo elementos de resposta a ras (RRE) e que governa a expressão de um gene repórter.

O protocolo utilizado foi descrito por exemplo por Schweighoffer *et al.*, *Science*, 256 (1992) 825. Em resumo, o promotor utilizado é um promotor sintético composto pelo promotor de murino do gene da timidina-quinase e por 4 elementos PEA1 repetidos derivados do intensificador do polioma (Wasylyk *et al.*, *EMBO J.*, 7 (1988) 2475): promotor Py-TK. Este promotor dirige a expressão do gene repórter, na ocorrência do gene bacteriano da cloranfenicolactiltransferase (CAT): vector Py-TK-CAT. Os vectores de expressão dos genes testados foram construídos por inserção dos referidos genes, sob a forma de fragmentos BamHI, no local BglII do plasmídeo pSV2. Este local permite colocar os genes sob controlo do promotor precoce SV40.

Transfectaram-se células ER22 a 40% de confluência com 0,5 μg do vector Py-TK-CAT sozinho (Py) ou em presença do vector de expressão portador, sob o controlo do promotor precoce de SV40, do gene: Grb2, 2 μg, Grb3-3, 2 μg, Grb2(G203R), 2 μg, Grb3-3(G162R), 2 μg ou Grb3-3, 2 μg + Grb2, 2 μg. Em cada caso, a quantidade total de ADN foi ajustada a 5 μg com um vector de expressão sem inserção. A transfecção foi efectuada em presença de lipospermina (Transfectam, IBF-Sepracor). As células foram mantidas 48 horas em cultura num meio DMEM suplementado com 0,5% de soro fetal de vitelo. A actividade CAT (transactivação do RRE) foi em seguida determinada como descrito por Wasylyk *et al.* (PNAS, 85 (1988) 7952).

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 3. Mostram claramente que a expressão da proteína Grb3-3 se opõe aos efeitos da activação de um receptor de factor de crescimento. Mostram igualmente que Grb2 em excesso se opõe aos efeitos de Grb3-3 sobre a resposta ao factor de crescimento.

4. Grb3-3 induz a apoptose celular

Este exemplo demonstra a implicação directa de Grb3-3 na apoptose celular. Esta propriedade oferece aplicações particularmente vantajosas para o tratamento de patologias resultantes de uma proliferação celular (cancros, estenose recidiva, etc.).

A indução de apoptose celular pela Grb3-3 foi demonstrada (i) por injecção da proteína recombinante nos fibroblastos 3T3 e (ii) por transferência da sequência codificante para Gbr3-3 para células 3T3.

(i) Injecção da proteína recombinante

A proteína Grb3-3 recombinante foi preparada sob a forma de proteína de fusão com a GST de acordo com o protocolo descrito no exemplo 2. A proteína de fusão foi em seguida tratada com trombina (0,25%, Sigma) para separar a parte GST, depois foi purificada por cromatografia de permuta iónica sobre coluna monoQ. As fracções que continham a proteína recombinante foram em seguida concentradas por meio de microconcentradores Microsep (Filtron) num tampão fosfato 20 mM (pH 7) contendo NaCl 100 mM. A proteína purificada assim obtida foi injectada (1 a 3 mg/ml) em células 3T3 em cultura por meio de um microinjector automático Eppendorf. As células foram em seguida incubadas a 34°C e fotografadas a intervalos regulares para seguir as transformações morfológicas. Os resultados obtidos mostram que 5 horas após a injecção de Grb3-3 a maior parte das células estão mortas enquanto que a injecção, nas mesmas condições, de Grb2 ou do mutante Grb3-3(G162R) não tem qualquer efeito sobre a viabilidade das células.

(ii) Transferência da sequência codificante para a proteína recombinante

Construiu-se um plasmídeo compreendendo a sequência SEQ ID NO:1 que codifica para a proteína Grb3-3 sob o controlo do promotor precoce do vírus SV40.

Os fibroblastos 3T3 a 40% de confluência foram transfectados em presença de lipospermina (Transfectam, IBF-Sepracor) com 0,5 ou 2 μg deste plasmídeo de expressão. 48 horas após a transfecção, 50% das células estavam em suspensão no meio e as células restantes, aderentes à parede, apresentavam alterações morfológicas muito importantes (figura 4). Uma análise por electroforese em gel de agarose mostrou por outro lado que as células apresentavam um padrão de fragmentação de ADN oligo-nucleossómico característico de células mortas (figura 4). Em compensação, as células transfectadas nas mesmas condições com um plasmídeo de expressão de Grb2, Grb3-3(G162R) ou Grb2(G203R) conservam uma morfologia normal, são sempre viáveis e não apresentam nenhuma fragmentação de ADN. Como mostra a figura 4, a co-expressão de Grb2 permite opor-se aos efeitos de Grb3-3.

Estes resultados mostram portanto claramente que Grb3-3 constitui um gene "matador" capaz de induzir a apoptose celular. Como indicado posteriormente, esta propriedade oferece aplicações particularmente vantajosas para o tratamento de patologias resultantes de uma proliferação celular tais como, em particular, os cancros, a estenose recidiva, etc.

5. Evidência da expressão de Grb3-3 em linfócitos infectados com o vírus HIV

Este exemplo mostra que, no decorrer do ciclo de infecção dos linfócitos T pelo vírus HIV, a proporção relativa de ARNm de Grb2 e de Grb3-3 é modificada, e que o mensageiro de Grb3-3 é sobre-expresso no momento da produção viral maciça e da morte celular.

Linfócitos de sangue periférico foram infectados com o vírus HIV-1 em duas diluições (1/10 e 1/100) durante 1, 4 ou 7 dias. Os ARNm das células foram em seguida analisados por PCR inversa por meio de oligonucleótidos específicos de Grb2 e de Gbr3-3, para determinar a proporção relativa dos

mensageiros de Grb2 e Grb3-3. Os oligonucleótidos específicos de Grb3-3 utilizados são os seguintes:

Oligonucleótido IV (3'): ATCGTTTCCAAACGGATGTGGTTT (SEQ ID NO:8)
Oligonucleótido V (5'): ATAGAAATGAAACCACATCCGTTT (SEQ ID NO:9)

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 5. Mostram claramente que 7 dias após a infecção pelo vírus HIV, o ARNm de Grb3-3 é sobre-expresso. Como mostrado pelo doseamento da proteína p24 e da transcriptase inversa do vírus, o dia 7 corresponde igualmente ao período no qual é observada uma produção viral maciça.

(Segue Listagem de Sequências)

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE:
(A) NOME: RHONE-POULENC RORER S.A.
(B) RUA: 20, avenue Raymond ARON
(C) CIDADE: ANTONY
(E) PAÍS: FRANCE
(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 92165

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Gene Grb3-3, suas variantes e suas utilizações

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 9

(iv) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR:
(A) TIPO DE SUPORTE: disquete
(B) COMPUTADOR: compatível com PC IBM
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) *SOFTWARE*: PatentIn Release #1.0, versão #1.25 (IEP)

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:
(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 933 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: dupla
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vi) ORIGEM:
(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(ix) CARACTERÍSTICA ADICIONAL:
(A) NOME/CHAVE: CDS
(B) LOCALIZAÇÃO: 37..567
(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /product = "Grb3-3"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

```
GAATTCGGGG CTGCTGAGCA CTGAGCAGGG CTCAGA ATG GAA GCC ATC GCC AAA      54
                                        Met Glu Ala Ile Ala Lys
                                          1               5

TAT GAC TTC AAA GCT ACT GCA GAC GAC GAC CTG AGC TTC AAA AGG GGG     102
Tyr Asp Phe Lys Ala Thr Ala Asp Asp Asp Leu Ser Phe Lys Arg Gly
            10                  15                  20

GAC ATC CTC AAG GTT TTG AAC GAA GAA TGT GAT CAG AAC TGG TAC AAG     150
Asp Ile Leu Lys Val Leu Asn Glu Glu Cys Asp Gln Asn Trp Tyr Lys
        25                  30                  35

GCA GAG CTT AAT GGA AAA GAC GGC TTC ATT CCC AAG AAC TAC ATA GAA     198
Ala Glu Leu Asn Gly Lys Asp Gly Phe Ile Pro Lys Asn Tyr Ile Glu
    40                  45                  50

ATG AAA CCA CAT CCG TTT GGA AAC GAT GTG CAG CAC TTC AAG GTG CTC     246
Met Lys Pro His Pro Phe Gly Asn Asp Val Gln His Phe Lys Val Leu
55                  60                  65                  70

CGA GAT GGA GCC GGG AAG TAC TTC CTC TGG GTG GTG AAG TTC AAT TCT     294
Arg Asp Gly Ala Gly Lys Tyr Phe Leu Trp Val Val Lys Phe Asn Ser
                75                  80                  85

TTG AAT GAG CTG GTG GAT TAT CAC AGA TCT ACA TCT GTC TCC AGA AAC     342
Leu Asn Glu Leu Val Asp Tyr His Arg Ser Thr Ser Val Ser Arg Asn
            90                  95                  100

CAG CAG ATA TTC CTG CGG GAC ATA GAA CAG GTG CCA CAG CAG CCG ACA     390
Gln Gln Ile Phe Leu Arg Asp Ile Glu Gln Val Pro Gln Gln Pro Thr
        105                 110                 115

TAC GTC CAG GCC CTC TTT GAC TTT GAT CCC CAG GAG GAT GGA GAG CTG     438
Tyr Val Gln Ala Leu Phe Asp Phe Asp Pro Gln Glu Asp Gly Glu Leu
    120                 125                 130

GGC TTC CGC CGG GGA GAT TTT ATC CAT GTC ATG GAT AAC TCA GAC CCC     486
Gly Phe Arg Arg Gly Asp Phe Ile His Val Met Asp Asn Ser Asp Pro
135                 140                 145                 150

AAC TGG TGG AAA GGA GCT TGC CAC GGG CAG ACC GGC ATG TTT CCC CGC     534
Asn Trp Trp Lys Gly Ala Cys His Gly Gln Thr Gly Met Phe Pro Arg
                155                 160                 165

AAT TAT GTC ACC CCC GTG AAC CGG AAC GTC TAAGAGTCAA GAAGCAATTA       584
Asn Tyr Val Thr Pro Val Asn Arg Asn Val
            170                 175

TTTAAAGAAA GTGAAAAATG TAAAACACAT ACAAAAGAAT TAAACCCACA AGCTGCCTCT   644

GACAGCAGCC TGTGAGGGAG TGCAGAACAC CTGCCGGGTC ACCCTGTGAC CCTCTCACTT   704

TGGTTGGAAC TTTAGGGGGT GGGAGGGGGC GTTGGATTTA AAAATGCCAA AACTTACCTA   764

TAAATTAAGA AGAGTTTTTA TTACAAATTT TCACTGCTGC TCCTCTTTCC CCTCCTTTGT   824

CTTTTTTTTC TTCCTTTTTT CTCTTCTGTC CATCAGTGCA TGACGTTTAA GGCCACGTAT   884

AGTCCTAGCT GACGCCAATA AAAAACAAGA AACCAAAAAA CCCGAATTC               933
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:
(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(vi) ORIGEM:
(A) ORGANISMO: OLIGONUCLEÓTIDO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

ATGGAAGCCA TCGCCAAATA TGAC 24

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:3:
(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 39 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(vi) ORIGEM:
(A) ORGANISMO: OLIGONUCLEÓTIDO I

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:

GAATTCGGAT CCATGGAAGC CATCGCCAAA TATGACTTC 39

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:4:
(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 39 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(vi) ORIGEM:
(A) ORGANISMO: OLIGONUCLEÓTIDO II

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4:

GAATTCGGAT CCTTAGACGT TCCGGTTCAC GGGGGTGAC 39

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 49 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(vi) ORIGEM:

(A) ORGANISMO: OLIGONUCLEÓTIDO III

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

```
GACGTTCCGG   TTCACGGGGG   TGACATAATT   GCGGGGAAAC   ATGCGGGTC      49
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 20 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(vi) ORIGEM:

(A) ORGANISMO: Péptido hSOS1 (resíduos 1143 a 1162)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:

```
Gly Thr Pro Glu Val Pro Val Pro Pro Pro Val Pro Pro Arg Arg Arg
1               5                  10                  15
Pro Glu Ser Ala
            20
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 8 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(vi) ORIGEM:

(A) ORGANISMO: Péptido 3BP1

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:

```
Pro Pro Pro Leu Pro Pro Leu Val
1               5
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:8:
(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(vi) ORIGEM:
(A) ORGANISMO: OLIGONUCLEÓTIDO IV

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:8:

ATCGTTTCCA AACGGATGTG GTTT 24

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:9:
(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(vi) ORIGEM:
(A) ORGANISMO: OLIGONUCLEÓTIDO V

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:9:

ATAGAAATGA AACCACATCC GTTT 24

Lisboa, 15. NOV. 2000

Por AVENTIS PHARMA S.A.
- O AGENTE OFICIAL -
O ADJUNTO

ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA

REIVINDICACÕES

1. Sequência nucleotídica representada na sequência SEQ ID NO:1.

2. Sequência nucleotídica representada na sequência SEQ ID NO:1 e capaz de inibir pelo menos em parte a expressão da proteína Grb2 ou Grb3-3.

3. Polipéptido representado na sequência SEQ ID NO:1.

4. Vector compreendendo uma sequência nucleotídica de acordo com as reivindicações 1 ou 2.

5. Vector de acordo com a reivindicação 4 caracterizado por se tratar de um vector viral.

6. Vector de acordo com a reivindicação 5 caracterizado por se tratar de um vector derivado dos adenovírus, dos retrovírus, dos AAV, do vírus HSV, CMV ou do vírus da vacina.

7. Vector de acordo com as reivindicações 5 ou 6 caracterizado por se tratar de um vírus defectivo para a replicação.

8. Composição farmacêutica compreendendo um ou mais vectores de acordo com uma das reivindicações 4 a 7.

9. Composição farmacêutica compreendendo uma ou mais sequências nucleotídicas de acordo com as reivindicações 1 ou 2, sob a forma complexada a DEAE-dextrano, a proteínas nucleares ou a lípidos, sob a forma bruta ou ainda incorporada em lipossomas.

10. Utilização de uma sequência de acordo com a reivindicação 1 ou 2 ou de um vector contendo a referida sequência para a preparação de uma composição farmacêutica destinada ao tratamento de cancros.

11. Utilização de um composto capaz de eliminar ou de contrariar, pelo menos parcialmente, os efeitos celulares de Grb3-3 para a preparação de uma composição farmacêutica destinada ao tratamento da SIDA.

Lisboa, 15. NOV. 2000

Por AVENTIS PHARMA S.A.

- O AGENTE OFICIAL -

O ADJUNTO

ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA

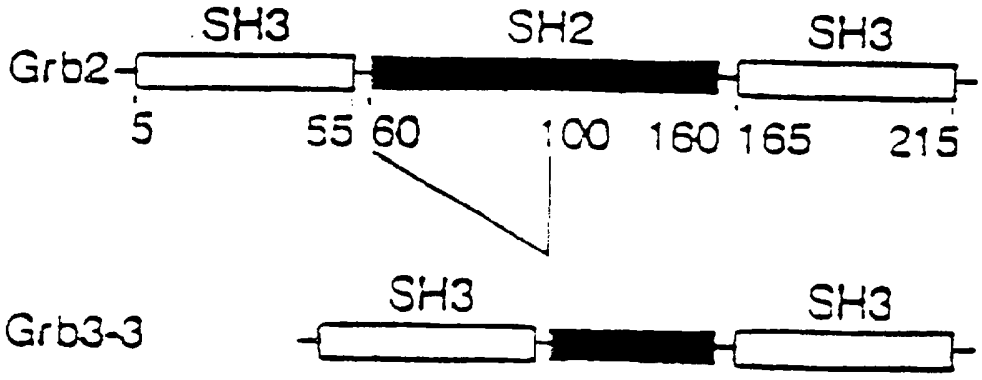


Figura 1

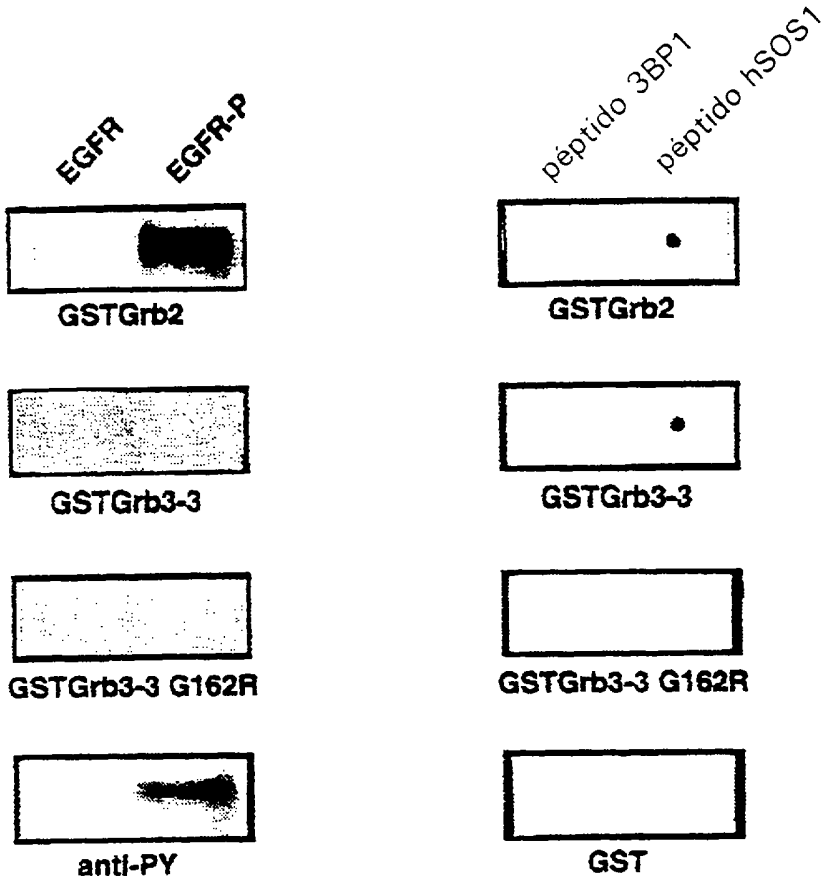

EGFR
EGFR-P
GSTGrb2
GSTGrb3-3
GSTGrb3-3 G162R
anti-PY
péptido 3BP1
péptido hSOS1
GSTGrb2
GSTGrb3-3
GSTGrb3-3 G162R
GST

Figura 2

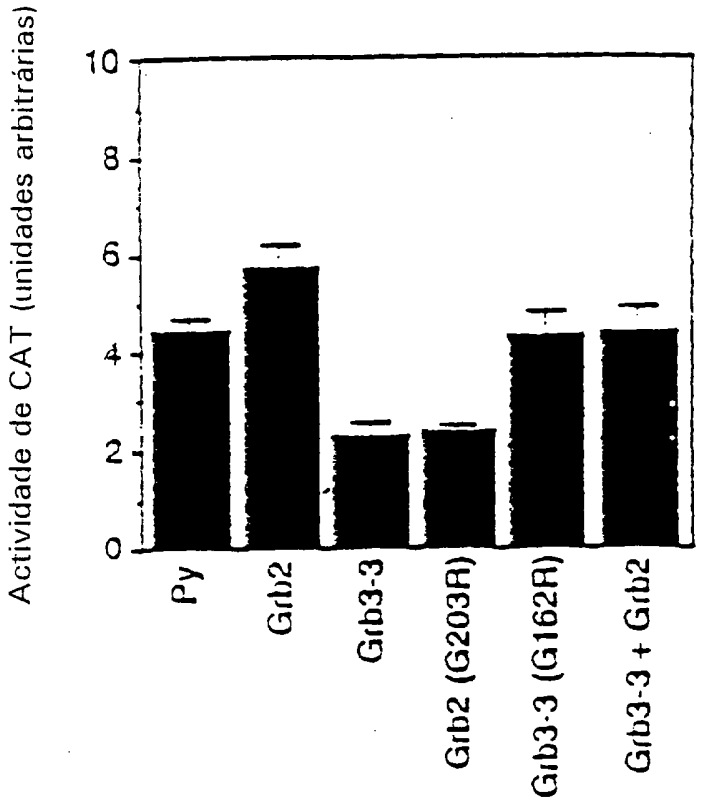
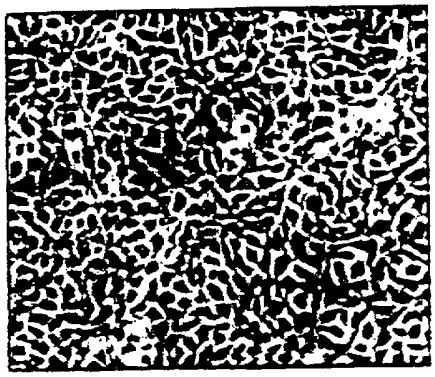

Actividade de CAT (unidades arbitrárias)
10
8
6
4
2
0
Py
Grb2
Grb3-3
Grb2 (G203R)
Grb3-3 (G162R)
Grb3-3 + Grb2

Figura 3



NIH3T3



+Grb3-3

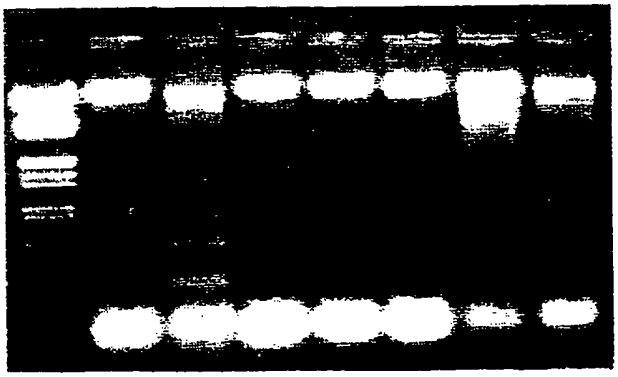


Figura 4

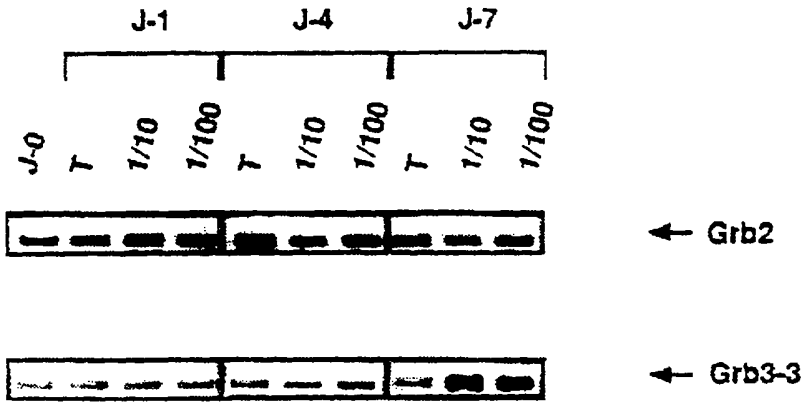


Figura 5