

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

**N.º85 364**

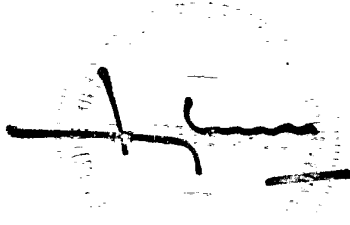
**REQUERENTE:** CIBA-GEIGY AG, suíça, com sede em Klybeckstrasse 141, 4002 Basel, Suíça.

**EPÍGRAFE:** MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE POLIPEPTIDEOS RELACIONADOS COM FACTORES DE LIGAÇÃO".

**INVENTORES:** Hans Hofstetter, Erich Kilchherr e Albert Schmitz

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883. Reino Unido em 22 de Julho de 1986 sob o n.º 8617862 e em 7 de Novembro de 1986 sob o n.º 8626622

36.204



MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a polipeptídeos relacionados com factores de ligação à imunoglobulina E (IgE-BFs) humanos, mRNAs, DNAs e vectores híbridos codificadores dos referidos polipeptídeos, hospedeiros possuidores dos referidos vectores híbridos, processos para a preparação dos referidos polipeptídeos, mRNAs, DNAs, vecto-

=====

CIBA-GEIGY AG

"MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS RELACIONADOS COM FACTORES DE LIGAÇÃO"

res híbridos e hospedeiros. Os polipeptídeos podem ser usados para a prevenção e/ou tratamento de doenças alérgicas e deste modo o invento também se relaciona com preparações farmacêuticas que os incluem.

O processo para a preparação dos referidos polipeptídeos consiste em se cultivar um hospedeiro transformado contendo um vector híbrido compreendendo a sequência de DNA codificadora do referido polipeptídeo ou se traduzir num sistema de tradução adequado o mRNA codificador do referido polipeptídeo.

O invento diz respeito a polipeptídeos relacionados com factores de ligação à imunoglobulina E (IgE-BFs) humanos, mRNAs, e DNAs e vectores híbridos codificadores dos referidos polipeptídeos, hospedeiros possuidores dos referidos vectores híbridos, processos para a preparação dos referidos polipeptídeos, mRNAs DNAs, vectores híbridos e hospedeiros. Os polipeptídeos podem ser usados para a prevenção e/ou tratamento de doenças alérgicas e deste modo o invento também se relaciona com preparações farmacêuticas que os incluem.

#### Fundamento do invento

As doenças alérgicas são ainda um importante problema de saúde devido à sua alta incidência (20 a 30% da população) e à falta de tratamento que as curem. Geralmente a terapia está restringida ao uso de anti-histaminas ou de processos de imunização mais ou menos eficazes. As drogas anti-alérgicas clássicas têm certas desvantagens, especialmente por causarem vários efeitos secundários no doente tratado. O processo de imunização está limitado a um ou dois alérgenos enquanto que a maior parte dos pacientes são sensíveis a uma larga gama de alérgenos. Além disso, o tratamento por hipossensibilização não cura nem protege.

A vasta maioria das doenças alérgicas são mediadas por anticorpos imunoglobulina E (IgE) dirigidos contra uma multidão de alérgenos provenientes do ar, e.g. polens, pêlos de animais, ácaros do pó, antigénios alimentares, agentes farmacológicos, e.g. penicilinas, ou veneno de himenópteros. Os mecanismos de regulação da produção

de IgE foram extensivamente investigados em animais de laboratório [K. Ishizaka, Ann. Rev. Immunol. 2, 159 (1984)]. Estes estudos indicaram claramente a existência de mecanismos de controle da produção de IgE não específicos de antígeno mas específicos de isotipo de IgE em modelos animais. As moléculas efectoras destes mecanismos reguladores foram designadas factores de ligação a IgE (IgE-BFs) devido à sua afinidade para IgE. Os IgE-BFs podem ser divididos em factores supressores de IgE (IgE-SFs) e factores potenciadores de IgE (IgE (IgE-PFs)). Estas moléculas diferem apenas no seu teor em hidratos de carbono. Os IgE-PFs não são glicosilados ou são menos glicosilados que os correspondentes IgE-PFs. A produção real de IgE em modelos animais é determinada pela proporção entre estes dois tipos de IgE-BFs.

As mesmas células são capazes de secretar IgE-SFs ou IgE-PFs dependendo da influência de factores inibidores ou indutores da glicosilação que são secretados por subpopulações distintas de linfócitos T reguladores.

M. Sarfati *et al* [Immunology 53, 197, 207, 783 (1984)] documentaram a existência de linhas de células B humanas secretoras de IgE-BFs dotadas de actividades biológicas semelhantes às descritas em roedores. Outros investigadores descreveram a produção de IgE-BFs por células T humanas [T.F. Huff e K. Ishizaka, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81, 1514 (1984)] e por métodos de engenharia genética [Pedido de Patente Europeia 155 192]. As relações entre IgE-BFs com origem em células T e os que têm origem em células B não eram até agora conhecidas. Conforme será evidente a partir do presente invento os IgE-BFs com origem em células B tem menos do que homologia estatística com os IgE-BFs com origem em células T.

Os IgE-BFs purificados são importantes para o diagnóstico e terapia de doenças alérgicas e doenças de regulação imune relacionadas com elas. Em particular os IgE-BFs com actividade supressora de IgE devem ser úteis no tratamento de doenças alérgicas, enquanto que os IgE-BFs com actividade potenciadora de IgE devem aumentar a resistência a infecções, por exemplo resistência a infecções por parasitas.

Os ensaios para a detecção de IgE-BFs de células B são baseados num teste de inibição de rosetas em que células RPMI 8866 (numa linha linfoblastóide de células B) expressando receptores para IgE (Fc R) são rosetados com eritrócitos bovinos revestidos com IgE. Se os últimos forem primeiro incubados com IgE-BFs eles não serão mais capazes de se ligarem às células RPMI 8866 e a proporção de células formadoras de rosetas é portanto reduzida. Este ensaio não é quantitativo, é tecnicamente delicado devido à variabilidade no acoplamento de IgE a eritrócitos bovinos e é maçador porque as rosetas devem ser examinadas ao microscópio, deve-se ter permanentemente à disposição linha celulares, os eritrócitos revestidos com IgE devem ser preparados regularmente, etc., de modo que apenas um pequeno numero de testes (20-40) podem ser efectuados razoavelmente por uma pessoa num dia. Num ensaio mais adequado, quantitativo é fácil de efectuar, utilizam-se anticorpos monoclonais contra Fc R de linfócitos os quais dão reacção cruzada com IgE-BFs. Tais anticorpos monoclonais foram preparados por G. Delaspasse et al., EP 86810244.3, e as linhas celulares de hibridoma que os produzem estão depositadas na Collection Nationale de Culturas de Microorganismes, Instituto Pasteur, Paris e estão disponiveis com o numero de acesso I-425 (clone 208.25 A. 4,3/135), I-420 (clone 208.25 D. 2,1/176), I-451 (clone 207.25 A. 4,4/30), I-420 (clone 207.25 A. 4,4/45) e I-486 (clone 208.25 D. 2/94). Os anticorpos monoclonais

correspondentes são designados Mab-135, Mab-176, Mab-30, Mab-45 e Mab-94, respectivamente. Eles permitem também uma purificação eficaz de IgE-BFs por cromatografia de afinidade.

Apesar do uso dos anticorpos monoclonais referidos foi até aqui impossível determinar a sequência de aminoácidos de um único IgE-BF isolado a partir de uma linha natural de células B humanas. Para fins terapêuticos seria altamente desejável possuir um único polipeptídeo limpo com uma sequência de aminoácidos definida tendo a desejada propriedade de ligação a IgE e que fosse facilmente preparada em grandes quantidades.

O progresso rápido dos métodos de DNA recombinante nos últimos anos proporcionou os métodos gerais para se atingir este objectivo. Nos casos em que se desconhece a estrutura do polipeptídeo, o sucesso da técnica de DNA recombinante depende da identificação de um mRNA ou de um DNA codificador do polipeptídeo pretendido a partir de uma fonte natural. Após identificação de um mRNA através de um ensaio adequado, pode-se preparar um DNA complementar. O cDNA pode ser incorporado num vector adequado, quando da transformação de um hospedeiro adequado com o vector híbrido obtido, selecção e cultura dos hospedeiros transformados permite a produção e finalmente isolamento do polipeptídeo. O isolamento do cDNA codificador do polipeptídeo pretendido e sequenciação permite determinar a sequência de aminoácidos do polipeptídeo. Pode-se usar o cDNA ou partes dele para o despiste de mRNA ou do genoma de DNA da fonte natural para outras sequências de nucleotídeos codificadoras dos polipeptídeos pretendidos.

Deste modo, no presente invento à medida que eram conhecidas as estruturas dos IgE-BFs, o

primeiro objectivo foi identificar um mRNA de células B humanas codificadoras do polipeptideo por transformação de ovos de Xenopus laevis com mRNA fraccionado das referidas células B e determinação dos clones que contêm o mRNA pretendido por um ensaio que utilizasse os anticorpos monoclonais. Outros objectivos foram a preparação de cDNAs e vectores híbridos, a transformação de hospedeiros adequados e finalmente cultura dos referidos hospedeiros e isolamento dos polipeptideos pretendidos. Os últimos não são necessariamente idênticos aos polipeptideos naturais porque pode haver modificações pós-tradução após expressão do polipeptideo.

#### Objectivos do invento

Os objectivos do invento são polipeptideos relacionados com IgE-BFs de células B humanas, vectores híbridos compreendendo como inserção uma sequência de DNA codificadora dos referidos polipeptideos, hospedeiros transformados contendo os referidos vectores híbridos, moléculas de RNA e DNA codificadoras dos referidos polipeptideos e preparações farmacêuticas contendo quantidades eficazes dos referidos polipeptideos.

Outros objectivos são os métodos para a produção dos referidos polipeptideos, vectores híbridos, hospedeiros transformados, moléculas de RNA e DNA, preparações farmacêuticas e o uso dos referidos polipeptideos.

Um outro objectivo do invento é proporcionar um método para a prevenção e/ou tratamento de



alergias pela administração de uma quantidade eficaz de um presente polipeptideo relacionado com IgE-BFs.

Estes objectivos foram conseguidos pela preparação de um DNA codificador do polipeptideo com a fórmula I e seus fragmentos.

Descrição do invento

Os polipeptideos do invento

O invento diz respeito a um polipeptideo tendo a sequência de aminoácidos com a fórmula (I)

```
1      10      20      30
M E E G Q Y S E I E E L P R R R C C R R G T Q I V L L G L V
      40      50      60
T A A L W A G L L T L L L L W H W D T T Q S L K Q L E E R A
      70      80      90
A R N V S Q V S K N L E S H H G D Q M A Q K S Q S T Q I S Q
      100     110     120
E L E E L R A E Q Q R L K S Q D L E L S W N L N G L Q A D L
      130     140     150
S S F K S Q E L N E R N E A S D L L E R L R E E V T K L R M
```

ELQVSSG<sup>160</sup>FVCNTCPEKWIN<sup>170</sup>FRKCY<sup>180</sup>YFGKG  
TKQWVHARYA<sup>190</sup>CDDMEGQLVSI<sup>200</sup>HSP<sup>210</sup>EEQDFL  
TKHASH<sup>220</sup>TGSWIGLRNLDL<sup>230</sup>KGEFIWVD<sup>240</sup>GSHV  
DYSNWAPGE<sup>250</sup>PTSRSQGEDC<sup>260</sup>VMMRGS<sup>270</sup>GRWND  
AFCDRKLG<sup>280</sup>AWVCDRLATCT<sup>290</sup>PPASE<sup>300</sup>GS<sup>310</sup>SAESM  
GPDSR<sup>310</sup>PD<sup>320</sup>DGRLPTPSAPLHS, (I)  
321

um seu fragmento, mutante ou derivado.

As letras isoladas na fórmula (I) representam os seguintes L-aminoácidos naturais:

(A)alanina, (C)cisteína, (D)ácido aspartico, (E)ácido glutâmico, (F)fenilalanina, (G)glicina, (H)histidina, (I)isoleucina, (K)lisina, (L)leucina, (M)metionina, (N)asparagina, (P)prolina, (Q)glutamina, (R)arginina, (S)serina, (T)treonina, (V)valina, (W)triptofano, (Y)tirosina.

Os polipeptídeos com a fórmula I, seus fragmentos, mutantes e derivados são aqui agrupados conjuntamente sob a expressão "polipeptídeos do invento". Eles estão relacionados com os receptores para IgE nas células B humanas e, se não possuírem a sequência de ancoragem à membrana, com os IgE-BFs de Sarfati et al., referido atrás.

Os fragmentos dos polipeptídeos do invento são partes do polipeptídeo completo com a fórmula (I) tendo pelo menos 10 e até 320 aminoácidos sucessivos nu-

ma sequência correspondente à fórmula (I). Tais fragmentos são por exemplo polipeptídeos com a fórmula (I), em que o primeiro aminoácido, ou até cerca de 133 aminoácidos começando no extremo N foram eliminados. Este extremo com deleção é a sequência de ancoragem à membrana que liga o polipeptídeo à membrana citoplasmática das células B. Outros fragmentos são polipeptídeos com a Fórmula (I) em que os aminoácidos entre o extremo N e C, por exemplo os aminoácidos entre aproximadamente 110 e 130, ou os aminoácidos no extremo C, por exemplo os aminoácidos entre aproximadamente 250 e 321, estão eliminados.

O invento relaciona-se em particular com um fragmento do polipeptídeo com a fórmula (I), caracterizado por estar eliminada a sequência de aminoácidos 106 a 127; ou por ser seleccionado do grupo consistindo nos polipeptídeos que começam com qualquer um dos aminoácidos 120, 121, 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 ou 160 e terminando com qualquer um dos aminoácidos entre 281 e 321, de preferência 321.

Um fragmento preferido do polipeptídeo com a fórmula (I) é caracterizado por consistir na sequência de aminoácidos entre o aminoácido 119 e o aminoácido 321.

Um outro fragmento preferido do polipeptídeo com a fórmula (I) é caracterizado por consistir na sequência de aminoácidos entre os aminoácidos 148 ou 150 e o aminoácido 321. Estes dois fragmentos podem ser encontrados nos sobrenadantes de células RPMI 8866 e portanto corresponde ao IgE-BF natural.

Os fragmentos podem ter uma metionina ligada ao extremo N especialmente quando obtidos a partir de expressão em E.coli.

Os mutantes dos polipeptídeos do invento são caracterizados pela troca de um (mutante pontual) ou mais, até cerca de 10, dos seus aminoácidos contra um ou mais de outros aminoácidos. Eles são a consequência das correspondentes mutações ao nível do DNA conduzindo a diferentes códons.

Derivados do polipeptídeo do invento são aqueles em que grupos funcionais, tais como grupos amino, hidroxilo, mercapto ou carboxilo, são derivatizados, e.g. glicosilados, acilados, amidados ou esterificados respectivamente. Nos derivados glicosilados um oligossacárido é geralmente ligado à asparagina, serina, treonina e/ou lisina. Os derivados acilados são especialmente acilados por um ácido natural orgânico ou inorgânico, e.g. ácido acético, ácido fosfórico ou ácido sulfúrico, o que normalmente ocorre no grupo amino do extremo N ou em grupos hidroxilo, especialmente de tirosina ou serina, respectivamente. Os ésteres são de alcoóis naturais, e.g. metanol ou etanol.

Ainda outros derivados podem ser sais, especialmente sais farmacologicamente aceitáveis, por exemplo sais de metais, tais como sais de metais alcalinos e de metais alcalino-terrosos, e.g. sais de sódio, potássio, magnésio, cálcio ou zinco, ou sais de amônio formados com amônia ou com uma amina orgânica adequada, como seja uma alquilamina inferior, e.g. trietilamina, hidroxi-alkil inferior-amina, e.g. 2-hidroxietilamina e similares.

Os polipeptídeos com a fórmula

(I) têm actividade de ligação a IgE como pode ser demonstrado pelo ensaio de inibição de rosetas e a ligação a anticorpos monoclonais, e.g. a Mab-135 e Mab-176, os quais são específicos para IgE-BFs. Entre os fragmentos, mutantes e derivados são preferidos aqueles que possuem actividade de ligação a IgE.

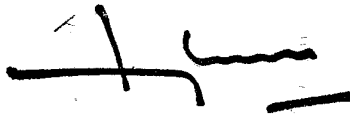
Os polipeptideos do invento são preparados por técnicas de DNA recombinante compreendendo a identificação de um mRNA codificador de tal polipeptideo, preparação de um DNA ou cDNA, construção de um vector hibrido com cDNA, transformação de uma célula hospedeira que permita a expressão do referido vector e isolamento dos referidos polipeptideos.

Deste modo o invento diz respeito ainda a um método para a produção de um polipeptideo com a fórmula (I), um fragmento, um mutante ou um seu derivado, caracterizado por

a) cultivar-se um hospedeiro transformado contendo um vector hibrido compreendendo uma sequência de DNA codificadora de um polipeptideo com a fórmula (I), um seu fragmento ou mutante, ou

b) traduzir-se num sistema de tradução adequado o mRNA codificador de um polipeptideo com a fórmula (I), um seu fragmento ou mutante

e, quando necessário, transformação de um polipeptideo com a fórmula (I), um seu fragmento ou mutante, num seu derivado.



a) Os hospedeiros transformados são seleccionados entre células procarióticas ou eucarióticas, e.g. bactérias, fungos, e.g. leveduras ou células de organismos superiores, incluindo linhas de células humanas. São preferidas estirpes de E. coli, e.g. HB 101, BZ 234, B1472 ou estirpes disponiveis de S.cerevisiae, e.g. RH 971, as quais são transformadas com um vector hibrido codificador de um polipeptideo do invento e contendo promotores, estimuladores, marcas e sequências sinal adequadas e similares.

As células hospedeiras adequadas são cultivadas por métodos conhecidos na especialidade, geralmente num meio liquido contendo fontes assimilaveis de carbono, azoto e sais inorgânicos e, se necessário factores de crescimento adequados.

Para o crescimento de microorganismos pro e eucarióticos transformados podem ser usadas várias fontes de carbono. São exemplos de fontes de carbono preferidas os açúcares assimiláveis, tais como glucose, maltose, manitol ou lactose, ou um acetato, os quais podem ser usados por si só ou em misturas adequadas. São exemplos de fontes de azoto adequadas os aminoácidos, proteínas, por exemplo triptona, peptona ou extratos de carne, extratos de levedura, extratos de malte e também sais de amônio, por exemplo cloroeto ou nitrato de amônio, os quais podem ser usados por si sós ou em misturas adequadas.

O meio contem ainda micronutrientes, por exemplo iões  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $HPO_3^{2-}$ ,  $H_2PO_4^-$ ,  $Cl^-$ ,  $BO_3^{3-}$ , e  $MoO_4^{2-}$ . De preferência adicionam-se substâncias que exerçam uma pressão selectiva e que evitem o crescimento de células que tenham perdido o vector de expressão. Assim, por exemplo, adiciona-se ampiciлина ao meio se o vector de expressão hibrido possuir um ge-

ne amp<sup>R</sup>. A adição de substâncias antibióticas também têm o efeito de não deixar sobreviver microorganismos contaminantes sensíveis ao antibiótico. Se se usar como microorganismo hospedeiro uma estirpe de levedura que seja auxotrófica por exemplo para um aminoácido essencial, o plasmídeo contém de preferência um gene codificador de uma enzima que complementa o defeito do hospedeiro. A cultura da estirpe de levedura é efectuada num meio mínimo deficiente no referido aminoácido.

As células de vertebrados são cultivadas em condições de cultura de tecidos usando meios comerciais (e.g. Gibco, Flow Laboratories) suplementados na maioria dos casos com soro de um mamífero. As células são crescidas em larga escala ligadas a um suporte sólido, como sejam frascos rolantes ("roller bottles"), microveículos ou fibras de vidro poroso ou podem crescer livres em suspensão em recipientes adequados.

A cultura é efectuada por processos que são conhecidos. As condições de cultura, tais como temperatura, valor do pH do meio e tempo de fermentação, são escolhidos de modo a obter-se um título máximo do polipeptídeo do invento. Assim, numa estirpe de E. coli ou de levedura é de preferência cultivada em condições de aerobiose em cultura submersa com agitação a uma temperatura de cerca de 20 a 40°C, de preferência cerca de 30°C e um valor de pH de 4 a 8, de preferência à volta de pH7, durante cerca de 4 a 30 horas, de preferência até se atingirem produções máximas do polipeptídeo do invento.

b) O mRNA codificador de polipeptídeo do invento pode ser traduzido e expresso num sistema de tradução adequado como sejam oócitos de Xenopus laevis. O mRNA codificador dos po-

lipeptideos do invento é microinjectado em oócitos de Xenopus laevis. Os oócitos transformados são incubados em solução de Barth, suplementada com FCS a cerca de 20°C durante cerca de 45 horas. Após remoção do meio de incubação os oócitos foram homogeneizados em tampão de lise de oócitos e centrifugados. O sobrenadante contém os polipeptideos do invento como se pode mostrar por um ensaio de RIA usando anticorpos monoclonais. Este método para produção dos polipeptideos do invento é útil principalmente para fins de identificação.

Quando o nível do polipeptideo do invento atinge um máximo, a cultura é interrompida e pode-se isolar o polipeptideo. Se o polipeptideo for usado com uma sequência de peptideo sinal adequada, ele é secretado pela célula directamente para o sobrenadante. Se assim não for as células têm de ser destruídas, por exemplo por tratamento, com um detergente, como seja SDS ou triton ou lisadas com lisozima ou uma enzima que actue de modo semelhante. Se se usar a levedura como microorganismo hospedeiro a parede celular pode ser removida por digestão enzimática com uma glucosidase. Como alternativa ou em adição pode-se usar para rebentar as células forças mecânicas, por exemplo forças de acasalamento (por exemplo prensa X, prensa Francesa, moinho Dyno) ou agitação com contas de vidro ou óxido de alumínio ou alternando congelação, por exemplo em azoto líquido, e descongelação, assim como ultra-sons. As proteínas do sobrenadante de células ou a mistura obtida quando do rebentamento de células, incluindo os polipeptideos do invento, são enriquecidos por métodos bem conhecidos na especialidade, em particular o tratamento com polietileneimina, centrifugação e precipitação com sais, e.g. sulfato de amónio ou sais de zinco. Outros passos de purificação são por exemplo, ultracentrifugação, diafiltração, electroforese em gel, processos cromatográficos como seja cromatografia de permuta ió-





A numeração corresponde à numeração da fórmula (I). Os aminoácidos designados por X não foram determinados, no entanto por comparação com as sequências de DNA da fórmula II ou III podem-se fazer as seguintes designações:  $X_{149} = R$ ,  $X_{151} = E$ ,  $X_{155} = S$ ,  $X_{160} = C$ ,  $X_{163} = C$ . A análise permite a conclusão de que IgE-BF natural consiste em pelo menos dois polipeptídeos com as sequências de aminoácidos estendendo-se entre  $L_{148}$  e  $S_{321}$  e entre  $M_{150}$  e  $S_{321}$  (fórmula I) e que ocorrem numa proporção de cerca de 40 a 60.

Finalmente, a actividade de ligação a IgE da proteína isolada pode ser determinada por métodos bem conhecidos, e.g. pelos ensaios de inibição de rosetas, pelo bloqueamento da ligação de IgE a anticorpos anti-IgE, experiências de cromatografia de afinidade e experiências que meçam a supressão da síntese in vitro de IgE por linfócitos de indivíduos alérgicos.

Polipeptídeos do invento tendo a sequência correcta, apesar do enrolamento tridimensional errado, são úteis como intermediários em experiências de renaturação.

O invento está também relacionado com um polipeptídeo da fórmula (I), um seu fragmento, mutante ou derivado, sempre que obtido de acordo com um processo do invento.

#### Preparação de hospedeiros transformados

O invento relaciona-se ainda com

um método de passos múltiplos para a preparação de um hospedeiro transformado capaz de expressar um polipeptídeo do invento, caracterizado por

1. preparação de um DNA codificador de um polipeptídeo com a fórmula (I), um seu fragmento, mutante ou derivado,
2. incorporação do DNA obtido num vector adequado,
3. transformação de um hospedeiro adequado com o vector híbrido obtido,
4. selecção dos hospedeiros transformados de entre os não transformados e, facultativamente, isolamento do vector híbrido a partir do hospedeiro transformado, modificação da região codificadora ou não codificadora do vector híbrido e realização dos passos 3 e 4 outra vez.

Os passos envolvidos na preparação dos hospedeiros estão discutidos mais detalhadamente abaixo. O invento inclui também os passos isolados.

1. Preparação de um DNA codificador de um polipeptídeo do invento

O invento diz respeito a um DNA codificador de um polipeptídeo da fórmula I, um seu fragmen-

to, mutante ou derivado e métodos para a preparação.

O DNA codificador de um polipeptídeo do invento pode ser obtido a) por transcrição reversa de mRNA isolado em cDNA, b) por isolamento a partir de DNA genômico ou c) por síntese química.

No presente invento, desde que fosse desconhecida a estrutura do DNA, este tinha de ser obtido a partir de DNA genômico ou de uma biblioteca de cDNA através do mRNA. Uma biblioteca de cDNA contém a informação genética que é complementar do mRNA isolado a partir de células.

a) Transcrição reversa de mRNA isolado para cDNA

Para se obter uma biblioteca de cDNA isola-se mRNA a partir de células que expressem actividade de ligação a IgE, especialmente células B humanas e linhas celulares que delas derivem. Este mRNA é convertido em cDNA de cadeia dupla. Uma linha de células B humana preferida é RPMI 8866. Outras linhas de células B úteis podem ser preparadas por imortalização de células B naturais com o vírus Epstein-Barr. Na preparação de mRNA aplicam-se métodos convencionais bem conhecidos. A membrana celular é rebentada e o conteúdo da célula libertado e a partir dele isolado o mRNA. A membrana celular é de preferência rebentada por métodos físicos ou por lise com detergentes tais como SDS, tiocianato de guanidínio, condições salinas definidas ou homogeneização, de preferência por mistura. O mRNA é isolado pelos métodos convencionais de extracção com fenol, precipitação com etanol, centrifugação e cromatografia, de preferên

cia uma combinação de vários métodos. A centrifugação é de preferência feita em gradientes por exemplo sobre um gradiente de CsCl. Para cromatografia usam-se de preferência colunas, especialmente colunas de oligo-dT.

O mRNA total pode ser convertido directamente em ds-cDNA seguindo os métodos convencionais. De preferência o mRNA codificador de um polipeptideo do invento é ainda enriquecido usando várias técnicas, tais como electroforese, cromatografia e centrifugação, de preferência centrifugação em gradientes de sacarose.

As fracções contendo mRNA codificador de um polipeptideo do invento podem ser detectadas por vários métodos, como seja tradução *in vivo* ou *in vitro* seguido de detecção da actividade de factor de ligação a IgE ou, uma vez conhecida a sequência de nucleotideos por hibridação com um oligonucleotideo sonda.

Os sistemas de tradução *in vivo* podem ser sistemas prócarióticos ou eucarióticos. Um sistema de tradução *in vivo* preferido é o sistema de oócitos de Xenopus laevis conforme descrito por Maniatis et al (1). Os sistemas de *in vitro* podem ser por exemplo lisados de reticulócitos de coelho ou de gérmen de trigo ambos comerciais.

Os sistemas de detecção para rastreio da propriedade de factor de ligação a IgE usam de preferência anticorpos monoclonais contra o polipeptideo da fórmula (I), especialmente Mab-135 ou Mab-176. Um outro sistema possivel usa imunoglobulinas do tipo IgE em imunoensaios convencionais.

A partir de qualquer conjunto de

mRNA derivado de mRNA não fraccionado ou fraccionado pode-se obter ds-cDNA por métodos bem conhecidos na especialidade. Os métodos gerais preferidos estão descritos por Maniatis et al. (1), Okayama e Berg (2) e Heidecker et al. (3). Em geral o mRNA é convertido primeiro em ss-cDNA usando a enzima transcriptase reversa e depois em cDNA de cadeia dupla usando as enzimas transcriptase reversa ou DNA polimerase I (fragmento Klenow). Neste invento o processo é de preferência feito de acordo com o método descrito por Maniatis et al. (1). Em alternativa podem ser usados dois métodos para iniciar a síntese do ds-cDNA. O primeiro método usa a formação de uma ansa natural do ss-cDNA. O segundo método é feito dotando o ss-cDNA com uma cauda homopolimérica como seja poli-dC ou poli-dT.

A fracção de mRNA da qual o correspondente polipeptideo mostre a actividade mais alta no sistema de detecção é transcrita em cDNA complementar por métodos bem conhecidos. Misturam-se o mRNA e o oligo-dT como iniciador. Depois, adicionam-se dNTPs como material de partida e a síntese da molécula híbrida de cDNA-mRNA é realizada pela enzima transcriptase reversa. As moléculas de RNA são degradadas pela adição de NaOH. Mistura-se DNA polimerase, de preferência o fragmento Klenow da DNA polimerase I e a mistura é incubada a uma temperatura adequada, de preferência 12-15°C. A mistura é incubada com nuclease S1 e obtido o ds-cDNA correspondente ao mRNA codificador de um polipeptideo do invento.

Para amplificação e elucidação da estrutura o ds-cDNA obtido é introduzido num vector adequado, e.g. o plasmideo pUC-KO e o vector híbrido obtido é multiplicado pelo uso de um hospedeiro adequado, e.g. E. coli HB101, conforme aqui é descrito mais detalhadamente. O reisolamento



150 160  
L R E E V T K L R M E L Q V S S G F V C  
CTCCGGGAGGAGGTGACAAAGCTAAGGATGGAGTTGCAGGTGCCAGCGGCTTTGTGTGC  
430 440 450 460 470 480

170 180  
N T C P E K W I N F Q R K C Y Y F G K G  
AACACGTGCCCTGAAAAGTGGATCAACTTCCAACGGAAGTGCTACTACTTCGGCAAGGGC  
490 500 510 520 530 540

190 200  
T K Q W V H A R Y A C D D M E G Q L V S  
ACCAAGCAGTGGGTCCACGCCCGGTATGCCTGTGACGACATGGAAGGGCAGCTGGTCAGC  
550 560 570 580 590 600

210 220  
I H S P E E Q D F L T K H A S H T G S W  
ATCCACAGCCCGGAGGAGCAGGACTTCTGACCAAGCATGCCAGCCACACCGGCTCCTGG  
610 620 630 640 650 660

230 240  
I G L R N L D L K G E F I W V D G S H V  
ATTGGCCTTCGGAAGTGGACCTGAAGGGAGAGTTTATCTGGGTGGATGGGAGCCATGTG  
670 680 690 700 710 720

250 260  
D Y S N W A P G E P T S R S Q G E D C V  
GACTACAGCAACTGGGCTCCAGGGGAGCCACCAGCCGGAGCCAGGGCGAGGACTGCCGTG  
730 740 750 760 770 780

270 280  
M M R G S G R W N D A F C D R K L G A W  
ATGATGCGGGGCTCCGGTCCGCTGGAACGACGCCTTCTGCCACCGTAAGCTGGGCGCCTGG  
790 800 810 820 830 840

290 300  
V C D R L A T C T P P A S E G S A E S M  
GTGTGCGACCGGCTGGCCACATGCACGCCGCCAGCCAGCGAAGTTCCGCGGAGTCCATG  
850 860 870 880 890 900

310 320  
G P D S R P D P D G R L P T P S A P L H  
GGACCTGATTCAAGACCAGACCCTGACGGCCGCTGCCACCCCTCTGCCCTCTCCAC-  
910 920 930 940 950 960



S  
TCTTGAGCATGGATACAGCCAGGCCAGAGCAAGACCCTGAAGACCCCAACCACGGCCT  
970 980 990 1000 1010 1020  
AAAAGCCTCTTTGTGGCTGAAAGGTCCTGTGACATTTTCTGCCACCCAAACGGAGGCAG  
1030 1040 1050 1060 1070 1080  
CTGACACATCTCCCGCTCCTCTATGGCCCTGCCTTCCCAGGAGT<sup>R</sup>ACACCCCAACAGCAC  
1090 1100 1110 1120 1130 1140  
CCTCTCCAGATGGGAGTGCCCCAACAGCACCTCTCCAGATGAGAGT<sup>R</sup>ACACCCCAACAG  
1150 1160 1170 1180 1190 1200  
CACCTCTCCAGATGCAGCCCCATCTCCTCAGCACCCCAGGACCTGAGTATCCCCAGCTC  
1210 1220 1230 1240 1250 1260  
AGGGTGGTGAATCCTCCTGTCCAGCCTGCATCAATAAAATGGGGCAGTGATGGCC  
1270 1280 1290 1300 1310 1315

Na sequência de DNA com a fórmula II a região codificadora do polipeptídeo com a fórmula (I) está marcada pelos símbolos de aminoácidos. As regiões delimitantes não codificadoras também são partes da região não codificadora do mRNA isolado. Os locais de restrição  $\downarrow$ ,  $\downarrow$ , e  $\downarrow$  estão apresentados.

O outro cDNA obtido a partir do mRNA tem a sequência da fórmula (III), em que os nucleotídeos codificadores dos aminoácidos 106 a 127 do polipeptídeo da fórmula (I), i.e. nucleotídeos 316 a 378 da fórmula (II), estão eliminados e em que aliás a região codificadora e parte das duas sequências delimitantes são idênticas à sequência de DNA da fórmula (II). Esta inserção de cDNA foi encontrada em pCL-1 e tem a sequência com a fórmula (III):

CTAACCACGCTAGTGAGTCAGATTGTAGACTAAACAAAATCAGCCAA  
-227 -220 -210 -200 -190

ATCGGCCCCTGAGTGCCACCAAGTCCCAGATGCTATCCTGTCTGGTAACTAGGGTTTGA  
-180 -170 -160 -150 -140 -130

TGGCTCACCTAACCATCATTAAATTCCAAATCAGCCAGAGCTGTGATTGTGCCCGCTGA  
-120 -110 -100 -90 -80 -70

GTGACTGCGTTGTCAGGGAGTGAGTGCTCCATCATCGGGAGAATCCAAGCAGGACCGCC  
-60 -50 -40 -30 -20 -10 -1

1 10 20 30 40 50 60  
M E E G Q Y S E I E E L P R R R C C R R  
ATGGAGGAAGGTCAATATTCAGAGATCGAGGAGCTTCCCAGGAGCGGTGTTGCAGGCGT

30 40  
G T Q I V L L G L V T A A L W A G L L T  
GGGACTCAGATCGTGCTGCTGGGGCTGGTGACCGCCGCTCTGTGGGCTGGGCTGCTGACT  
70 80 90 100 110 120

50 60  
L L L L W H W D T T Q S L K Q L E E R A  
CTGCTTCTCCTGTGGCACTGGGACACCACACAGAGTCTAAAACAGCTGGAAGAGAGGGCT  
130 140 150 160 170 180

70 80  
A R N V S Q V S K N L E S H H G D Q M A  
GCCCGBAAGTCTCTCAAGTTTCCAAGAAGTGGAAAGCCACCACGGTGACCAGATGGCG  
190 200 210 220 230 240

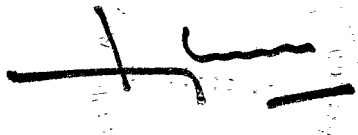
90 100  
Q K S Q S T Q I S Q E L E E L R A E Q Q  
CAGAAATCCCAGTCCACGCAGATTCACAGGAAGTGGAGGAAGTTCGAGCTGAACAGCAG  
250 260 270 280 290 300

110 120  
R L K S Q E L N E R N E A S D L L E R L  
AGATTGAAATCTCAGGAATTGAACGAGAGGAACGAAGCTTCAGATTGCTGGAAAGACTC  
310 320 330 340 350 360

130 140  
R E E V T K L R M E L Q V S S G F V C N  
CGGGAGGAGGTGACAAAGCTAAGGATGGAGTTGCAGGTGTCCAGCGGCTTTGTGTGCAAC  
370 380 390 400 410 420

150 160  
T C P E K W I N F Q R K C Y Y F G K G T  
ACGTGCCCTGAAAAGTGGATCAACTTCCAACGGAAGTGTACTACTTCCGCAAGGGCACC  
430 440 450 460 470 480

170 180  
K Q W V H A R Y A C D D M E G Q L V S I  
AAGCAGTGGGTCCACGCCGGTATGCCTGTGACGACATGGAAGGGCAGCTGGTTCAGCATC  
490 500 510 520 530 540



190 200  
H S P E E Q D F L T K H A S H T G S W I  
CACAGCCCGGAGGAGCAGGACTTCCTGACCAAGCATGCCAGCCACACCGGCTCCTGGATT  
550 560 570 580 590 600

210 220  
G L R N L D L K G E F I W V D G S H V D  
GGCCTTCGGAACCTTGACCTGAAGGGAGAGTTTATCTGGGTGGATGGGAGCCATGTGGAC  
610 620 630 640 650 660

230 240  
Y S N W A P G E P T S R S Q G E D C V M  
TACAGCAACTGGGCTCCAGGGGAGCCCACCAGCCGGAGCCAGGGCCGAGGACTGCGTGATG  
670 680 690 700 710 720

250 260  
M R G S G R W N D A F C D R K L G A W V  
ATGCGGGGCTCCGGTCGCTGGAACGACGCCTTCTGCGACCGTAAGCTGGGCGCCTGGGTG  
730 740 750 760 770 780

270 280  
C D R L A T C T P P A S E G S A E S M G  
TGCGACCGGCTGGCCACATGCACGCCGCCAGCCAGCGAAGGTCCGCGGAGTCCATGGGA  
790 800 810 820 830 840

290 300  
P D S R P D P D G R L P T P S A P L H S  
CCTGATCAAGACCAGATCCTGACGGCCGCTGCCACCCCTCTGCCCTCTCCACTCT  
850 860 870 880 890 900

TGAGCATGGATACAGCCAGGCCAGAGCAAGACCCTGAAGACCCCAACCACGGCCTAAA  
910 920 930 940 950 960

AGCCTCTTTGTGGCTGAAAGGTCCCTGTGACATTTTCTGCCACCCAAACGGAGGCAGCTG  
970 980 990 1000 1010 1020

ACACATCTCCCGCTCCTCTATGGCCCCTGCCTTCCCAGGAGTACACCCCAACAGCACCT  
1030 1040 1050 1060 1070 1080

CTCCAGATGGGAGTGCCCAACAGCACCTCTCCAGATGAGAGTACACCCCAACAGCAC  
1090 1100 1110 1120 1130 1140

CCTCTCCAGATGCAGCCCATCTCCTCAGCACCCAGGACCTGAGTATCCCAGCTCAGG  
1150 1160 1170 1180 1190 1200

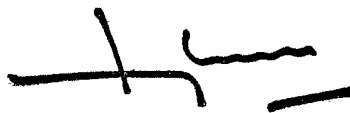
GTGGTGAGTCCTCCTGTCCAGCCTGCATCAATAAAATGGGGCAGTGATGGCC  
1210 1220 1230 1240 1250

b) Um outro meio adequado para a obtenção do DNA codificador de um polipeptideo do invento consiste no isolamento do referido DNA a partir do DNA genômico de tecido ou de cultura de células. As células são lisadas, de preferência com SDS e pro

teinase K e o DNA é desproteínizado por extracções repetidas com fenol. O RNA é de preferência digerido com RNase. O DNA bruto obtido é parcialmente digerido com enzimas de restrição adequadas, e.g. Hae III e Alu I e isolam-se os fragmentos de 15-20 kb, multiplicam-se num fago ou cosmideo adequado, e.g. em Charon 4A ou no fago EMBL-3 e testam-se relativamente às sequências pretendidas, e.g. com uma sonda de DNA marcada radioactivamente ou conforme aqui já foi descrito.

c) Um terceiro método para a preparação do DNA codificador de um polipeptideo do invento é a síntese química. A síntese química de DNA está apresentada de forma sumária por S.A. Narang (4). As técnicas de síntese conhecidas permitem a preparação de polinucleotideos até 40 ou 60 bases com bom rendimento, pureza elevada e num tempo relativamente curto. Os nucleotideos adequadamente protegidos são ligados pelo método fosfotriéster de K.L. Agarwal et al. (5), pelo método fosfotriester de C.B. Reesem (6) ou pelo método de fosfito triester de R.L. Letsinger et al. (6a). A simplificação da síntese de oligonucleotideos e polinucleotideos é possível pelo método de fase sólida, no qual as cadeias de nucleotideos são ligadas a um polímero adequado. É vantajoso a utilização de uma máquina sintetizadora de DNA

O DNA de cadeia dupla pretendido pode ser construído enzimáticamente a partir de pequenos fragmentos sobreponíveis preparados por síntese química. Por exemplo, de acordo com Khorana et al. (7), usam-se sequências de polinucleotideos sobreponíveis de ambas as cadeias, as quais são mantidas juntas no arranjo correcto por emparelhamento de bases e são então ligadas quimicamente pela enzima DNA ligase. Uma outra possibilidade compreende a incubação em cada caso de uma sequência polinucleotídica das duas cadeias



de DNA com um pequeno segmento sobreponível na presença dos quatro trifosfatos de desoxinucleosídeo com uma DNA-polimerase, por exemplo DNA polimerase I, o fragmento Klenow da polimerase I ou DNA polimerase de T4 ou com transcriptase reversa. As duas seqüências de nucleotídeos são assim mantidas juntas do arranjo correcto por emparelhamento de bases e são suplementadas com os nucleotídeos necessários pela enzima para dar um DNA de cadeia dupla completo (S.A. Narang et al (8)).

d) Preparação de DNAs codificadores de um fragmento do polipeptídeo com a fórmula (I)

Obtêm-se DNAs codificadores de um fragmento do polipeptídeo com a fórmula (I) em que o DNA com a fórmula (II) ou (III), ou um vector que os contenha é digerido com uma enzima de restrição adequada e/ou uma exonuclease adequada e, quando necessário, o fragmento de DNA obtido é suplementado com um fragmento de DNA sintetizado por métodos químicos, ou o fragmento pretendido é totalmente sintetizado por métodos químicos.

Na fórmula (II) estão apresentadas as enzimas de restrição adequadas e os seus sítios de restrição. Para a preparação dos fragmentos de DNA codificadores da seqüência polipeptídica D<sub>119</sub> a S<sub>321</sub> da fórmula (I), são adequadas BglIII e RsaI. O fragmento de DNA codificador da seqüência polipeptídica A<sub>134</sub> a S<sub>321</sub> pode ser obtido por restrição com HindIII e RsaI (ver Fórmula II, Fig. 4). A preparação dos fragmentos de DNA também pode ser conseguida passo por passo, em que primeiro se prepara um fragmento maior, e.g. por restrição com HincII e RsaI, o qual é subclonado num vector adequado, que é consequentemente cortado com BglIII e Bam-

HI, ou HindIII, respectivamente (ver Fig. 3 e 4).

A síntese química, total ou parcial, em combinação com a utilização de enzimas de restrição e/ou exonucleases, permite a preparação de qualquer fragmento de DNA pretendido incluído na fórmula (II).

O invento diz ainda respeito a fragmentos de DNA do DNA da fórmula (II). Os fragmentos são codificadores de um polipeptídeo tendo actividade de ligação a IgE ou podem ser usados como sondas para identificação de tal DNA a partir de fontes naturais ou sintéticas. São preferidos os fragmentos de DNA que codificam os fragmentos polipeptídicos preferidos incluídos na fórmula (I). As sondas de DNA têm pelo menos 7, de preferência cerca de 15, nucleotídeos na sequência.

## 2. Preparação de um vector híbrido

Preparou-se um vector híbrido do invento em que um DNA codificador de um polipeptídeo com a fórmula (I), um seu fragmento, mutante ou derivado foi introduzido num vector adequado.

Vectores adequados são veículos para DNA "passageiro" integrado, os quais podem ser usados para transformar um microorganismo hospedeiro, incluindo células humanas e que se podem replicar dentro do hospedeiro. São adequados como vectores, os plasmídeos, fagos ou cosmídeos. Os vectores adequados transportam o DNA da inserção numa posição definida.

Em geral, tais vectores contêm um replicação e uma sequência de controle, i.e. um promotor, que são derivados de espécies compatíveis com a célula hospedeira em que são usados. O vector normalmente transporta um sitio de replicação, assim como sequências (marcas genéticas) que são capazes de proporcionar selecção fenotípica em células transformadas. Marcas genéticas adequadas conferem ao hospedeiro, por exemplo, resistência a antibióticos ou a metais pesados ou podem complementar um defeito genético do hospedeiro. Outras sequências uteis em tais vectores sequências estimuladoras e activadoras.

Os vectores de partida são adequados ao uso em células hospedeiras numa larga gama de organismos procarióticos e eucarióticos. O vector é seleccionado dependendo das células hospedeiras destinadas à transformação.

Os vectores de partida preferidos são DNA de plasmideos e DNA de bacteriófagos facilmente adquiridos. São particularmente úteis o plasmideo pBR322 e seus derivados. Tais derivados são por exemplo, os plasmideos pUC-8, pUC-9, pMB-9, pGEM<sup>TM</sup>-1 e pGEM<sup>TM</sup>-2. De entre os vectores bacteriófágicos são preferidos os DNAs dos fagos lambda, por exemplo, o DNA do fago lambda gt-11. Outros fagos adequados são Charon 4A e o fago EMBL-3. Os sistemas de clonagem em lambda estão descritos por Maniatis et al. (1).

Um vector transportando um DNA passageiro como seja o da fórmula (II) ou (III) é designado como vector híbrido.

O DNA obtido é introduzido no vector de partida por métodos convencionais.

Um plasmideo de partida, por exemplo, é primeiro linearizado por uma enzima de restrição adequada, e.g. o plasmideo pUC-KO por PstI, depois provido de caudas dG na presença de dGTP e transferase terminal de desoxinucleotídeos. A inserção de cDNA de cadeia dupla é dotada de caudas dC na presença de dCTP e transferase terminal de desoxinucleotídeos. Combinando ambos, cDNA e vector, resulta no vector híbrido. Preferem-se os bacteriófagos, como seja lambda, para a construção de bibliotecas genómicas. Os sistemas de clonagem em lambda estão descritos por Maniatis et al. (1). O DNA vector adequado é digerido totalmente com a enzima de restrição adequada e os braços esquerdo e direito são separados dos fragmentos centrais por centrifugação em gradientes por velocidade ou electroforese em gel. Um outro método é digerir partes dos fragmentos stuffer com enzimas de restrição que não possuam locais de reconhecimento no braço esquerdo e direito. O DNA genómico isolado é parcialmente digerido em fragmentos de 15-20 kb de comprimento. Depois disto os braços são ligados com os fragmentos de DNA estranho tendo extremos compatíveis com os dos braços.

A inserção de DNA adequada é reclo-nada a partir do vector original usado para a clonagem original num vector de expressão adequado. Para tal, usam-se enzimas de restrição adequadas (Fig. 3 e 4), eventualmente em combinação com exonucleases, em particular Bal31, para produzir os fragmentos de DNA pretendidos. Estes fragmentos são integrados num vector de expressão adequado usando os extremos coesivos directamente ou pela adição de fontes oligonucleotídicas adequadas obtidas por síntese química. Para a modificação dos extremos pode-se usar por exemplo HindIII e Bgl-II. O método não está limitado a estas enzimas de restrição em especial. Qualquer elo de ligação que se pretenda pode ser feito entre o vector de expressão e a inserção de DNA usando



enzimas de restrição adequadas em combinação com oligonucleotídeos obtidos por síntese química.

O invento também está relacionado com um vector híbrido com um DNA codificador de um polipeptídeo com a fórmula (I), um seu fragmento mutante ou derivado, operacionalmente ligado a uma sequência de controle da expressão.

Para a expressão usa-se um vector híbrido de expressão adequado. O termo vector híbrido de expressão inclui vectores especiais os quais são capazes de expressar as sequências de DNA neles contidas, sempre que tais sequências estejam operacionalmente ligadas a outras sequências capazes de efectuar a sua expressão, i.e., sequências de operador, estimulador e promotor. Resumindo, os vectores de expressão são caracterizados numa definição funcional: qualquer sequência de DNA que seja capaz de efectuar a expressão da sequência de DNA específica nele incluída. O invento pretende incluir todas as formas de vectores híbridos de expressão que possam ser feitas a partir de um vector de expressão conhecido e equivalentes funcionais contendo as inserções de DNA codificadoras de um polipeptídeo do invento.

Pode-se usar várias sequências de controle da expressão para a regulação da expressão genética. Os vectores de expressão microbianos contêm normalmente promotores que são usados pelo hospedeiro microbiano para a expressão das suas próprias proteínas. Os promotores mais vulgarmente usados nas construções de DNA recombinante incluem os sistemas de promotores da  $\beta$ -lactamase e da lactose (Chang et al. (9); Goeddel et al. (10)), o sistema promotor do triptofano (trp) (Goeddel et al. (11)) ou um sistema promotor de bacteriófago como seja o promotor  $P_L$  de lambda. Se bem que estes sejam os mais vulgarmente usados, foram descobertos

e utilizados outros promotores microbianos e publicados os detalhes respeitantes às suas seqüências de nucleotídeos permitindo ao técnico especializado ligá-los funcionalmente com plasmídeos vectores (Sielbenlist et al. (12)). Em princípio, são adequados todos os vectores que se repliquem e expressem os polipeptídeos do invento no hospedeiro escolhido. São exemplos de vectores adequados à expressão do referido polipeptídeo os plasmídeos pKK223-3, pDR720 e pPL-lambda ou os vectores do bacteriófago lambda tais como  $\lambda$ -gt11, todos comerciais (Pharmacia, Sweden; Promega Biofec, USA). Os vectores preferidos do presente invento são os vectores de expressão e secreção do tipo pIN-ompA (Gharayeb et al. (13)) e vectores contendo o promotor PL.

Os vectores que são adequados à replicação e expressão em levedura contem um ou mais, e.g. dois, origem de replicação de levedura e uma ou mais marcas genéticas selectivas para levedura. Os vectores híbridos que contem uma origem de replicação de levedura, por exemplo um segmento de replicação autónoma (ars1) ou a 2  $\mu$  ori, são mantidos extracromossómicamente dentro da célula de levedura após transformação e são replicados autónomamente. As marcas genéticas adequadas para leveduras são particularmente as que conferem resistência a antibióticos ao hospedeiro ou no caso de mutantes de levedura auxotróficos, genes que complementem lesões do hospedeiro. Genes correspondentes conferem, por exemplo, resistência ao antibiótico ciclo-heximida ou proporcionam protrofia num mutante de levedura auxotrófico por exemplo os genes URA3, LEU2, HIS3 ou, em particular o gene TRP1. Os vectores híbridos de levedura contêm ainda, de preferência, uma origem de replicação e uma marca genética para um hospedeiro bacteriano, em particular E.coli, de modo a que a construção de clonagem dos vectores híbridos e seus intermediários possa ter lugar também num hospedeiro bacteriano

(vectores vai-vem). As sequências de controle da expressão que são adequadas à expressão em levedura são, por exemplo, as de genes de levedura altamente expressos. Assim podem ser usados os promotores do gene TRP1, do gene ADHI ou ADHII, do gene da fosfatase (PH03 ou PH05), do gene do isocitocromio ou um promotor envolvido na via glicolítica, como seja o promotor da enolase, da gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) ou 3-fosfoglicerato cinase (PGK).

Os vectores preferidos contêm promotores que podem ser ligados ou desligados por variação das condições de crescimento. Por exemplo o promotor PH05 pode ser reprimido ou desreprimido apenas aumentando ou diminuindo a concentração de fosfato inorgânico no meio.

Os vectores de expressão para tais células geralmente incluem uma unidade estimulador/promotor versátil e forte situada antes do gene a ser expresso. Se o cDNA tiver de ser expresso, adiciona-se aos genes locais de "splicing", locais de poliadenilação e eventualmente uma sequência terminadora da transcrição. Para usar em células de mamífero as funções de controle nos vectores de expressão são muitas vezes fornecidas por material viral. Por exemplo as unidades estimulador-promotor vulgarmente usadas são derivadas do vírus Simio 40 (SV40), do vírus do sarcoma de Rous, Adenovirus 2 ou citomegalóvírus de murganho ou humano. Em particular são adequados a unidade estimulador-promotor do gene precoce imediato de citomegalovírus de murganho e o estimulador de SV40 combinado com o promotor da  $\alpha$ -globina humana. Em adição são úteis os promotores induzíveis como sejam os derivados dos genes de choque térmico ou de metalotio-nina. Ainda é também possível utilizar sequências de promotor ou de controle que normalmente estão associadas à sequência do gene pretendido. Uma origem de replicação pode ser

proporcionada quer pela construção do vector de modo a incluir uma origem exógena, como seja uma derivada do SV40 ou de outra fonte viral (e.g. polioma, adeno, VSV, SPV, etc) ou proporcionada pelo mecanismo de replicação cromossômica da célula hospedeira. Se o vector fôr integrado no cromossoma da célula hospedeira este ultimo método é muitas vezes suficiente.

O reisolamento do DNA do vector contendo a inserção de DNA clonado a partir de um hospedeiro é conseguido de acordo com métodos convencionais, em particular pela lise da célula hospedeira e purificação do DNA por centrifugação em particular centrifugação em gradientes de densidade de CsCl e extracção com fenol/clorofórmio.

O invento está também relacionado com vectores híbridos compreendendo como inserção uma sequência de DNA codificadora de um polipeptideo com a fórmula (I) ou um seu fragmento, mutante ou derivado.

Em particular, o invento diz respeito a um vector híbrido compreendendo como inserção uma sequência de DNA codificadora de um fragmento do polipeptideo com a fórmula (I), caracterizado por a inserção codificar:

um polipeptideo com a fórmula (I), em que a sequência de aminoácidos compreendendo os aminoácidos 106 a 127 foi eliminada; ou

um fragmento do polipeptideo com a fórmula (I), o qual é seleccionado do grupo constituído por polipeptideos que começam com qualquer um dos aminoácidos 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 ou 160 e terminando com qualquer um dos aminoácidos entre 282 e 321; ou

um fragmento do polipeptideo com a fórmula (I), o qual consiste na sequência de aminoácidos entre o aminoácido 119 e o aminoácido 321; ou

um fragmento do polipeptideo com a fórmula (I), o qual consiste na sequência de aminoácidos entre o aminoácido 134 e o aminoácido 321; ou

um fragmento do polipeptideo com a fórmula (I) o qual consiste na sequência de aminoácidos entre o aminoácido 148 e o aminoácido 321; ou

um fragmento do polipeptideo com a fórmula (I) que consiste na sequência de aminoácidos entre o aminoácido 150 e o aminoácido 321.

Em particular o invento diz respeito a um vector hibrido compreendendo uma sequência de DNA com a fórmula (II) ou (III) ou um seu fragmento ou mutante.

Vectores hibridos especificos são pCL2, pCL1, pFK-1, pFK-2, pPL-BF, pJDB207R/PH05-BF, pCAL5-R/ND, pCAL8-BF/ND e pPL.PTIS-BF (Fig. 1 a 8).

Outro vector híbrido de acordo com o invento compreende uma sequência de DNA de pelo menos 12 ácidos nucleicos que são 100% homólogos de uma parte da inserção com a fórmula (II).

### 3. Transformação de um hospedeiro

A seguir a um vector de expressão forte usa-se uma célula hospedeira compatível para a expressão do polipeptídeo pretendido do invento. Em geral preferem-se os procariotas para a clonagem das sequências de DNA e montagem dos vectores. Os vectores montados são então transferidos para células hospedeiras adequadas, pelo que podem ser usadas células procarióticas assim como eucarióticas. As espécies microbianas que podem ser usadas incluem E.coli, Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus e outras enterobacteriáceas, como sejam Salmonella typhimurium ou Serratia marcesans e várias espécies de pseudomonas. Em particular são úteis as estirpes de E. coli tais como E. coli B, HB101, BZ234, X1776, W3110, JA221 e K12. Certamente que estes exemplos são apenas ilustrativos e não limitantes.

Além de procariotas também podem ser usados microorganismos eucarióticos, por exemplo leveduras. Saccharomyces cerevisiae, ou a vulgar levedura de padreiro é o microorganismo eucariótico mais usado, ainda que possam ser usadas uma série de outras espécies. Para a expressão em Saccharomyces, pode-se usar por exemplo o plasmídeo YR<sub>p</sub> 7 (Stinchomb et al. (14); Kingsman et al. (14a), Tschemper et al. (15)).

Além dos microorganismos podem ser usadas como hospedeiros culturas celulares derivadas de organismos multicelulares. Em principio pode-se trabalhar com qualquer uma dessas culturas, quer de vertebrados quer de invertebrados; no entanto, são de maior interesse as culturas de células de vertebrados. São exemplos de tais linhas de células hospedeiras úteis, as células Vero e Hela, as linhas celulares de ovário de hamster Chinês (COH), linhas celulares de melanoma de Bowes, e as linhas celulares RPMI 8866 e Cos-7.

A transformação de uma célula recipiente com o DNA do vector híbrido obtido é conseguida por métodos bem conhecidos, e.g. como descrito por Maniatis et al (1). As bactérias são transformadas com o DNA do vector híbrido e.g. pelo método de transformação com CaCl.

Um outro método de transformação adequado para a bactéria hospedeira E.coli, em ligação com o DNA de fagos lambda como vector, é o empacotamento in vitro do DNA do vector híbrido e infecção da referida bactéria. O empacotamento in vitro é principalmente conseguido usando "Kits" de empacotamento comerciais (Pharmacia, Sweden; Boehringer, Mannheim). A infecção é feita pelo método de MgCl<sub>2</sub> conforme descrito por Maniatis (1), página 275.

A transformação de leveduras compreende, por exemplo, os passos de remoção enzimática da parede celular de levedura por meio de glucosidases, tratamento dos esferoplastos obtidos com o vector na presença de polietilenoglicol e iões Ca<sup>2+</sup> e regeneração da parede celular por embebição dos esferoplastos em agar. De preferência o agar de regeneração é preparado de modo a permitir a regeneração e selecção das células transformadas em simultâneo.

A transformação das células de vertebrados crescidos em cultura de tecidos é conseguida usando um de vários métodos bem conhecidos. Pode-se usar a micro-injecção directa do DNA para o nucleo da célula, fusão dos protoplastos de E.coli com a futura célula hospedeira ou a adição de coprecipitados entre DNA e fosfato de cálcio. Pode-se fazer a selecção subsequente de células transformadas usando uma marca selectiva que está covalentemente integrada no vector de expressão ou é adicionada como uma entidade separada. As marcas selectivas incluem genes que conferem resistência a anticorpos tais como G418 e higromicina ou genes que complementem uma lesão genética da célula hospedeira como seja a ausência de timidina cinase ou de hipoxantina fosforribosilo transferase.

#### 4. Selecção de hospedeiros transformados

Os hospedeiros portadores de propriedades das unidades de selecção integradas nos vectores são seleccionados de entre hospedeiros não transformados especialmente por crescimento das bactérias em condições de selecção adequadas nas quais apenas os hospedeiros transformados sobrevivem. Um outro método de selecção em relação aos bacteriofagos é a formação de placas numa sementeira de bacterias hospedeiras E.coli.

O despiste de hospedeiros portadores de um vector hibrido compreendendo como inserção uma sequência de DNA codificadora de um polipeptideo do invento pode ser conseguido usando sondas oligonucleotidicas marcadas radioactivamente codificadoras de um fragmento de tal po-



lipeptideo ou por despiste do produto polipeptidico da referida inserção de DNA. A hibridação é feita especialmente com mRNA ou qualquer outra sonda oligonucleotidica contendo cerca de 12 ou mais nucleotideos cosequativos codificadores de um fragmento de um polipeptideo do invento.

Em particular, a selecção de hospedeiros E.coli transformados pelos vectores hibridos, portadores de uma inserção codificadora de um polipeptideo do invento pode ser efectuada por meio de hibridação de uma sonda oligonucleotidica com réplicas em filtros derivados de uma biblioteca de cDNA que é espalhada em placas de agarose. O oligonucleotideo pode ser marcado no extremo 5' com  $^{32}\text{P}-\alpha\text{ATP}$  usando a enzima T4-cinase ou internamente através de síntese com iniciador com polimerase Klenow usando qualquer fragmento do cDNA codificador de um polipeptideo do invento clonado no fago M13.

O produto proteico para fins de despiste é obtido por tradução in vitro ou in vivo em particular usando o sistema de oócitos de Xenopus laevis, conforme descrito por Maniatis et al. (1). O produto proteico traduzido detecta-se utilizando anticorpos monoclonais, como seja Mab-45, Mab-176 e Mab-135 ou usando um sistema de testes funcional como seja ligação da IgE, ao polipeptideo como é feito no teste de inibição de rosetas por Sarfati et al. (17).

Os fagos recombinantes portadores de uma sequência de DNA para um polipeptideo do invento são identificados por hibridação pela qual uma sequência de ácido nucleico marcada radioactivamente compreendendo um fragmento de DNA codificador do referido polipeptideo é usado na hibridação. Como alternativa eles são detectados por despis-

te imunológico usando anticorpos monoclonais, como sejam Mab-135 e Mab-176.

Modificação da região codificadora ou não codificadora do vector híbrido consegue-se e.g. por métodos aqui descritos, e.g. em 1d).

O invento está ainda relacionado com a utilização de polipeptídeos do invento com actividade de ligação a IgE para o tratamento ou prevenção de doenças alérgicas em pacientes que sejam alérgicos a todos os tipos de antigénios, por exemplo pólenes, pelos de gatos, ácaros do pó da casa e similares. Será particularmente importante o tratamento de pacientes de alto risco durante períodos críticos, incluindo especialmente recém-nascidos de alto risco que não são alimentados ao peito. Os polipeptídeos do presente invento são administrados enteralmente, por exemplo por via nasal, rectal ou oral, ou parenteralmente, por exemplo intramuscular, subcutânea ou intravenosamente, geralmente em formas de unidade de dosagem tais como comprimidos, drageias, ampolas, frascos ou supositórios. A quantidade do polipeptídeo a ser administrada depende da sua actividade específica, do peso e do estado geral do paciente, da gravidade da doença, do modo de administração e tem de ser baseada na avaliação do médico. Em geral pode-se administrar uma dose entre cerca de 100 µg e cerca de 5000 µg por Kg de peso do corpo e por dia.

O invento está ainda relacionado com preparações farmacêuticas contendo os polipeptídeos do invento tendo actividade de ligação a IgE numa quantidade antialérgicamente eficaz facultativamente em conjunto com veículos convencionais farmacêuticamente aceitáveis que sejam adequados à administração oral, rectal, nasal ou parenteral, i.e. administração intramuscular, subcutânea ou intraperito-

neal e que não interfiram prejudicialmente com os ingredientes activos.

Existem comprimidos, capsulas, ampolas contendo um pó sólido ou nebulizadores, vaporizadores, frascos, ampolas e similares contendo soluções de infusão, de preferência soluções aquosas ou suspensões sendo possível prepara-las antes de usar, por exemplo a partir de preparações liofilizadas que contem o ingrediente activo sózinho ou juntamente com um veículo, como seja manitol, lactose, glucose, albumina e similares. A preparação farmaceutica pode ser esterilizada e, caso se pretenda, misturada com aditivos, por exemplo preservativos, estabilizantes, emulsionantes, solubilizantes, tampões e/ou sais para regulação da pressão osmótica. A esterilização pode ser conseguida por filtração estéril através de filtros de poro pequeno (0,45 um de diâmetro ou menos) depois do que a preparação pode ser liofilizada, caso se pretenda. Também se pode adicionar antibióticos para assegurar a preservação da esterilidade.

As preparações farmaceuticas de acordo com o presente invento são distribuidas em formas unitárias de dosagem, por exemplo ampolas, compreendendo 1 a 2000 mg de um veículo farmaceuticamente aceitável por unidade de dosagem e cerca de 1 a 100 mg, de preferência cerca de 2 a 50 mg do ingrediente activo por unidade de dosagem.

O invento também está relacionado com um método para a produção de uma preparação farmaceutica caracterizada por um polipeptideo do invento ser misturado com um veículo farmaceuticamente aceitável.

As preparações farmaceuticas são produzidas de modo conhecido per se, por exemplo por mistura

dissolução, liofilização e processos similares convencionais e contem entre cerca de 0,1% e 100%, especialmente entre cerca de 1% e 50 % de substâncias activas.

É também objectivo do presente invento a utilização de novos polipeptideos do invento no tratamento prófilático e terapeutico do corpo humano.

As abreviaturas usadas ao longo da descrição têm os seguintes significados:

pb	pares de bases
BSA	albumina do soro bovina
cDNA	DNA complementar
cpm	contagens por minuto (decaimento radioactivo)
dA	2'-desoxiadenosina
dATP	trifosfato de 2'-desoxiadenosina
dC	2'-desoxicitidina
dCTP	trifosfato de 2'-desoxicitidina
dG	2'-desoxiguanosina
dGTP	trifosfato de 2'-desoxiguanosina
dT	2'-desoxitimidina
dTTP	trifosfato de 2'-desoxitimidina
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	mistura de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP
ds	cadeia dupla
DTT	1,4-ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético, sal di-sódico

FCS	soro fetal de vitela
HAT	hipoxantina / aminopterina / timidina
HBSS	solução salina equilibrada de Hank
HT	hipoxantina/aminopterina
Hepes	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etenossulfônico
IgE	imunoglobulina E
mRNA	RNA mensageiro
min	minutos
PBS	soro fisiológico tamponado com fosfatos
Pipes	piperazino-N,N'-bis (ácido 2-etanossulfônico)
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonilo
RIA	ensaio radioimune
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluções por minuto
SDS	dodecilsulfato de sódio
ss	cadeia simples
Tris	tris (hidroximetil)aminometano
tRNA	RNA de transferência
ug	micrograma

Os exemplos que se seguem servem para ilustrar o presente invento mas não devem ser pensados como uma limitação dele.

Exemplos

Usaram-se as seguintes soluções tampão e meios:

agar	caldo LB suplemento com 2% de agar
tampão de eluição	10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,2% de SDS
caldo LB	1% Bacto-triptona (Difco), 0,5% Extrato de levedura Bacto (Difco), 170 mM NaCl, ajustado a pH 7,5 com NaOH
solução de lise	0,5 M NaOH, 1,5N NaCl
HBSS	8g NaCl, 400 mg KCl, 48 mg Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 350 mg NaHCO <sub>3</sub> , 60 mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 100 mg de vermelho de fenol em 1 litro de H <sub>2</sub> O.
HBSS-FCS	HBSS suplementado com 10% FCS, 0,01% NaN <sub>3</sub> , 66 mM Tris-HCl pH 7,2
meio HT	meio RPMI/c suplementado com 40 µl de 2-mercaptoetanol, 100 µM hipoxantina, 1 µM timidina
meio HAT	meio HT suplementado com 10 µM aminopterina
MBS-H	88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0,33 mM (CaNO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 0,41 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,82 mM MgSO <sub>4</sub> , 2,4 mM NaHCO <sub>3</sub> , 10 mM HEPES (pH 7,4)
agar Mc Conkey	50 g de agar Mc Conkey pré-misturado (Becton Dickinson) para um litro de água destilada

tampão de lise de oócitos	20 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 0,5% desoxicolato de sódio, 0,1% de metionina, 1 mM PMSF
PBS	1 litro contem 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O, 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
meio RPMI 1640	comercializável pela Gibco
meio RPMI 1640/c	meio RPMI 1640 suplementado com 1% penicilina-estreptomicina (Gibco), 1% L-glutamina (Gibco) e 15% (v/v) FCS (Gibco)
tampão RVT	200 mM Tris-HCl, pH 8,3 a 42°C, 20 mM MgCl <sub>2</sub> , 280 mM KCl, 20 mM DTT
meio SOC	2% Triptona Bacto (Gibco), 0,5% Extrato de levedura (Gibco), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose
tampão SSC	15 mM citrato de sódio, 150 mM NaCl
tampão TBE	1 litro contem 10,8 g Tris, 5,5 g ácido bórico, 4 ml 0,5M EDTA (pH 8,0)
tampão TE	10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA
tampão TNE	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1M NaCl, ajustado a pH 7,8 com NaOH
tampão de lavagem	10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA 0,5M NaCl, 0,2% SDS

Uso de enzimas de restrição e isolamento de DNA

Todas as enzimas de restrição são usadas nas condições de tamponização recomendadas pelo fornecedor na folha de dados da enzima. Em geral, usam-se 3 Unidades de uma enzima para digerir 1 µg de DNA. As incubações são deixadas durante 2 horas a 37°C. Para parar a reação enzimática adiciona-se EDTA e Na-acetato para concentrações finais de 15 mM e 200 mM respectivamente. Para extrair o DNA adiciona-se um volume de uma mistura a 1:1 de clorofórmio/ fenol, pré-saturado com TNE, e agita-se vigorosamente a mistura. As fases orgânicas e aquosa são separadas por centrifugação a 5000 g durante 5 min. (temperatura ambiente). A fase aquosa é transferida para um novo tubo e extraída com 1 volume de clorofórmio. Após centrifugação o DNA é precipitado pela adição de 2,5 volumes de etanol. A amostra é incubada pelo menos 2 horas a -20°C e centrifugada a 10000 g durante 10 minutos. O sedimento de DNA é lavado uma vez com 70% de etanol, seco durante 10 minutos num excicador de vácuo e finalmente dissolvido num volume adequado de tampão TE.

Utilizaram-se as seguintes estirpes:

E.coli estirpe HB101: F<sup>-</sup>, hsdS20 (r<sub>p</sub><sup>-</sup>, m<sup>-</sup>B), recA13, ara14, proA2, lacY1, galK2, rspL20 (Sm<sup>r</sup>), xy1-5, mt1-1, supE44, λ<sup>-</sup> (Boyer e Rouland-Dussoix 1969 ; Bolivar e Backman 1979).

Linha celular RPMI 8866: As células RPMI 8866 (ATCC N°CCL 107) são de uma linha de células B linfoblastoides que expressam os receptores para IgE. A linha celular foi recebida do Dr. P.Ralph, Sloan-Kettering Research Institute, NY, USA.



Usaram-se os seguintes plasmídeos:

pUC-9: Comercializável pela Pharmacia, P-L Biochemicas Upsalla, Suécia. O plasmídeo pUC-9 consiste num gene para ampicilina derivado do pBR 322 e uma origem de replicação de DNA ligada a uma porção do gene lac Z de E. coli. Na região lac Z deste plasmídeo foi introduzida uma inserção de DNA contendo um arranjo de sítios únicos de reconhecimento por enzimas de restrição.

pUC-KO: Este plasmídeo é um derivado de pUC-9 em que a região do promotor / operador do gene lac Z foi eliminada entre o sítio de restrição HaeII imediatamente fora da sequência do promotor e o sítio de restrição HindIII, dentro do poli-adaptador, deixando as outras sequências do plasmídeo pUC-9 inalteradas.

pGEM<sup>TM</sup>-1: Comercializável pela Promega Biotec, Madison, USA. Este plasmídeo é um vector de transcrição especial. Foi construído usando o plasmídeo pSP64 contendo o promotor bacteriófago SP6 (Melton, D.A., et al (16)) e um promotor do bacteriófago T7. O plasmídeo resultante tem dois promotores opostos SP6 e T7, separados por um pequeno pedaço de DNA contendo múltiplos locais de clonagem.

Plasmídeos pIN-III-ompA: Descritos por Gharayeb et al. (13). Estes plasmídeos são vectores de clonagem especiais para secreção em E. coli. A secreção do produto do gene clonado através da membrana citoplasmática pode ser conseguida fundindo os polipeptídeos sinal adequados ao extremo amino do produto

do gene. Nestes plasmídeos o fragmento de DNA codificador do peptídeo sinal da proteína ompA, uma das principais proteínas de membrana de E.coli, foi inserida num vector de alta expressão. Pode-se clonar um fragmento de DNA estranho em qualquer uma das três grelhas de leitura nos sítios únicos EcoRI, HindIII ou BamHI imediatamente após a sequência do peptídeo sinal ompA. Os plasmídeos pIN-III-ompA do tipo 1, 2 e 3 trigger diferentes grelhas de leitura para tradução.

#### EXEMPLO 1

##### Isolamento de mRNA a partir de células RPMI 8866

As células RPMI 8866 cultivam-se em frascos de cultura de tecidos (Falcon 175 cm<sup>2</sup>) com 50 ml de meio RPMI 1640 suplementado com 15% FCS, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. As células de 50 frascos confluentes (aproximadamente 10<sup>8</sup> células/frasco) colhem-se por centrifugação e lavam-se uma vez com 50 ml de PBS. O sedimento de células (5 g) é dissolvido em 25 ml de uma solução preparada a partir de 100 g de tiocianato de guanidínio, 100 ml de H<sub>2</sub>O, 10,6 ml de 1M Tris-HCl, pH 7,5, 4,2 ml de EDTA 0,5M, 21,2 ml de 20% N-laurilsarcosina e 2,1 ml de 2-mercaptoetanol. O lisado celular é homogeneizado num "omnimixer" durante 90 segundos a toda a velocidade. Adiciona-se dois volumes de uma mistura a 1:1 de clorofórmio e fenol. A mistura é agitada vigorosamente durante 1 min e depois centrifugada a 5000 g durante 10 min numa centrifuga Sorvall a 10°C. A fase aquosa é recuperada e repetida a extracção mais 4 vezes. Adicionam-se dois volumes de etanol à fase aquosa. Recupera-se o precipitado por arrefecimento a -20°C du-

rante 15 minutos seguido de centrifugação a 10000 rpm a 4°C num rotor Sorvall SS34 durante 10 minutos. O sedimento é dissolvido em 4 ml de tampão TE. Adiciona-se 7,5 g de CsCl (Merck) e 50 µl de 0,1N HCl e a solução é ajustada a 7,5 ml e colocadas sobre uma almofada de 2 ml de 5,7M CsCl num tubo de centrifuga de 12 ml. O tubo é cheio até acima com H<sub>2</sub>O e centrifugado durante 16 horas a 29000 rpm 20°C num rotor TST 41 (Kontron). No fim da corrida a maior parte do sobrenadante é removido e o tubo escorrido por inversão rápida. O sedimento de RNA transparente é dissolvido em 1 ml de tampão TE e 0,2% de SDS agitando com vortex e aquecendo ocasionalmente (2 minutos) a 37°C. O RNA é precipitado com etanol como descrito por Maniatis *et al.* (1) p. 461-462. O mRNA pretendido é dissolvido em 1 ml de tampão de eluição. Após aquecimento durante 2 min a 68°C e arrefecimento em gelo, adiciona-se 130 µl de 5M NaCl e a solução é aplicada a uma coluna de 2 ml de oligo-dT celulose (2 ml de volume de leito numa seringa de 5 ml tipo 7, P-L Biochemicals) equilibrada em tampão de lavagem. Após duas aplicações subseqüentes da amostra a coluna é lavada com 15 ml de tampão de lavagem e o mRNA ligado eluido com 4 ml de tampão de eluição. O material eluido é aquecido durante 2 min a 68°C, arrefecido em gelo e adiciona-se 0,44 ml de 5M NaCl. A solução é aplicada duas vezes á coluna de oligo-dT celulose re-equilibrada. Após lavagem com 15 ml de tampão de lavagem o mRNA ligado é eluido com 4 ml de tampão de eluição. A recuperação do mRNA é determinada medindo a observância a 260 nm ( $OD_{260\text{ nm}}=1$  está de acordo com uma concentração de 40 µg/ml). O mRNA (150 µg) é precipitado com etanol. O precipitado é colhido por centrifugação (15 min a 16000 g), dissolvido em 0,4 ml de H<sub>2</sub>O e re-precipitado com etanol. O sedimento de mRNA é seco ao ar e dissolvido em 150 µl de tampão TE suplementado com 0,1% de SDS.

EXEMPLO 2

Enriquecimento em mRNA codificador dos polipeptídeos receptor de IgE e relacionados com IgE-BF.

130 µg de mRNA poli-A do Exemplo 1 (1 µg/ml) são aquecidos durante 5 min a 70°C, arrefecidos em gelo e aplicados sobre um gradiente linear de 5-20% de sacarose em 0,1M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA e 0,5% SDS. O gradiente é centrifugado durante 5 horas a 41000 rpm num rotor TST41 a 25°C. Colheram-se 30 fracções (volume 0,4 ml/fracção) e testaram-se por injeção em oócitos de Xenopus laevis, conforme descrito no Exemplo 3.

EXEMPLO 3

tradução in vivo de mRNA em oócitos de Xenopus laevis

Pode-se obter Xenopus laevis adultos macho e fêmea a partir de uma variedade de fornecedores de animais, incluindo K. Evans (716 Northside, Ann Arbor, MI 48109). As rãs podem ser mantidas em qualquer tipo de tanque com água, sem arejamento, a 18-22°C. A alimentação regular (duas vezes por semana) com fragmentos de fígado ou de coração ajudará a manter uma colónia saudável. Os oócitos devem ser obtidos a partir de fêmeas adultos e saudáveis de Xenopus. Isto é facilmente conseguido por anestesia da rã numa solução de 1:1000 (p/v) de m-aminobenzoato de etilo em água durante 10-30 minutos. Uma pequena incisão (1 cm) no lado ventral posterior dá fácil acesso ao ovário da rã. Após remoção de um segmento de ovário a incisão pode ser suturada e

a rã recuperará rapidamente na água. O ovario deverá ser colocado imediatamente em siluação salina de Barth modificada (MBS-H) e os oócitos individuais são separados uns dos outros com uma ansa de platina. Injectam-se oócitos grandes já completamente crescidos usando um micropipeta fina, uma seringa micrométrica e qualquer esteriomicroscópio de dissecação convencional. A construção de uma pipeta de injeção adequada está descrita por Gurdon (18). Os oócitos são colocados numa lâmina de microscópio, secos por capilaridade usando uma toalha de papel e a lâmina é então colocada no stage do microscópio. Antes e durante a inserção da pipeta os oócitos podem ser manipulados com blunt watchmaker's forceps. Após a pipeta ter penetrado nos oócitos introduz-se uma aliquota de 30-50  $\mu$ l das soluções de mRNA (1 mg/ml) do Exemplo 2 usando a seringa do micrômetro. Grupos de 40 ovos contendo o mRNA da mesma fracção são incubados em 0,5 ml de solução de Barth, suplementada com 6% FCS durante 45 horas a 20°C. Remove-se o meio de incubação e os oócitos são homogeneizados em 900  $\mu$ l de tampão de lise de oócitos. O homogenato é centrifugado numa centrifuga Eppendorf durante 10 minutos. A fase superior é recuperada e aliquotas de 50  $\mu$ l testadas numa RIA, como descrito no Exemplo 7.

#### EXEMPLO 4

#### Preparação de células de hibridoma produtoras de anticorpos monoclonais contra FC<sub>c</sub>R

Imunizaram-se ratinhos Balb/c com três injeções intraperitoneais de  $5 \times 10^7$  células RPMI 8866 viáveis em PBS com intervalos de 4 semanas. Colheram-se amos-

tras individuais de soro de ratinho 2 dias após a última injeção e testaram-se quanto à actividade anti-Fc<sub>ε</sub>R. Juntaram-se as células do baço de dois animais com os títulos mais altos e usaram-se para fusão no dia seguinte. Os baços são raspados e para cada fusão 1x10<sup>8</sup> células do baço lavadas são sedimentadas com 25x10<sup>6</sup> células de mieloma de ratinho NSI/1-Ag4 (obtidas da American Type Tissue Culture Collection) durante 5 min a 350 xg. O sedimento de células é suavemente ressuspenso durante 30 seg em 2 ml de solução de polietilenoglicol (PEG-1540, Baker) consistindo em 20 g de PEG dissolvido em 28 ml de meio RPMI 1640 (Gibco) contendo 15% (v/v) de dimetilsulfoxido. Adiciona-se gota a gota 8 ml de meio RPMI/c durante um período de 90 seg seguido de adição rápida de mais 5 ml. A suspensão celular é misturada invertendo o tubo, deixada em repouso durante 2,5 min e centrifugada a 350 xg durante 5 min. O sedimento é ressuspenso em 5 ml de meio RPMI/c e aliquotas de 50 μl são distribuídas por cada poço de 4 placas Costar # 3596 de 24 poços também contendo 1x10<sup>6</sup> células normais do baço de Balb/c em 1 ml de meio HAT. Todas as culturas são mantidas por adição alternada ou substituição do meio HAT com poucos dias de intervalo conforme necessário, começando no 5º dia após a fusão. Passados 14 dias o HAT é substituído por meio HT e passados 28 dias por RPMI/c. Os sobrenadantes de poços individuais (192 culturas) são testados relativamente a anticorpos anti-Fc<sub>ε</sub>R uma a duas semanas após a fusão. Clonaram-se por diluição limite 21 culturas produtoras dos anticorpos pretendidos; elas são diluídas em RPMI/c para uma concentração de 10 células viáveis/ml e aliquotas destas suspensões são colocadas em poços de placas de 96 poços (Linbro # 76-003-05, Flow Labs), contendo 100 μl de meio HT e 1x10<sup>5</sup> células normais de baço de BALB/c. Os poços são examinados ao microscópio para assegurar que as culturas em crescimento sejam monoclonais. Amostras de sobrenadantes das culturas são testadas para actividade de anticorpos; as cul-

turas positivas são seleccionadas e expandidas em recipientes maiores para cultura de tecidos. No final obtiveram-se 14 linhas celulares monoclonais secretoras de anticorpos com a especificidade necessária. Usaram-se aqui três clones, designados 207.25.A.4.4/45, 208.25A.4.3/135 e 208.25D.2.1/176, depositadas na Collection National de Cultures de Microorganismes of the Institute Pasteur, Paris, disponiveis com os numeros de acesso I-452, I-425 e I-420, respectivamente. Os anticorpos monoclonais produzidos por eles são designados Mab-45, Mab-135 e Mab-176.

#### EXEMPLO 5

##### Isolamento e purificação de anticorpos monoclonais

Ratinhos Balb/c prêtrataram-se intraperitonealmente com 0,5 ml de pristano (Aldrich). 2 semanas mais tarde,  $5 \times 10^6$  células de hibridoma clonadas do Exemplo 4 são injectadas intraperitonealmente. Após 8-10 dias o fluido de ascites é colhido, centrifugado a 800 xg e guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O liquido de ascites descongelado é centrifugado a 50000 xg durante 60 min. Uma camada de gordura que flutua na superficie é cuidadosamente removida e a concentração proteica é ajustada a uma concentração de 10-12 mg/ml. A imunoglobulina bruta é precipitada pela adição gota a gota de 0,9 equivalentes de volume de sulfato de amônio saturado a  $0^{\circ}\text{C}$ , depois dissolvido em 20 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH 7,9) e depois dializado contra o mesmo tampão. Obtem-se uma fracção de imunoglobulina G por cromatografia em DEAE-D52 cellulose (Whatman) usando um sistema de gradiente de tampão de 20 mM Tris HCl/25-400 mM NaCl, pH 7,9.

EXEMPLO 6

Preparação do anticorpo monoclonal Mab-135 marcado com  $^{125}\text{I}$

Iodinaram-se 40  $\mu\text{g}$  de Mab-135 (solução em PBS do Exemplo 5) com 0,5 mli de iodeto de sódio marcado com  $^{125}\text{I}$  e cloramina T seguindo o processo geral de F. C. Greenwood et al. (19). A solução contendo a proteína Mab-135 iodada foi dialisada 4 vezes, 6 horas cada, contra 1 litro de tampão PBS. O produto final tem uma actividade específica de aproximadamente  $2 \times 10^7$  cpm/ $\mu\text{g}$  de proteína. O anticorpo monoclonal Mab-176 marcado com  $^{126}\text{I}$  foi preparado de modo idêntico.

EXEMPLO 7

Radioimunoensaio para a detecção de IgE-BF em sobrenadantes de células e soro

Incubaram-se poços de placas de microtitulação em cloreto de polivinilo durante a noite à temperatura ambiente com 150  $\mu\text{l}$  de tampão carbonato 0,01M, pH9, contendo 5  $\mu\text{l}/\text{ml}$  de Mab-176 do Exemplo 5. As placas foram então lavadas uma vez com PBS e feitas reagir durante 2 horas à temperatura ambiente com 200  $\mu\text{l}$  de solução salina equilibrada de Hanks contendo 10% de soro fetal de vitela (HBSS-FCS), depois lavadas de novo 10 vezes com PBS e incubadas com 100  $\mu\text{l}$  da amostra a testar durante 8 horas à temperatura ambiente. Determinou-se o branco usando HBSS-FCS. As placas foram lavadas 10 vezes com PBS e incubadas durante



a noite à temperatura ambiente com 100  $\mu$ l por poço de  $^{125}\text{I}$ -Mab-135 (2 a  $4 \times 10^5$  cpm em HBSS-FCS, Exemplo 6), depois lavadas 10 vezes com PBS e contadas num contador gama.

### EXEMPLO 8

#### Síntese de ss-cDNA a partir de mRNA

12  $\mu$ l (0,5 mg/ml) da solução de mRNA do Exemplo 2 apresentando a capacidade de ligação mais alta para  $^{125}\text{I}$ -Mab-135, detectado na RIA do Exemplo 7, foi adicionado a 25  $\mu$ l de tampão RVI, 2,5  $\mu$ l da mistura de dNTP (dATP, dTTP e dGTP, 20 mM cada) 5  $\mu$ l de 1 mg/ml de oligo-dT<sub>12-18</sub> (P-L-Bio-chemicals) 1  $\mu$ l  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP (10  $\mu$ li, 3000 li/mmol), 3  $\mu$ l de RNasina<sup>RM</sup> (60 unidades, Promega Biotec, Madison, USA) e 3  $\mu$ l de transcriptase reversa (66 unidades, Promega Biotec). Incluiu-se dCTP radioactivo na mistura de reacção para facilitar a recuperação e a determinação do rendimento do cDNA em todos os passos da síntese. Incubou-se a mistura durante 1,5 h a 42°C. Parou-se a reacção pela adição de 2  $\mu$ l de EDTA 0,5M pH 7,5. O mRNA foi degradado pela adição de 25  $\mu$ l de 0,15M NaOH e incubação a 45°C durante 1 hora. Neutralizou-se a solução pela adição de 25  $\mu$ l de 1M Tris-HCl (pH 8,0) e 6  $\mu$ l de 1M HCl. Adicionou-se 2  $\mu$ l de 20% SDS e extraiu-se a solução com 0,15 ml de mistura fenol.clorofórmio (volumes iguais de fenol e clorofórmio equilibrados com tampão TNE). A fase aquosa foi aplicada numa coluna de 2 ml de Sephadex<sup>R</sup> G-50 numa pipeta de Pasteur equilibrada com tampão TNE, para separar o cDNA sintetizado de novo dos nucleotídeos não incorporados e do mRNA degradado. Colheram-se doze fracções de 200  $\mu$ l cada e determinou-se a radioactividade

aproximada de cada fracção com um contador Geiger. As três primeiras fracções contendo radioactividade foram reunidas. Recuperou-se 1,5  $\mu\text{g}$  de ss-cDNA e precipitou-se com etanol como descrito por Maniatis et al (1), p.461-462. O ss-cDNA foi dissolvido em 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ .

#### EXEMPLO 9

##### Síntese de ds-cDNA e digestão com S1

O ss-cDNA obtido foi incubado em 100  $\mu\text{l}$  volume final de 100 mM Hepes, pH 6,9, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 mM DTT, 70 mM KCl, dNTP 0,5 mM cada (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) e 20 unidades de DNA polimerase I fragmento maior, enzima Klenow (Boehringer Mannheim) durante 3 horas a 15°C. Adicionou-se então mais 20 unidades da mesma enzima e a incubação continuou durante 10 horas a 15°C. Parou-se a reacção adicionando EDTA até 20 mM. A mistura foi extraída com fenol-clorofórmio e precipitada com etanol como descrito por Maniatis et al (1), p.461-462 e 458-459. O ds-cDNA resultante foi tratado numa mistura de incubação de 100  $\mu\text{l}$  contendo 250 mM NaCl, 50 mM acetato de sódio pH 4,5, 1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 200 unidades de nuclease S1 (Boehringer, Mannheim) a 30°C durante 30 minutos. Parou-se a reacção adicionando EDTA para 25 mM. Após adição de 1M Tris-HCl, pH 8,0 para 100 mM e SDS para 1%, extraiu-se a reacção com fenol/clorofórmio e passou-se através de uma coluna de Sephadex G-200 numa pipeta de Pasteur de 2 ml de volume, equilibrada com tampão TNE. Determinou-se quais as fracções que continham ds-cDNA medindo a radioactividade e reuniram-se e precipitaram-se com etanol e dissolveram-se em 15  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Obtiveram-se 3,2  $\mu\text{g}$  de ds-cDNA.

EXEMPLO 10

Colocação de caudas 3'-oligo (dG) no plasmideo pUC-KO

Cortaram-se 20  $\mu$ l do plasmideo pUC-KO com 50 unidades de PstI (Boehringer, Mannheim) em 200  $\mu$ l de 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl<sub>2</sub> e 50 mM NaCl. Adicionou-se EDTA para 20 mM e a mistura de reacção foi extraída com um volume igual de clorofórmio/fenol (1:1). O DNA de plasmideo cortado foi precipitado pela adição de 2,5 volumes de etanol e recuperado por centrifugação a 10000 g durante 10 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e dissolveu-se o sedimento em 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. Incubou-se a sonda em 150  $\mu$ l de uma solução com 200 mM de cacodilato de potássio pH 6,9, 1 mM CoCl, 2 mM DTT, 10  $\mu$ M dGTP e 80 unidades de transferase terminal de desoxinucleotidilos (Pharmacia P-L Biochemicals, Upsalla Sweden) durante 5 minutos a 37°C. Para parar a reacção, adicionou-se EDTA para 10 mM e extraiu-se a mistura uma vez com fenol/clorofórmio (1:1). Precipitou-se o DNA com etanol e recuperou-se por centrifugação a 10000 g. Dissolveu-se o sedimento de DNA em 200  $\mu$ l de tampão TE e aplicou-se um gel horizontal de 0,8% de agarose em tampão TBE usando um poço com uma largura de 3 cm. Após electroforese durante 16 horas a 1V/cm recuperou-se o DNA por electroeluição a 5V/cm durante 20 minutos e recuperou-se do saco por pipetagem vigorosa. O DNA foi extraído com fenol-clorofórmio e precipitado com etanol como descrito no exemplo 1. Após centrifugação o DNA foi dissolvido em tampão TE e guardado a -20°C.

EXEMPLO 11

Preparação de um plasmídeo contendo ds-cDNA codificador do polipeptídeo relacionado com receptores de IgE e transformação de E. coli HB101 com ele

Incubaram-se 800 ng de ds-cDNA do Exemplo 5 em 40  $\mu$ l de uma solução contendo 200 mM cacodilato de potássio, pH 6,9, 1 mM  $\text{CoCl}_2$ , 2 mM DTT, 100 pmoles de  $^3\text{H}$ -dCTP e 12 unidades de transferase terminal de desoxinucleotídeos (P-L Biochemicals) durante 5 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Para parar a reação adicionou-se EDTA para 10 mM. Extraíu-se a mistura com fenol/clorofórmio e precipitou-se o DNA com etanol. Dissolveu-se em  $\text{H}_2\text{O}$  o ds-cDNA com caudas dC e guardou-se a  $-20^\circ\text{C}$ . Uma mistura de 50 ng de ds-cDNA com caudas dC e 150 ng de pUC-KO com caudas dG do Exemplo 10 em 200  $\mu$ l de tampão TNE foi incubada durante 5 minutos a  $65^\circ\text{C}$ , 60 min a  $55^\circ\text{C}$  e depois arrefecida lentamente até  $30^\circ\text{C}$  num banho-maria durante um período de 3-5 horas. Adicionou-se aliquotas de 2  $\mu$ l desta mistura de emparelhamento a 200  $\mu$ l de células E. coli HB101 competentes, as quais foram preparadas para transformação por tratamento com cloreto de cálcio conforme descrito por Maniatis et al (1). p.250. As misturas são mantidas em gelo durante 30 minutos e aquecidas a  $42^\circ\text{C}$  durante 2 min, depois diluídas com 1 ml de meio SOC e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Reuniu-se o conteúdo de 10 tubos e colheram-se as células por centrifugação a 2000 g durante 5 min. Cada sedimento de células foi ressuspensão em 1 ml de meio SOC e espalhado numa placa de 10 cm com agar contendo meio LB e 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ampicilina. As placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  durante 16 horas. Obtiveram-se cerca de 5000 colônias transformadas, caracterizadas pela sua resistência à ampicilina.

EXEMPLO 12

Identificação de clones contendo ds-cDNA codificador dos receptores de IgE e do polipeptídeo relacionado com factores de ligação a IgE por tradução de híbridos seleccionados.

Cultivaram-se colónias individuais do Exemplo 11 até à saturação em 2 ml de caldo LB contendo 100 µg/ml de ampicilina. Reuniram-se 96 culturas e isolou-se o DNA de plasmídeo usando o método de lise alcalina (Maniatis, T. et al., p. 90 (1)) 100 µg de DNA de plasmídeo desnaturado pelo método alcalino foram ligados covalentemente a 50 mg de ATP-celulose activada preparada pelo método de Seed (20).

Dissolveu-se mRNA poliA (60 µg) de células RPMI 8866 (Exemplo 1) em 300 µl de Pipes 15 mM pH 6,4, 1,5 mM EDTA, 600 mM NaCl, 0,2% SDS, 50% de formamida e hibridou-se com DNA de plasmídeo ligado a celulose a 37°C durante 16 horas com agitação suave. Lavou-se a celulose 10 vezes em 50 % de formamida, 45 mM NaCl, 4,5 mM citrato de sódio, 20 mM Pipes pH 6,4 e 1 mM EDTA. O mRNA hibridado foi eluído em celulose incubando duas vezes a 65°C durante 2 minutos em 100 µl de 90% formamida, 0,2% SDS, 10 mM Pipes 6,4, 5 mM EDTA, 20 µg/ml de tRNA de fígado de vitela. O mRNA eluído foi precipitado duas vezes com etanol. O mRNA poliA precipitado obtido de cada conjunto foi dissolvido em 6 µl de água e usado para injeção em oócitos de Xenopus laevis e analisado como descrito no Exemplo 3. As proteínas traduzidas foram testadas por RIA conforme descrito no Exemplo 7. Dos dez conjuntos de 96 colónias cada, um é positivo. Estas 96 colónias foram combinadas em 12 conjuntos novos de oito colónias e testadas da mesma maneira. Finalmente identificou-

-se uma colônia isolada, a proteína da qual dá um sinal positivo na RIA após a tradução do mRNA em oócitos de rã. O clone foi expandido em caldo LB contendo 100 µg/ml de ampicilina. Isolou-se DNA de plasmídeo desta clônia, 1 µg do DNA de plasmídeo foi digerido com a enzima de restrição PstI, uma enzima que cliva em ambas as fronteiras entre o DNA vector e a inserção de ds-cDNA e determinou-se a sequência da inserção de cDNA de extremo a extremo usando o método de sequencição de terminação de cadeias didesoxi de Sanger et al. (21). A sequencição foi feita conforme descrito detalhadamente no manual de Amersham "M13 cloning and sequencing" usando os reagentes incluídos no "kit" de sequencição (Amersham N 4501 e N 4502). A inserção de ds-cDNA tem 417 pb de comprimento e a sua sequência está apresentada na Fórmula II entre o pb nº 878 e o pb nº 1295. Este ds-DNA codificador da parte C-terminal do receptor de IgE e do factor de ligação a IgE foi usado como sonda de DNA para encontrar por hibridação um clone de cDNA maior contendo toda a informação codificadora dos polipeptídeos relacionados com o receptor de IgE e o factor de ligação a IgE humanos.

### EXEMPLO 13

#### Clonagem de um cDNA contendo toda a sequência codificadora do receptor de IgE humano.

Isolou-se mRNA poliA a partir de células RPMI 8866 conforme descrito no Exemplo 1. Os primeiros passos de síntese de cDNA foram feitos de acordo com o Exemplo 2-8. Então, o protocolo foi alterado para enriquecimento em ds-cDNA de tamanho completo. O ss-cDNA foi dissol-

vido em 32  $\mu$ l de  $H_2O$ . O ss-cDNA foi prolongado com caudas oligo-dC numa mistura de reacção contendo 32  $\mu$ l de ss-cDNA (2,8  $\mu$ g), 10  $\mu$ l de 1M cacodilato de potássio, pH 7,0, 5  $\mu$ l de 10 mM  $CoCl_2$ , 5  $\mu$ l de 1 mM DTT e 1 nmole de dCTP. Após pré-incubação durante 5 minutos a 37°C, adicionou-se 3  $\mu$ l de transferase terminal de desoxinucleotidilos (81 unidades, P-L Biochemicals) e a incubação continuou durante mais 10 min. Adicionou-se mais 50  $\mu$ l de tampão TNE e o ss-cDNA foi extraído com clorofórmio/fenol e precipitado com etanol. O sedimento foi lavado com 70% etanol, seco ar ar e dissolvido em 15  $\mu$ l de  $H_2O$ , 25  $\mu$ l de tampão RVT, 2,5  $\mu$ l de mistura de dNTP (dATP, dTTP, e dGTP 20 mM cada) e 5  $\mu$ l de 0,2 mg/ml de oligo dG<sub>12-18</sub> (P-L Biochemicals). Adicionou-se 3  $\mu$ l de transcriptase reversa (66 unidades, Promega Biotec) e incubou-se a mistura a 42°C durante 90 minutos. Parou-se a reacção pela adição de 2  $\mu$ l de 0,5M EDTA, pH 7,5 e 50  $\mu$ l de tampão TNE e extraiu-se a mistura com 0,15 ml de fenol-clorofórmio (1:1). Aplicou-se a fase aquosa numa coluna de Sephadex<sup>R</sup> G-50 (2,5 ml em tampão TNE) e colheu-se a fracção do volume de exclusão (0,4 ml) contendo 1,1  $\mu$ g de ds-cDNA foi precipitado com etanol. Suspendeu-se o sedimento resultante em 32  $\mu$ l de  $H_2O$  e o ds-cDNA foi prolongado com caudas oligo-dC marcadas radioactivamente como descrito no Exemplo 11. Parou-se a reacção pela adição de 1  $\mu$ l de 0,5M EDTA, pH 7,5 e aplicou-se a amostra num gel horizontal de 1% de agarose em tampão TBE usando poços com uma largura de 0,5 cm. Num poço paralelo, aplicou-se 1  $\mu$ g de DNA do bacteriófago lambda (digerido com EcoRI e HindIII) para servir como marcador de tamanho. Após electroforees durante 2 h a 2,5V/cm o gel foi embebido em tampão TBE contendo 0,5  $\mu$ g/ml de brometo de etídio para corar o ds-DNA. A região contendo ds-cDNA com um tamanho entre aproximadamente 1,4 e 2 kilobases foi removida e colocada em dois sacos micro-colódico (Sartorius) pré-embebidos em  $H_2O$ . Adicionou-se 0,3 ml de  $H_2O$  e colocaram-se os sacos num apa-

relho horizontal de electroforese (Bio-Rad) contendo tampão TBE a metade da concentração normal. O ds-cDNA foi electroeluido a 5V/cm durante 20 min e recuperado do saco por pipetagem vigorosa. O ds-cDNA foi extraído com fenol-clorofórmio e precipitado com etanol. Após centrifugação dissolveu-se o ds-cDNA em 10  $\mu$ l de tampão TNE. Recuperou-se 100 ng de ds-cDNA (determinado a partir da recuperação de radioactividade).

#### EXEMPLO 14

Emparelhamento de pUC-KO com caudas dG com ds-cDNA com caudas poli (dG) e transformação de E.coli com o plasmideo obtido.

40  $\mu$ l de ds-cDNA (40 ng de material fraccionado por tamanho do Exemplo 13) foi misturado com 16  $\mu$ l (200 ng) de DNA do plasmideo pUC-KO com caudas oligo-dG<sub>10-20</sub> do Exemplo 10 e 194  $\mu$ l de tampão TNE e sequencialmente incubado a 65°C durante 10 min., a 46°C durante 1 hora e à temperatura ambiente durante 1 h. Usou-se o DNA emparelhado para transformar células competentes E. coli HB101 (estirpe LM 1035), as quais foram preparadas para transformação como descrito no Exemplo 11. Adicionou-se aliquotas de 2  $\mu$ l da mistura de emparelhamento a tubos paralelos contendo 200  $\mu$ l de células competentes. Deixa-se os tubos em gelo durante 30 min. Após um choque térmico de 90 seg a 42°C e arrefecimento em gelo durante 2 min, adicionou-se 0,8 ml de meio SOC por tubo e incubou-se em seguida durante 60 min a 37°C. Após incubação reuniu-se o conteúdo de 10 tubos. Colheram-se as células por centrifugação a 2000 g durante 5 min e semearam-se em placas de agar Mc Conkey (15 cm de diâmetro)



contendo 100 µg/ml de ampicilina. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C. Obtiveram-se aproximadamente 1000 colônias resistentes à ampicilina por placa. Estas foram transferidas para membranas de "nylon" (Pall-Biodyne, Glen Cove, New York - USA) e as membranas foram colocadas sobre placas de agar Mc Conkey com as colônias para baixo. Após incubação durante 5 horas a 37°C, fizeram-se duas réplicas em membranas de nylon. A membrana principal foi guardada a 4°C numa placa de agar. As réplicas foram processadas para hibridação de colônias colocando-as sucessivamente em papel 3MM (Whatman Ltd., Maidstone, USA) saturado com 0,5M NaOH, 1,5M NaCl durante 5 minutos e com 0,5M Tris-HCl, pH 8,0, 1,5M NaCl durante 10 minutos. Entre cada incubação os filtros foram transferidos para filtros Whatman 3MM secos. Os filtros réplica foram incubados a 80°C numa estufa sob vácuo durante 2 horas e imediatamente usados para hibridação de DNA.

#### EXEMPLO 15

##### Hibridação em filtros

A inserção de cDNA de 10 µg de plasmídeo codificadora de parte do receptor de IgE obtido a partir do clone positivo do Exemplo 12 foi preparada por digestão com a endonuclease de restrição PstI. A inserção de cDNA (450 pb) foi separada do DNA do vector pUC-KO (2900 pb) por electroforese num gel de 1,5% de agarose em tampão TBE e recuperado por electroeluição e precipitação com etanol como descrito no Exemplo 13. A inserção de cDNA purificada (200 ng) foi tomada radioactiva usando um sistema de "nick translation" da Amersham (N. 5000) seguindo as instruções

dadas pelo fornecedor. A sonda de cDNA marcada radioativamente tem uma actividade especifica de  $5 \times 10^8$  dpm ( $\mu\text{g}$ ). O cDNA marcado radioativamente foi desnaturado por incubação a  $95^\circ\text{C}$  durante 10 minutos e imediatamente arrefecido em gelo. Os filtros réplica do Exemplo 14 foram pré-hibridados num saco de plastico fechado durante 2 h em 100 ml de uma soluço contendo 0,9M NaCl, 0,18M Tris-HCl, pH 8,0, 6 mM EDTA, 0,02% Ficoll 400, 0,02% polivinilpirrolidona, 0,02% BSA, 0,2% SDS e 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de DNA desnaturado de timo de vitela. Fez-se a hibrida o durante a noite num saco de plastico fechado contendo 5 ml da mesma soluço suplementada com a inser o de cDNA marcado radioativamente e desnaturado pelo calor referida atrás. Após hibrida o os filtros foram lavados em 2xSSC/0,2% SDS, seguido de três lavagens a  $65^\circ\text{C}$  com 200 ml de 0,2xSSC/0,2% SDS. Os filtros foram secos e expostos a um filme de raios X Kodak (XAR-5) durante a noite. Os filtros foram marcados com tinta radioactiva para parmitir o alinhamento dos filtros com o autorradiograma. Encontraram-se dois clones positivos, os DNAs dos quais hibridam com o fragmento de DNA marcado radioativamente codificador do receptor de IgE. Eles foram designados pCL-1 e pCL-2.

#### EXEMPLO 16

##### Isolamento e análise do DNA de pCL1 e pCL2

Cultivaram-se os clones pCL1 e pCL2 e os DNAs dos seus plasmideos foram isolados usando o método de lise alcalina (Maniatis, T., et al.(1),p.90). Digeriu-se o DNA com PstI, uma enzima que corta o cDNA nas fronteiras entre o DNA do vector e as inser es de DNA. Os frag-

mentos foram separados por electroforese e as inserções de cDNA completas isoladas por electroeluição como descrito no Exemplo 13. As inserções de cDNA destes dois plasmídeos foram sequenciados de extremo a extremo usando o método de Sanger et al(21) descrito detalhadamente no manual da Amersham. Na Figura 2 e Fórmula II está apresentado um sumário de análise de restrição e sequenciação.

#### EXEMPLO 17

##### Transferência do cDNA relacionado com o receptor de IgE para um plasmídeo adequado à transcrição.

10 µg de DNA do plasmídeo pCL-2 foram digeridos com as enzimas de restrição PstI e HindII (Boehringer Mannheim). A inserção de cDNA de 1,5 kb e o DNA vector de plasmídeo de 2,9 kb foram separados num gel de 1% de agarose em tampão TBE usando um poço com 3 cm de largura. Após electroforese durante 16 horas a 1V/cm, recuperou-se o DNA por electroeluição como descrito no exemplo 13 Paralelamente digeriu-se 10 µg do plasmídeo pGEM<sup>TM</sup>-1 com PstI e HindII extraiu-se uma vez com fenol/clorofórmio e precipitou-se com etanol 10 ng da inserção de cDNA de 1,5 kb e 10 ng de pGEM<sup>TM</sup>-1 clivado com PstI foram ligados num volume de 10 µl durante 4 horas a 15°C. A mistura de reacção contém ainda 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 0,1 mM ATP e 100 unidades de ligase de T4 (Boehringer Mannheim). Usou-se 5 µl da mistura para transformar células competentes E.coli HB101 (estirpe LM 1035) conforme descrito por Maniatis et al (1), p. 250. Obtiveram-se cerca de 100 colónias resistentes à ampicilina. Cultivaram-se 24 colónias e isolou-se o DNA de plasmí-

deo a partir das culturas. Aproximadamente 1  $\mu$ g de DNA de plasmideo de cada cultura foi digerido com HindIII e o tamanho dos fragmentos do DNA digerido analisado num gel de 1% de agarose, usando DNA de lambda digerido com HindIII (Pharmacia, Sweden) como marcador de tamanho. O DNA de plasmideo digerido de várias colônias deu fragmentos de DNA com 1,0 kb e 3,3 kb de comprimento. Estes plasmideos foram designados pGEM<sup>TM</sup>-1/CL2 (ver Fig. 3). Eles contem o extremo amino do receptor de IgE perto do promotor da polimerase de T7 no DNA vector pGEM<sup>TM</sup>-1.

#### EXEMPLO 18

##### Transcrição do cDNA relacionado com o receptor de IgE.

10  $\mu$ g do plasmideo pGEM<sup>TM</sup>-1/CL2 do Exemplo 17 foram digeridos com a enzima de restrição RsaI (Boehringer, Mannheim). Adicionou-se 5  $\mu$ l de 0,5M EDTA e a mistura foi extraída uma vez com fenol/clorofórmio (1:1, V:V) e uma vez com clorofórmio. O DNA foi concentrado por precipitação com etanol e dissolvido em 20  $\mu$ l de tampão TE. Adicionou-se 4  $\mu$ l da solução de DNA a 100  $\mu$ l de uma solução contendo 40 mM Tris-HCl pH 7,5, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM espermidina, 10 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 unidade/ $\mu$ l de RNasina, 0,5 mM dNTP e 20 unidades de Riboprobe da RNA polimerase de T7 (Promega Biotec). A mistura foi incubada durante 1 hora a 37°C. Após a reacção de síntese de DNA, adicionou-se duas unidades de RQI<sup>TM</sup> DNase (Promega Biotec) e continuou-se a incubação a 37°C durante 1 hora. A mistura foi extraída uma vez com fenol/clorofórmio e uma vez com clorofórmio e o RNA sintetizado de novo recuperado por precipitação com etanol. O sedimento de RNA foi lavado com etanol a 70% e finalmente dissolvido

em 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

EXEMPLO 19

Tradução do mRNA do receptor de IgE derivado de plasmideo em oócitos de rã e detecção da proteína receptor de IgE.

O mRNA obtido no Exemplo 18 foi usado directamente para injeção em oócitos de rã como descrito no Exemplo 3. A síntese da proteína receptor de IgE foi testada numa RIA conforme descrito no Exemplo 7. Usou-se como amostra testemunha o mRNA poliA do Exemplo 1. Os resultados estão resumidos na Tabela que se segue:

Tipo de mRNA injectado em oócitos de rã	<sup>135</sup> I-Mab-135 ligado na RIA (entrada 3x10 <sup>5</sup> cpm)
mRNA derivado de plasmideo (Exemplo 18)	15%
mRNA poliA (Exemplo 1)	1,5%
sem RNA	0,1%

EXEMPLO 20

Montagem do plasmideo pFK-1 e pFK-2 para a expressão em *E. coli* de um polipeptideo com actividade de factor de ligação a IgE.

Neste Exemplo contruíram-se plasmideos que permitem a produção e secreção de polipeptideos relacionados com factor de ligação de IgE em *E. coli* em que estão eliminados os aminoácidos da região terminal amino entre as posições Met1 e Ala<sub>118</sub> ou Glu<sub>133</sub> que inclui o local de ancoragem à membrana. Digeriu-se 10 µg de DNA do plasmideo pCL-2 com as enzimas de restrição HincII e RsaI. Obtiveram-se fragmentos de 1,6, 1,25, 0,72, 0,46, e 0,23 kb que se separaram por electroforese num gel de 1% de agarose em tampão TBE. Recuperou-se o fragmento de DNA de 1,25 kb como descrito no Exemplo 13. Paralelamente linearizou-se 10 µg do plasmideo pGEM<sup>TM</sup>-1 com 20 unidades de HincII (Boehringer) em 50 µl de 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> e 5 mM DTT. Após 2 horas a 37°C, a mistura de reacção foi suplementada com 50 µl de 1M Tris-HCl pH 8,5, 10 µl de H<sub>2</sub>O e 20 unidades de fosfataes alcalina de intestino de vitela (Boehringer) e a incubação continuou durante 30 minutos a 37°C. A mistura foi extraída três vezes com fenol/clorofórmio e depois submetida a electroforese num gel de 1% de agarose em tampão TBE. O DNA de plasmideo foi recuperado do gel por electroeluição como descrito no Exemplo 13. 10 ng do fragmento de cDNA de 1,25 kb e 10 ng do pGEM<sup>TM</sup>-1 clivado com HincII foram ligados num volume de 10 µl durante 10 horas a 15°C. A mistura de reacção contem ainda 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 0,5 mM ATP e 100 unidades de T<sub>4</sub>- ligase (Boehringer). Usou-se 5 µl da mistura para transformar células competentes *E. coli* HB101 como descrito por Maniatis et al. (1), p. 250. Semearam-se as bactérias em placas de agar

suplementado com 100 µg/ml de ampicilina. Obtiveram-se cerca de 50 colônias resistentes à ampicilina. Cultivaram-se 24 colônias e isolou-se o DNA de plasmídeo de cada cultura. Aproximadamente 1 µg de DNA de plasmídeo de cada cultura foi digerido com HindIII e o comprimento dos fragmentos de DNA digerido analisado num gel de 1% de agarose, usando DNA de lambda digerido com HindIII (Pharmacia, Sweden) como marcador de tamanho. O DNA de plasmídeo digerido de várias colônias deu fragmentos de DNA com 0,5 kb e 3,6 kb, outros com 0,7 kb e 3,4 kb de comprimento, correspondendo às duas orientações possíveis das inserções. Estes plasmídeos foram designados respectivamente pCAL-3 e pCAL-4 (Figura 4). Cultivaram-se um clone pCAL-3 e um clone pCAL-4 e os DNAs de plasmídeo foram isolados usando o método de lise alcalina conforme descrito por Maniatis *et al.* (1), p.90. Digeriu-se 10 µg de DNA do plasmídeo pCAL-4 com a enzima de restrição HindIII e 10 µg do DNA do plasmídeo pCAL-3 com as enzimas de restrição BglIII e BamHI. Os fragmentos foram separados por electroforese e os fragmentos BglIII a BamHI de 0,8 kb e HindIII a HindIII de 0,75 kb recuperados por electroeluição como descrito no Exemplo 13. Paralelamente digeriu-se 10 µg de DNA do plasmídeo pIN-III-ompA-2 (Gharayeb *et al.* (5)) e 10 µg de DNA do plasmídeo pIN-III-ompA-3 com HindIII e BamHI respectivamente. Estes dois plasmídeos são vectores de clonagem para secreção em *E.coli* os quais permitem a clonagem de fragmentos de DNA estranho em duas grelhas de leitura fundidos a sequências codificadoras do peptídeo sinal da proteína OmpA. Em seguida, os plasmídeos linearizados foram tratados com fosfatase alcalina de intestino de vitela e o DNA linear foi purificado num gel de 0,8 de agarose conforme descrito acima. Fizeram-se duas misturas de ligação contendo num volume de 20 µl, 10 ng de pIN-III-ompA-2 clivado com HindIII e 10 ng do fragmento HindIII a HindIII de 0,8 kb (mix 1) e 10 ng do fragmento BglIII a BamHI de 0,75 kb juntamente com 10 ng de pIN-III-

-ompA-3 clivado com BamHI (mix 2). As misturas de reacção contem ainda 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 0,1 mM ATP e 100 unidades de T<sub>4</sub> ligase (Boehringer Mannheim). Após 12 horas a 15°C, usou-se 5 µl das misturas para transformar células competentes E.coli HB101 conforme descrito por Maniatis et al. (1), p.250. Obtiveram-se 50 a 100 colónias resistentes à ampicilina a partir da mix 1 e da mix 2. Cultivaram-se 12 colónias de cada mix e isolou-se o DNA de plasmideo a partir das culturas. Aproximadamente 1 µg do DNA de plasmideo de cada cultura foi digerido com PstI EcoRI (mix 1) e com BamHI e EcoRI (mix 2). O comprimento dos fragmentos de DNA foi analisado num gel de 1% de agarose usando DNA de lambda digerido com HindIII (Pharmacia, Sweden) como marcador de tamanho. Vários plasmideos derivados da mix 1 produziram um fragmento de 0,75 kb. Estes plasmideos foram designados pFK-2. Eles contem o DNA codificador dos aminoácidos Ala<sub>134</sub> a Ser<sub>321</sub> do receptor de IgE fundido à sequência sinal OmpA. Analogamente vários plasmideos derivados da mix 2 produziram um fragmento de 0,8 kb. Estes plasmideos foram designados pFK-1. Eles contem o DNA codificador dos aminoácidos Asp<sub>119</sub> a Ser<sub>321</sub> fundido à sequência sinal OmpA.

#### EXEMPLO 21

Deteccão do plasmideo relacionado com o factor de ligação a IgE em estirpes de E.coli portadoras dos plasmideos pFK-1 e pFK-2.

Usaram-se para transfectar células competentes E.coli BZ 234 e E.coli BZ 1472, 10 ng do plasmideo pFK-1, pFK-2 e como testemunha o plasmideo pIN-III-



-ompA-2. Tornaram-se as células competentes e transfectaram-se como descrito por Maniatis et al. (1), p.250. Obtiveram-se cerca de 100 colônias resistentes à ampicilina a partir de cada transfecção. Transferiu-se uma colônia para 2 ml de caldo LB suplementado com 100 µg de ampicilina/ml e cultivou-se a 37°C durante a noite. Transferiu-se 1 ml das culturas para 100 ml de caldo LB suplementado com 100 µg de ampicilina/ml. As células cresceram com agitação forte (250 rpm) a 37°C. Removeram-se aliquotas de 10 ml após 4, 7, 10, e 24 horas. As aliquotas foram processadas imediatamente. Colheram-se as células por centrifugação com 1000 g à temperatura ambiente durante 10 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e suspenderam-se as células em 2,5 ml de 20% sucrose, 0,1 M Tris-HCl pH 8,0. As misturas foram deixadas à temperatura ambiente durante 20 minutos e colheram-se de novo por centrifugação. Rejeitaram-se os sobrenadantes e suspenderam-se as células em 1,5 ml de H<sub>2</sub>O arrefecida em gelo. As misturas são incubadas em gelo durante 20 minutos e centrifugadas a 4°C com 12000 g durante 10 minutos. Adicionou-se 5 µl dos sobrenadantes a 100 ul de HBSS-FCS e estas amostras foram analisadas com a RIA descrita no Exemplo 7. Usou-se pIN-III-ompA-2 como testemunha. Obtiveram-se os seguintes resultados:

tempo de cultura	BZ 234 +pFK-1	BZ 234 +pFK-2	BZ 234 +pIN-III-ompA-2	B 1472 +pFK-1	B 1472 +pFK-2	B 1472 +pIN-III-ompA-2
4 h	4355	3516	-	3432	2255	50
7 h	6869	5066	120	4853	2754	0
10 h	8396	5706	-	6084	5281	0
24 h	7890	5206	89	5595	5088	76

Os valores são dados em cpm medidos por poço na RIA conforme descrito no Exemplo 7. A radioactividade inoculada por poço foi de 325000 cpm.

#### EXEMPLO 22

##### Preparação de um gel de imunoafinidade para a purificação da proteína do factor de ligação a IgE

Lavou-se material Affi-Gel<sup>R</sup>10 (Bio-Rad) conforme indicado pelo fabricante com água destilada fria e tampão de acoplamento pH 8,0 (solução 0,1M NaHCO<sub>3</sub>). Um suspensão a 50% de gel em 2 ml de tampão de acoplamento foi introduzida num tubo de plástico e misturado com o mesmo volume de uma solução que contem 10 mg de Mab-135 ou Mab-176 e a mistura foi agitada durante 4 horas à temperatura ambiente. Lavou-se novamente o gel com tampão de acoplamento. Para bloquear os sitios activos ainda livres, o gel foi tratado durante 2 horas à temperatura ambiente com 0,1 ml de 1M etanolamina-HCl, pH 8,0, depois lavado com PBS contendo 10 mM azida de sódio e mantido nele a 4°C.

#### EXEMPLO 23

##### Fermentação das células transformadas e isolamento da proteína factor de ligação a IgE a partir da cultura bacteriana

Uma colónia de E.coli BZ 234 con-

tendo o plasmideo pFK-1 do Exemplo 20 foi transferida para 10 ml de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/ml) e crescida a 37°C com agitação vigorosa durante a noite. Aliquotas de 1 ml da cultura foram transferidas para 6 frascos, cada um contendo 800 ml de caldo LB suplementado com ampicilina (100 µg/ml). As células cresceram com agitação forte (250 rpm) a 37°C durante 8 horas e colheram-se por centrifugação a 1000 g, à temperatura ambiente durante 10 minutos. Rejeitaram-se o sobrenadante e suspenderam-se as células em 300 ml de uma solução contendo 20% de sucrose, 30 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA. A suspensão foi deixada à temperatura ambiente durante 20 minutos e as células colhidas de novo por centrifugação. Rejeitou-se o sobrenadante e as células suspenderam-se em 200 ml de H<sub>2</sub>O arrefecida em gelo. A suspensão foi incubada em gelo durante 20 minutos e centrifugada a 4°C com 10000 g durante 15 minutos num rotor de uma centrifuga Sorvall. O sobrenadante (cerca de 180 ml) foi cuidadosamente recuperado, suplementado com azida de sódio (0,1 mg/ml) e filtrada através de uma unidade de esterilização por filtro Nalgene<sup>®</sup> (0,2 micron; Nalge Company, Rochester, N.Y. USA). A solução filtrada foi aplicada numa coluna de 2 ml de Mab-135 ou Mab-176 acoplado a Affi-Gel<sup>R</sup>10, obtido conforme descrito no Exemplo 22, a um fluxo de 50 ml/hora. O gel foi lavado sucessivamente com 20 volumes de PBS suplementado com 0,5M NaCl e 0,05% Tween<sup>R</sup>20, 5 volumes de PBS e 5 volumes de NaCl 0,9%. O teor proteico das soluções de lavagem foi testado medindo a absorvância a 280 nm para assegurar remoção completa de proteínas não ligadas. A coluna foi então eluída com aliquotas de 1 ml de volume cada, contendo 0,1M glicina-HCl, 0,1M NaCl, pH 2,6. Reuniram-se as fracções contendo proteína e neutralizou-se com 1M Tris.

As soluções concentradas de um polipeptideo purificado do invento obtiveram-se por tratamenu

to com um concentrador electroforético ISCO Modelo 1750 (Isco Inc.) e com uma membrana Spectrafor<sup>R</sup> (Spectrum Medical Industries) com uma exclusão de 3,5 KD. As soluções foram dializadas contra acetato de amónio 25 mM, pH 8,3 e depois concentradas para um volume de 0,2 ml. A proteína purificada foi analisada do seguinte modo: As fracções foram incubadas com tampão Laemmli, depois separadas em proteínas individuais por 12% SDS-PAGE e coloração com prata conforme descrito no manual Bio Rad. Encontraram-se proteínas com um peso molecular aproximado de 25 KD. Elas foram transferidas electroforéticamente durante 4 horas a 0,12 amperes com tampão de transferência para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com soro fisiológico tamponado com Tris contendo 10% de FCS. As tiras foram cortadas e postas a reagir individualmente com Mab-135 e Mab-176, 10 µg/ml de cada. Após 6 horas de incubação as tiras foram lavadas e postas a reagir durante a noite com IgG de cabra anti-ratinho conjugada com peroxidase de rábano silvestre. Lavaram-se as tiras e revelaram-se com 4-cloro-1-naftol (substrato da peroxidase) conforme detalhado no manual de instruções da Bio Rad. Os anticorpos monoclonais Mab-135 e Mab-176 reagiram ambos com o fragmento de proteína de 25 KD.

#### EXEMPLO 24

Expressão do polipeptideo com actividade de factor de ligação a IgE em E.coli sob o controle do promotor P<sub>L</sub> do fago λ.

24.1 Construção do plasmideo de expressão: Uscu-se como vector intermediário o plasmideo pHRi148 (Pedido de Patente Eu-

ropeia EP 146 785). 10  $\mu$ g de DNA do plasmideo pHRi148 foi digerido com NcoI, depois tratado com polimerase Klenow e dNTP (50  $\mu$ M) para tornar os extremos cegos. O DNA foi ainda digerido com BamHI e tratado com fosfatase alcalina. Isolou-se o DNA vector de 4,3 kb por electroforese em gel de agarose. Paralelamente, clivou-se 10  $\mu$ g de DNA do plasmideo pCAL3 (Exemplo 20) com BglII, depois tratou-se com polimerase Klenow e dNTP (50  $\mu$ M). O DNA foi ainda clivado com BamHI e o fragmento de DNA inserção de 0,78 kb isolado por electroforese em gel de agarose. 10 ng de vector purificado e 3 ng de DNA da inserção purificado foram ligados e a mistura usada para transformar células competentes E.coli HB101. Seleccionou-se um clone com o plasmideo recombinante correcto baseado na análise com enzimas de restrição (Figura 5). 10  $\mu$ g de DNA de um plasmideo correcto foi digerido com BamHI e EcoRI. O DNA da inserção de 0,79 kb foi isolado por electroforese em gel de agarose. Paralelamente digeriu-se 10  $\mu$ g de DNA do plasmideo pPLc24/Remant, E. et al (1981), Gene 15, 81-93/ com EcoRI e BamHI, depois tratou-se com fosfatase alcalina e purificou-se o DNA vector de 2,9 kb por electroforese em gel de agarose. 10 ng do DNA vector de 2,9 kb e 3 ng de DNA da inserção de 0,79 kb foram ligados e depois usados para transformar células competentes E.coli K12. Fez-se análise de restrição convencional para seleccionar um plasmideo correcto (pPL-BF; Figura 5). Este plasmideo possui a sequência de DNA com a fórmula II codificadora dos aminoácidos 119 a 321 do polipeptideo com a fórmula I a jusante do promotor  $P_L$  activável pelo calor. O aminoácido 119 é precedido por uma metionina que foi adicionada durante o passo de clonagem intermédio no plasmideo pHRi148.

Usou-se o plasmideo pPL-BF para transformar as estirpes W3110 e HB101 de E.coli ambas possuidoras de  $\lambda$ cI 857(Remaut et al., loc. cit.). Semearam-se os

transformantes em placas de LB contendo 40 µg/ml de canamicina e ampicilina e cultivaram-se por incubação a 30°C durante 24 horas. As colônias recombinantes resultantes foram usadas para fermentação.

#### 24.2 Fermentação

As estirpes recombinantes de E. coli obtidas no Exemplo 24.1 foram cultivadas a 30°C durante a noite em caldo LB contendo 40 µg/ml de ampicilina e canamicina. As culturas foram diluídas a 1:5 com o mesmo meio e incubadas a 42°C durante 4 horas. Colheram-se as células por centrifugação.

#### 24.3 Purificação dos polipeptídeos com actividade de ligação a IgE.

22,5 ml de uma suspensão celular ( $DO_{650}=20$ ) em 50 mM HEPES pH 8,0, 30 mM NaCl e 0,1% de etanolamina, preparada a partir de um sedimento bacteriano do Exemplo 24.2, foram misturados com 18 g de ureia. Sonicou-se a suspensão 3x30 seg com intervalos de 30 seg com um Soniprep<sup>R</sup> 150 MSE usando uma sonda de 9,5 mm e uma amplitude de 24 microns. Clarificou-se o lisado por centrifugação a 17000 rpm num rotor Sorvall SS34 durante 30 min a 20°C. Dializou-se o sobrenadante a 4°C contra três mudas de 10 mM HEPES pH 7,5 e 130 mM NaCl. O dialisado foi clarificado por centrifugação durante 30 minutos a 17000 rpm num rotor SS34 (Sorvall) a 4°C e suplementou-se o sobrenadante com azida de sódio (0,1 mg/ml). Os polipeptídeos com actividade de ligação a IgE foram ainda purificados e analisados como aqui descrito, e.g. no Exemplo 22 e 23.

EXEMPLO 25

Expressão de um polipeptideo com actividade de factor de ligação a IgE na levedura *Saccharomyces cerevisiae*

25.1 Construção do plasmideo de expressão pJDB207 R/PHO5-BF (Fig. 6)

Para preparar o DNA vector, digeriu-se totalmente 10 µg de DNA do plasmideo pJDB207 R/PHO5-TPA (12-2) (Pedido de Patente Europeia EP 143081 com BamHI. O DNA digerido foi tratado com fosfatase alcalina. O fragmento grande BamHI de 6,85 kb foi separado do fragmento pequeno num gel de 1% de agarose em tampão TBE e o fragmento de DNA de 6,85 kb foi recuperado do gel por electroeluição. Derivou-se do plasmideo pJDB207/PHO5-TPA 18 (Pedido de Patente Europeia 143'081) um fragmento de DNA codificador do promotor induzível PHO5 e da sequência sinal PHO5. Digeriu-se totalmente 50 µg deste plasmideo com BamHI e HindIII e isolou-se o fragmento de 2,3 kb. 5 µg deste fragmento foram ainda digeridos com BalI isolado o fragmento de 0,58 kb. 20 ng do DNA vector descrito atrás, 4 ng do fragmento de 0,58 kb, 8 ng do fragmento de cDNA BglIII/BamHI de 0,8 kb derivado de pCAL3 (Exemplo 20) e 0,1 ng de um adaptador de dsDNA obtido por síntese química com a sequência de ácido nucleico: 5' pCCAATGCA-3'/3'-GGTTACGTCTAGp-5' foram misturados e ligados durante 24 horas a 15°C num volume de 20 µl. O DNA ligado foi usado para transformar células competentes *E.coli* HB101. O DNA de plasmideo de cerca de 100 colónias resistentes à ampicilina foi analisado por digestão com enzimas de restrição. Encontraram-se algumas colónias que interiorizaram os três fragmentos de DNA inserção na orientação pretendida (plasmideo pJDB207 R/PHO5-BF; Figura 6). A estrutura correcta da

construção nas junções entre a sequência sinal de PH05, o DNA adaptador obtido por síntese química e o cDNA de IgE-BF foi verificada por sequenciação.

## 25.2 Transformação e fermentação de leveduras

O plasmídeo pJDB207/PH05-BF foi usado para transformar Saccharomyces cerevisiae estirpe GRF18 ( $\alpha$ , his 3-11, his 3-15, leu 2-3, leu 2-112, Kan<sup>R</sup>) usando o protocolo de transformação descrito por Hinnem *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1978, 75, 1979). As células de levedura transformadas foram seleccionadas em placas com meio mínimo para leveduras deficientes em leucina. Isolaram-se colônias individuais de leveduras transformadas e designaram-se Saccharomyces cerevisiae GRF 18 /<sup>-</sup>pJDB207 R/PH05-BF7. Tais células de levedura transformadas foram crescidas em 50 ml de meio mínimo para leveduras (Difco Yeast Nitrogen Base sem aminoácidos ao qual se adicionou 2% de glucose, 20 mg/l de L-histidina e 10 g/l de L-asparagina com agitação a 30°C durante 25 horas até uma densidade de  $3 \times 10^7$  células/ml. As células foram lavadas em 0,9% NaCl e usadas para inocular 100 ml de meio mínimo com baixo teor de Pi preparado de acordo com a receita do meio Difco Yeast Nitrogen Base (sem aminoácidos) com 0,03 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l de KCl, 10 g/l de L-asparagina em vez de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2% e 1 g/l de L-histidina. O meio foi inoculado para DO<sub>600</sub> de partida de 0,25. As células cresceram a 30°C até 38 horas e foram colhidas a uma DO<sub>600</sub> de cerca de 10. As células de 35 ml de meio de Pi baixo foram colhidas por centrifugação e ressuspensas num volume total de 4 ml de tampão fosfato de sódio 66 mM pH 7,4 e 0,1% (v/v) de Triton X-100<sup>R</sup>. Transferiu-se a suspensão de células para um tubo Corex de 30 ml. Adicionou-se 8 g de pérolas de vidro (0,4 mm de diâmetro) e a suspensão foi agitada num Vor-



tex Mixer (Scientific Instruments Inc., USA) a toda a velocidade durante 4 min e depois arrefecido num banho de gelo. Mais de 90% das células ficaram rebentadas por este processo. Os detritos celulares e as pérolas de vidro foram sedimentadas por centrifugação durante 10 min a 8000 rpm a 4°C num rotor Sorval HB4. Os polipeptídeos com actividade de factor de ligação a IgE foram purificados a partir dos sobrenadantes usando cromatografia de afinidade conforme descrito nos Exemplos 22 e 23.

#### EXEMPLO 26

##### Montagem dos plasmídeos pCAL5-R/ND e pCAL8-BF/ND para a expressão de polipeptídeos com actividade de ligação a IgE em culturas de células de mamíferos

Neste exemplo é descrita a construção dos plasmídeos pCAL5-R/ND e pCAL8-BF/ND (ver Figura 7). Eles permitem a produção de receptor de IgE ligado a membranas ou factor de ligação de IgE secretado em culturas de células de mamífero. Ainda, estes plasmídeos foram projectados para a selecção de amplificação de genes nas células hospedeiras, um processo que conduz a altos rendimentos do polipeptídeo pretendido.

##### 26.1 Construção do plasmídeo pCAL5

Para preparar o DNA vector use-se o plasmídeo pSV2911 neo / Asselbergs, F.A.M., et al (1986)

J. Mol. Biol. 184, 401-4117. Digeriu-se com as enzimas de restrição HindIII e Sall. Obtiveram-se fragmentos de 3,9 e 1,8 kb. A mistura foi tratada com fosfatase alcalina e isolado o fragmento de 3,9 kb após electroforese num gel de 1% de agarose. Paralelamente, prepararam-se duas inserções de DNA que codificam o receptor de IgE e a metade 3' do gene da beta-globina de coelho, respectivamente. Por um lado 10 µg do plasmideo pCAL3 (Exemplo 20; Figura 4) foram digeridos parcialmente com HindIII e completamente com BamHI. A inserção de cDNA de 1,26 kb foi isolada por electroforese em gel de agarose e eluição do gel. Por outro lado, 10 µg do plasmideo pUP (Weber, F. e Schaffner, W. (1985) Nature 315, 75-77) foram digeridos completamente com BamHI e Sall. O fragmento de DNA de 1,2 kb foi isolado. Ele contém um intrão grande e o sinal poli (A) do gene da beta-globina de coelho.

Ligaram-se 10 ng do DNA vector referido atrás e 10 ng de cada uma das inserções de DNA. Usou-se o DNA resultante para transfectar células competentes E.coli HB101. Selecionou-se um plasmideo recombinante (pCAL5; Figura 7) que apresenta o padrão de restrição esperado após introdução de ambas as inserções de DNA no DNA vector.

## 26.2 Construção do plasmideo pCAL5-R/ND

Digeriu-se parcialmente com Sall 10 ng de DNA do plasmideo pCAL5. As moléculas de DNA que são cortadas num único sitio e portanto representam DNA linearizado de tamanho completo, foram purificados por electroforese em gel de agarose. Paralelamente, 10 µg de DNA do plasmideo pND2 (Asselbergs et al; loc. cit.) foram totalmente clivados com XhaI e Sall. Estes plasmideos contêm duas marcas selectivas, neomicina (neo) e di-hidrofolato redutase (dhfr)

as quais permitem seleccionar integração e amplificação, respectivamente, de DNA estranho no genoma de hospedeiros mamíferos. O DNA de pND2 clivado foi tratado com fosfatase alcalina. Depois, misturaram-se e ligaram-se 10 ng de pCAL5 clivado com SalI e 10 ng de DNA do plasmideo pND2 clivado com SalI/XhoI. O DNA resultante foi usado para transformar células competentes E.coli HB101. As células transformadas foram espalhadas numa placa de agar contendo caldo LB e 50 µg/ml de canamicina. Escolheram-se um plasmideo recombinante (pCAL5-R/ND, Figura 7) tendo o padrão de restrição do DNA esperado para a expressão do receptor de IgE em hospedeiros mamíferos. Ele possui as marcas selectivas neo e dhfr a jusante do cDNA do receptor de Ige. A direcção da transcrição é idêntica nos três genes.

### 26.3 Construção do plasmideo pCAL8-BF/ND

O plasmideo pCAL8-BF/ND é um derivado do plasmideo pCAL5-R/ND descrito atrás, em que a sequência de DNA codificadora dos aminoácidos 1 a 147 do polipeptideo com a fórmula I foi substituída por uma nova sequência de DNA codificadora da sequência sinal da hemaglutinina da influenza aviária. Esta alteração permite a secreção dos factores de ligação a Ige compreendendo os aminoácidos 148 a 321 do polipeptideo da fórmula I.

Para tal, sintetizou-se quimicamente um fragmento de dsDNA de acordo com os métodos convencionais descritos nas referencias 4, 5, 6, 6a, 7, 8 tendo a fórmula:

5'-pAGCTTACCATGGCTACCCAGATCTTGGTGTTCGCTCTGGTGGCCGTCATTCCTACAAACGGCG

ATGGTACCGATGGGTCTAGAACCAAGCGAGACCACCGGCAGTAAGGATGTTTGGCGGATTP-5'

Ligou-se 0,2 ng deste DNA com 10 ng do DNA vector e 2 ng de uma inserção de cDNA DdeI/XbaI de 0,7 kb. O vector é obtido a partir do DNA do plasmideo pCAL5 por (a) digestão completa com XbaI e HindIII, (b) desfosforilação com fosfataes alcalina e (c) purificação em gel de agarose do DNA vector de 5,9 kb. O fragmento inserção de cDNA de 0,7 kb derivou de pCAL3 (Exemplo 20). 30  $\mu$ g de DNA do plasmideo pCAL3 foram digeridos com HindIII e XbaI e a inserção de cDNA de 0,8 kb foi isolada por purificação em gel de agarose 3  $\mu$ g deste fragmento de 0,8 kb foi digerido com D de I, produzindo assim fragmentos de DNA de 0,1 e 0,7 kb. Finalmente isolou-se o fragmento de 0,7 kb por electroforese em gel de agarose e purificação.

O DNA ligado foi usado para transformar células competentes E.coli HB101. Selecionou-se um plasmideo recombinante (pCAL8; Figura 7) que apresentava os fragmentos de restrição esperados após integração da inserção de DNA no DNA vector.

Digeriu-se 10  $\mu$ g de DNA do plasmideo pCAL8 foram totalmente digeridas com Sall. As moléculas de DNA linear foram purificadas por electroforese em gel de agarose. Ligaram-se 10 ng de pCAL8 clivado com Sall com 10 ng do plasmideo pND2 clivado com Sall/XhoI (Exemplo 26.2). O DNA ligado foi usado para transformar células competentes E.coli HB101 que se semearam em placas de agar contendo meio LB suplementado com 50  $\mu$ g/ml de canamicina. Selecionou-se um plasmideo recombinante (pCAL8-BF/ND; Figura 7) para a expressão e produção de IgE-BFs em hospedeiros mamiferos transformados.

EXEMPLO 27Selecco de linhas celulares de mamifero transformadas expres-  
sando polipeptideos com actividade de ligao a IgE

Os métodos usados para a transfec-  
co de células de mamifero com DNA, assim como selecco de  
células transformadas e selecco da amplificaco de genes  
estão descritos detalhadamente (Patente dos Estados Unidos  
4 395 216 (1983); Kaufman, R.J. e Sharp, P.A. (1982), J. Mol  
Biol. 159, 601-621) e são bem conhecidos dos que trabalham  
no assunto. Usou-se como hospedeiro um mutante negativo para  
a dihidrofolato redutase ( $dhfr^-$ ) de uma linha celular de ov-  
rio de hamster Chinês (Linha celular DUK X-B1; Chasin, L.A.  
e Urlaub, G., (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220).  
As células são mantidas em meio MEM (Gibco, Paisley, Scotland)  
suplementado com 5% de FCS dialisado e 0,1 mg/ml de gentami-  
cina (Gibco). Transfectaram-se células CHO subconfluentes  
com 10  $\mu$ g de DNA dos plasmideos pCAL5-R/ND ou pCAL8-BF/ND  
usando o método de coprecipitaco com Ca-fosfato. As células  
transfectadas são cultivadas em meio Alfa-MEM suplementado  
com 5% FCS, gentamicina e 0,5 mg/ml de G418 (Gibco).

Após duas semanas surgiram col-  
nias isoladas de células resistentes a G418. 48 colnias fo-  
ram transferidas individualmente para os poços de placas de  
microtitulao de 24 poços e cultivadas até a confluência  
do meio de selecco descrito atrás. Removeram-se então ali-  
quotas do meio e testaram-se quanto  presença da activida-  
de de ligao a IgE usando a RIA descrita no Exemplo 7. Cer-  
ca de 50% das colnias são positivas e produzem aproxima-  
mente 0,1-10 ng de polipeptideo recombinante por ml. As co-  
lnias transformadas derivadas do plasmideo pCAL8-BF/ND são

geralmente melhores produtores do que as obtidas com o plasmídeo pCAL5-R/ND. As cinco melhores colônias produtoras foram usadas para amplificação de genes com metotrexato (Kaufman e Sharp op.cit.). Após vários ciclos de amplificação, obtiveram-se linhas celulares que produzem até 1 µg/ml de polipeptídeo recombinante. O melhor produtor, a linha celular CHO-BF/ND, cultivou-se por cultura em bloco. Semeou-se aproximadamente  $3 \times 10^6$  células por frasco de cultura de tecidos (Falcon, 175 cm<sup>2</sup>) com 50 ml de meio de seleção. Após a camada celular ter atingido a confluência, o meio foi removido e substituído por 50 ml de meio Alfa-MEM suplementado com 1% FCS e 0,1 mg/ml de gentamicina. Colheu-se o meio duas vezes por semana durante várias semanas. Centrifugou-se durante 10 minutos a 5000 g e guardou-se a -20°C. Finalmente, os polipeptídeos recombinantes com actividade de ligação a IgE foram purificados a partir dos sobrenadantes combinados por cromatografia de afinidade conforme aqui já foi descrito, e.g. nos Exemplos 22 e 23.

Purificação de IgE-BF natural de células RPMI 8866 e análise da sequência

Através da purificação a partir das fracções contendo IgE-BF de sobrenadantes da linha celular RPMI 8866 (EP 86810244.3) de acordo com os Exemplos B e D que se seguem é possível obter um IgE-BF que seja suficientemente puro para sequenciação e determinação do extremo amino.

EXEMPLO A

Ensaio imunoadsorvente ligado a enzima (ELISA) de IgE-BF

Testaram-se as fracções de IgE-BF do seguinte modo: Revestiram-se poços de placas de microtitulação em PVC com Mab-176 (5 µg/ml em PBS; 100 µg por poço) durante a noite numa câmara húmida à temperatura ambiente. Lavaram-se as placas duas vezes com PBS antes do bloqueio dos locais de ligação não específicos com PBS contendo 0,2% de gelatina (150 µl/poço; 1 h a 37°C). As placas foram lavadas de novo duas vezes com PBS. As fracções das experiências de cromatografia foram diluídas a 1/50 em PBS, adicionadas aos poços (100 µl/poço) e incubadas durante a noite à temperatura ambiente numa câmara húmida. Lavaram-se as placas 4 vezes com PBS. O IgE-BF ligado foi detectado pela adição do Mab-135 ao qual se ligou covalentemente biotina (Exemplo 19, EP 86810244.3) (0,5 µg/ml em PBS contendo 0,2% de gelatina; 100 µl/poço) e incubado 4 h a 37°C numa câmara húmida. Após lavagem com PBS (4 vezes) as placas foram incubadas com 100 µl de um conjugado de avidina e fosfatase alcalina (Sigma Cat. Nº A 2527 0,5 µg/ml) em PBS contendo 0,2% de gelatina durante 2 h a 37°C. Após lavagem adicional com PBS as placas foram reveladas com 1 mg/ml de p-nitrofenilfosfato di-sódico em tampão substrato (100 mg MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 200 mg NaN<sub>3</sub>, 97 ml de dietanolamina dissolvida em 800 ml de H<sub>2</sub>O, pH ajustado a 9,8 com 37% HCl). A reacção de cor amarela fica óptima após 20-40 min a 37°C. Parou-se então a reacção com 50 µl de NaOH (1M) por poço. Determinou-se a densidade óptica usando um Leitor EIA Modelo 2550 (Bio-Rad) a 405 nm.

EXEMPLO B

Purificação de IgE-BF a partir de sobrenadantes de células B humanas por cromatografia de imunoafinidade

Filtrou-se 10 litros de sobrenadante de culturas de células RPMI 8866 através de uma coluna de 20  $\mu$ l de Mab-45-affigel (Exemplo 10 de EP 86810244.3) a um fluxo de 120 ml/h. O gel foi lavado com PBS. O teor proteico do volume de exclusão foi controlado por absorvância a 280 nm usando um espectofotômetro Uvicord<sup>R</sup> para assegurar remoção completa das proteínas não ligadas. Eluiu-se a coluna com 50 ml de glicina-HCl 0,1M, pH 2,6. Colheram-se frações em tubos contendo igual quantidade de 1M Tris-HCl, pH 8,0 e 0,5% Tween 20. As frações contendo IgE-BF foram reunidas e dializadas contra 10 mM Tris-HCl, pH 7,4.

EXEMPLO C

Purificação de IgE-BF por cromatografia de permuta iônica

IgE-BF purificado do Exemplo B foi aplicado numa coluna de permuta aniônica SynChropak AX 300 (SynChron Inc. hiden, IN). Lavou-se a coluna com 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 e a proteína foi eluída com um gradiente de 0 a 1M NaCl em 100 min a um fluxo de 1 ml/min. A eluição foi controlada por absorção de UV a 254 nm. Colheram-se as frações em 1% de octilpiranoglicosido (Sigma) e testaram-se para IgE-BF conforme descrito no Exemplo A.



EXEMPLO D

Posterior purificação de IgE-BF por cromatografia de fase re-  
versa

Dialisou-se 50 ml de IgE-BF do Exemplo C contra 0,5 l de PBS e duas vezes contra 0,5 l de PBS contendo 0,1% de octilpiranosido. Após liofilização, solubilizou-se o IgE-BF em 1,5 ml de H<sub>2</sub>O e dialisou-se de novo contra 2 x 0,5 l de PBS contendo 0,1 de octilpiranoglu cosido. A cromatografia em fase reversa efectuou-se numa coluna Synlhropak RP-4 (Synlhrom) em 0,1% TFA (Pierce) e 5% de acetonitrilo (Merck). A eluição de IgE-BF foi obtida pela aplicação, de um gradiente de 5 - 60% de acetonitrilo em 0,1% TFA durante 30 minutos a um fluxo de 0,5 ml/min. A eluição foi controlada por absorção de UV a 254 nm. Colhe ram-se fracções de 1 ml para 0,05 SDS e testaram-se para IgE-BF como descrito no Exemplo A. A pureza de IgE-BF foi controlada por SDS-PAGE com subsequente coloração com prata (EP 86810244.3 Exemplo 22).

EXEMPLO E

Análise da sequência de aminoácidos de IgE-BF

O IgE-BF purificado do Exemplo D foi sujeito a análise da sequência do extremo amino usando um sequenciador de proteínas de fase positiva modelo 470 (Applied Biosystems) de acordo com o método de M. W. Hun k a pillar e L. E. Hood, Methods in Enzymology 91, 399, 1983. Os derivados amino-tiozolinona foram rearranjados para ami-



EXEMPLO 28

Elevados níveis de expressão em E.coli de um polipeptideo com actividade de factor de ligação de IgE.

28.1 Construção do plasmideo de expressão: 10 ng de DNA vector de 2,9 kb purificado do Exemplo 24.1 (plasmideo pPLc24 cortado com EcoRI e BamHI) foi misturado com 0,1 ng do oligonucleotideo 5'-pAATTTGGAGGAAAAATTATG (Pharmacia, N<sup>o</sup>27-4878-01) e 0,1 ng do oligonucleotideo 5'-pGATCCATAATTTTTTCCTCCA (Pharmacia, N<sup>o</sup> 27-4898-01) em 20 µl de uma solução contendo 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 0,1 mM ATP, e 100 unidades de DNA ligase de T4 (Boehringer, Mannheim). Após 16 horas a 4<sup>o</sup>C, usou-se a mistura para transformar células competentes E.coli K12. Cultivaram-se colónias individuais e o DNA de plasmideo foi isolado a partir delas. Fez-se análise de restrição convencional para seleccionar um plasmideo correcto (pPL.PTIS; ver Figura 8) o qual foi cortado por BamHI mas não por EcoRI. A inserção correcta dos oligonucleotideos foi confirmada por sequenciação do DNA. O fragmento de DNA inserido de novo codifica um sitio de iniciação da tradução (PTIS, Pharmacia).

Digeriu-se 10 µg de DNA do plasmideo pPL PTIS com Bam HI, depois tratou-se com fosfatase alcalina e o DNA vector de 2,9 kb foi purificado por electroforese em gel de agarose. Ligou-se 10 µg deste DNA vector com 3 ng do fragmento BglIII a Bam HI de 0,8 kb derivado do plasmideo pCAL-3 (exemplo 20) e depois usou-se para transformar células competentes E. coli k12. O DNA de plasmideo foi isolado a partir de colónias individuais e a análise de restrição convencional efectuada para seleccionar um plasmideo, pPl. PTIS-BF, tendo a inserção de 0,8 Kb na orientação correcta (Figura 8).

Usou-se o plasmídeo pPLPTIS-BF para transformar E. coli estirpes W3110 e HB101, ambas portadoras de  $\lambda$ IB57 (Remaut et al., loc. cit.). Os transformantes foram semeados em placas LB contendo 40  $\mu$ g/ml de canamicina e ampicilina e crescidos por incubação a 30°C durante 24 horas. As colônias recombinantes resultantes foram usadas para fermentação.

28.2 Fermentação: As estirpes recombinantes de E. coli obtidas no Exemplo 28.1 foram cultivadas como descrito no Exemplo 24.2. Após 3 horas de indução a 42°C as culturas foram arrefecidas durante 30 minutos num banho de gelo/água e colhidas por centrifugação.

28.3 Purificação de polipeptídeos com actividade de ligação a IgE: o sedimento de células obtido a partir de 1l de cultura induzida pelo calor foi ressuspense em 20 ml de 50 mM tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA a 4°C. A suspensão de células foi sonicada ao mesmo tempo que era constantemente arrefecida em gelo (MSE Soniprep<sup>R</sup> 150, sonda de 9,5 mm amplitude de 24 microns) durante 4 x 30 segundos com intervalos de um minuto. A suspensão foi então centrifugada durante 10 minutos (centrifuga Sowall, rotor HB-4, 9000 rpm, 4°C). O sedimento foi ressuspense em 20 ml de 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA a 4°C e sonicada durante 30 segundos como descrito atrás. A suspensão foi centrifugada como descrito atrás e o ciclo de lavagem repetido mais duas vezes.

### Breve descrição das Figuras

Figura 1: Preparação dos plasmídeos pCL-1 e pCL-2 contendo como inserção ds-cDNA de mRNA isolado de células B RPMI 8866. O cDNA da inserção codifica polipeptídeos relacionados com receptores de IgE e factores de ligação a IgE.

Figura 2: As duas inserções dos plasmídeos pCL-1 e pCL-2 são comparadas, mostrando as regiões codificadoras idênticas em ambas as inserções, as regiões não codificadoras idênticas em ambas as inserções, a região codificadora presente apenas em pCL-2 e regiões não codificadoras diferentes em ambas as inserções, assim como os sítios de restrição.

Figura 3: Construção do plasmídeo pGEM<sup>TM</sup>-1/CL2 a partir de pCL-2 e pGEM<sup>TM</sup>-1 e transcrição da inserção de DNA em mRNA.

Figura 4: A construção dos plasmídeos pFK-1, com a inserção codificadora da sequência de aminoácidos Asp<sub>119</sub> a Ser<sub>321</sub> e pFK-2, codificador da sequência de aminoácidos de Ala<sub>134</sub> a Ser<sub>321</sub> da Fórmula I, começando com o plasmídeo pCL-2.

Figura 5: A construção do plasmídeo pBL-BF para expressão de IgE-BF em *E. coli* w3110 e HB101. São expressos os aminoácidos 119 a 321 sob o promotor P<sub>L</sub> do fago  $\lambda$ .

Figura 6: A construção do plasmídeo pJDB207R/PH05-BF para expressão de IgE-BF em *Saccharomyces cerevisiae*.

São expressos os aminoácidos 119 a 321 sob o controle do promotor p $\text{H05}$ .

Figura 7: A construção dos plasmídeos pCAL5-R/ND e pCAL8-BF/ND para a expressão do receptor de IgE ligado a membranas ou do IgE-BF secretado, respectivamente, em células de mamífero em cultura (células de ovário de hamster Chinês).

Figura 8: A construção do plasmídeo pPL.PTIS-BF para transformação e expressão de IgE-BF em E. coli.

Legende: Enzimas de restrição

A = HaeII	G = BglIII
B = BamHI	H = HindIII
C = HincII	N = NcoI
E = EcoRI	P = PstI
	R = RsaI

sequência codificadora do polipeptídeo relacionado com receptores de IgE e/ou IgE-BFs

sequência codificadora específica de pCL-2 (Fig. 2)

sequência não codificadora diferente em pCL-1 e pCL-2

sequência não codificadora, idêntica em pCL-1 e pCL-2 (Fig. 2)

mRNA

#### Disposição de Microorganismos

A Escherichia coli HB101/pCL-2 contendo o plasmídeo pCL-2 foi depositado em 30 de Julho, 1986 no Deutsche Sammlung fur Mikroorganismen, Grisebachstrasse 8, D-3400 Gottingen, com o número de Acesso DSM 3807.

Referências

1. Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)
2. Okayama and Berg, Molecular and Cellular Biology 2, 161-170 (1982)
3. Heidecker and Messing, Nucleic Acids Research 11, 4891-4906 (1983)
4. S.A. Narang et al., Anal. Biochem. 121, 365 (1982)
5. K.L. Agarwal et al., Angew. Chem. 84, 489 (1972)
6. C.B. Reese, Tetrahedron 34, 3143 (1972)
- 6a. R.L. Letsinger et al., J.Am.Chem.Soc. 98, 3655 (1976)
7. Khorana et al., J.Biol.Chem. 251, 565 (1976)
8. S.A. Narang, Tetrahedron 39, 3 (1983)
9. Chang et al., Nature, 275:615 (1978)
10. Goedell et al., Nature, 281:544 (1979)
11. Goedell et al., Nucleic Acid Res., 8: 4057 (1980)
12. Siebenlist et al., Cell 20: 269 (1980)
13. J. Gharayeb et al., The EMBO Journal, Vol. 3, 2437-2442 (1984)
14. Stinchomb et al., Nature, 282: 39 (1979)
- 14a. Kingsman et al., Gene, 7: 141 (1979)
15. Tschemper et al., Gene, 10, 157 (1980)
16. Melton, D.A. et al. (1984) Nucleic Acids Research 12, 7035-7056
17. M. Sarfati et al., Immunology, 1984, 53, 197-205
18. J.B. Gurdon, The control of gene expression in animal development, Clarenton Press, Oxford, 1974
19. F.C. Greenwood et al., Biochem. J. 89, 114 (1963)
20. B. Seed, Nucleic Acids Res. 10, 1799-1810 (1982)
21. F. Sanger et al., Proc.Nat.Acad.Sci. USA 74, 5463-5467



R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1ª. - Método para a produção de um polipeptideo tendo a sequênciã de aminoácidos com a fórmula

```

      10      20      30
M E E G Q Y S E I E E L P R R R C C R R G T Q I V L L G L V
      40      50      60
T A A L W A G L L T L L L L W H W D T T Q S L K Q L E E R A
      70      80      90
A R N V S Q V S K N L E S H H G D Q M A Q K S Q S T Q I S Q
      100     110     120
E L E E L R A E Q Q R L K S Q D L E L S W N L N G L Q A D L
      130     140     150
S S F K S Q E L N E R N E A S D L L E R L R E E V T K L R M
      160     170     180
E L Q V S S G F V C N T C P E K W I N F Q R K C Y Y F G K G
      190     200     210
T K Q W V H A R Y A C D D M E G Q L V S I H S P E E Q D F L
      220     230     240
T K H A S H T G S W I G L R N L D L K G E F I W V D G S H V
      250     260     270
D Y S N W A P G E P T S R S Q G E D C V M M R G S G R W N D
      280     290     300
A F C D R K L G A W V C D R L A T C T P P A S E G S A E S M
      310     320
G P D S R P D P D G R L P T P S A P L H S , (I)
      321

```

de um seu fragmento, mutante ou derivado, caracterizado por

a) se cultivar um hospedeiro transformado contendo

um vector híbrido compreendendo uma sequência de DNA codificadora de um polipeptideo com a fórmula (I), um seu fragmento ou mutante, ou

b) se traduzir num sistema de tradução adequado o mRNA codificador de um polipeptideo com a fórmula (I), um seu fragmento ou mutante, e quando necessário, se transformar um polipeptideo com a fórmula (I), um seu fragmento ou mutante, num seu derivado.

2ª. - Método para a produção de um fragmento de um polipeptideo com a fórmula (I) de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a sequência de aminoácidos compreendendo os aminoácidos 106 a 127 ser eliminada.

3ª. - Método para a produção de um fragmento de um polipeptideo com a fórmula (I) de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ele ser selecionado do grupo constituído por polipeptideos começando com qualquer um dos aminoácidos 120, 121, 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 ou 160 e terminando com o aminoácido 321.

4ª. - Método para a produção de um fragmento de um polipeptideo com a fórmula (I) de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ele ser selecionado do grupo constituído pelos polipeptideos que começam em qualquer um dos aminoácidos 120, 121, 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 ou 160 e terminando com qualquer um dos aminoácidos entre 282 e 321.

5ª. - Método para a produção de um fragmento de um polipeptideo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ele consistir na sequência de aminoácidos entre o aminoácido 119 e o aminoácido 321.

6ª. - Método para a produção de um fragmento de um polipeptideo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ele consistir na sequência de aminoácidos entre o aminoácido 134 e o aminoácido 321.

7ª. - Método para a produção de um fragmento de um polipeptideo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ele consistir na sequência de aminoácidos entre o aminoácido 148 e o aminoácido 321.

8ª. - Método para a produção de um fragmento de um polipeptideo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ele consistir na sequência de aminoácidos do aminoácido 150 ao aminoácido 321.

9ª. - Método para a produção de um mutante ou de um derivado de um fragmento de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 8.

10<sup>a</sup>. - Método para a preparação de um hospedeiro transformado capaz de expressar um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por

1. se preparar um DNA codificador de um polipeptídeo com a fórmula (I) um seu fragmento, mutante ou derivado,

2. se incorporar o DNA obtido num vector adequado,

3. se transformar um hospedeiro adequado com o vector híbrido obtido,

4. se seleccionar os hospedeiros transformados de entre os hospedeiros não transformados e, facultativamente, se isolar o vector híbrido a partir do hospedeiro transformado, se modificar a região codificadora ou não codificadora do vector híbrido e se realizar de novo os passos 3 e 4.

11<sup>a</sup>. - Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por se usar um vector híbrido, compreendendo uma inserção codificadora de um polipeptídeo com a fórmula (I) em que a sequência de aminoácidos compreendendo os aminoácidos 106 a 127 foi eliminada.

12<sup>a</sup>. - Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por se usar um vector híbrido, compreendendo uma inserção codificadora de um fragmento do polipeptídeo com a fórmula (I), que é seleccionado do grupo constituído pelos polipeptídeos que começam com qualquer um dos aminoácidos 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 ou 160 e terminando com o aminoácido 321.

13<sup>a</sup>. - Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por se usar um vector híbrido, compreendendo uma inserção codificadora de um fragmento do polipeptideo com a formula (I) o qual é seleccionado do grupo constituido por polipeptideos que começam com qualquer um dos aminoácidos 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 ou 160 e terminando com qualquer um dos aminoácidos entre 282 e 321.

14<sup>a</sup>. - Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por se usar um vector híbrido, compreendendo uma inserção codificadora de um fragmento do polipeptideo com a formula (I), que consiste na sequência de aminoácidos do aminoácido 119 ao aminoácido 321.

15<sup>a</sup>. - Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por se usar um vector híbrido, compreendendo uma inserção codificadora de um fragmento do polipeptideo com a fórmula (I) que consiste na sequência de aminoácidos do aminoácido 134 ao aminoácido 321.

16<sup>a</sup>. - Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por se usar um vector híbrido, compreendendo uma inserção codificadora de um fragmento do polipeptideo com a formula (I) que consiste na sequência de

aminoácidos do aminoácido 148 ao aminoácido 321.

17<sup>a</sup>. - Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por se usar um vector híbrido, compreendendo uma inserção codificadora de um fragmento do polipeptideo com a fórmula (I), que consiste na sequência de aminoácidos do aminoácido 150 ao aminoácido 321.

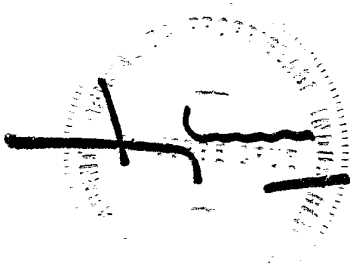
18<sup>a</sup>. - Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por se usar um vector híbrido, compreendendo uma sequência de DNA com a fórmula (II) ou (III) ou um seu fragmento ou mutante.

19<sup>a</sup>. - Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por se usar o vector híbrido pCL2.

20<sup>a</sup>. - Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por se usar o vector híbrido pCL1.

21<sup>a</sup>. - Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por se usar o vector híbrido pPL-BF.

22<sup>a</sup>. - Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por se usar o vector híbrido pCAL8-BF/ND.

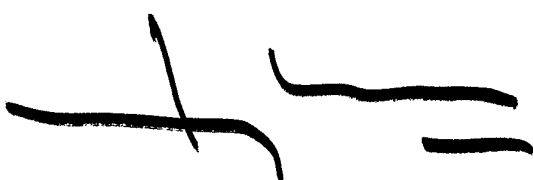


23ª. - Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por se usar o vector híbrido pPL.PTIS-BF.

24ª. - Método para a preparação de um vector híbrido de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por um DNA codificador de um polipeptídeo com a fórmula (I), um seu fragmento, mutante ou derivado ser enlaçado ("spliced") num vector adequado.

25ª. - Método para a preparação de um vector híbrido de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por se preparar qualquer um dos vectores híbridos das reivindicações 11 a 24.

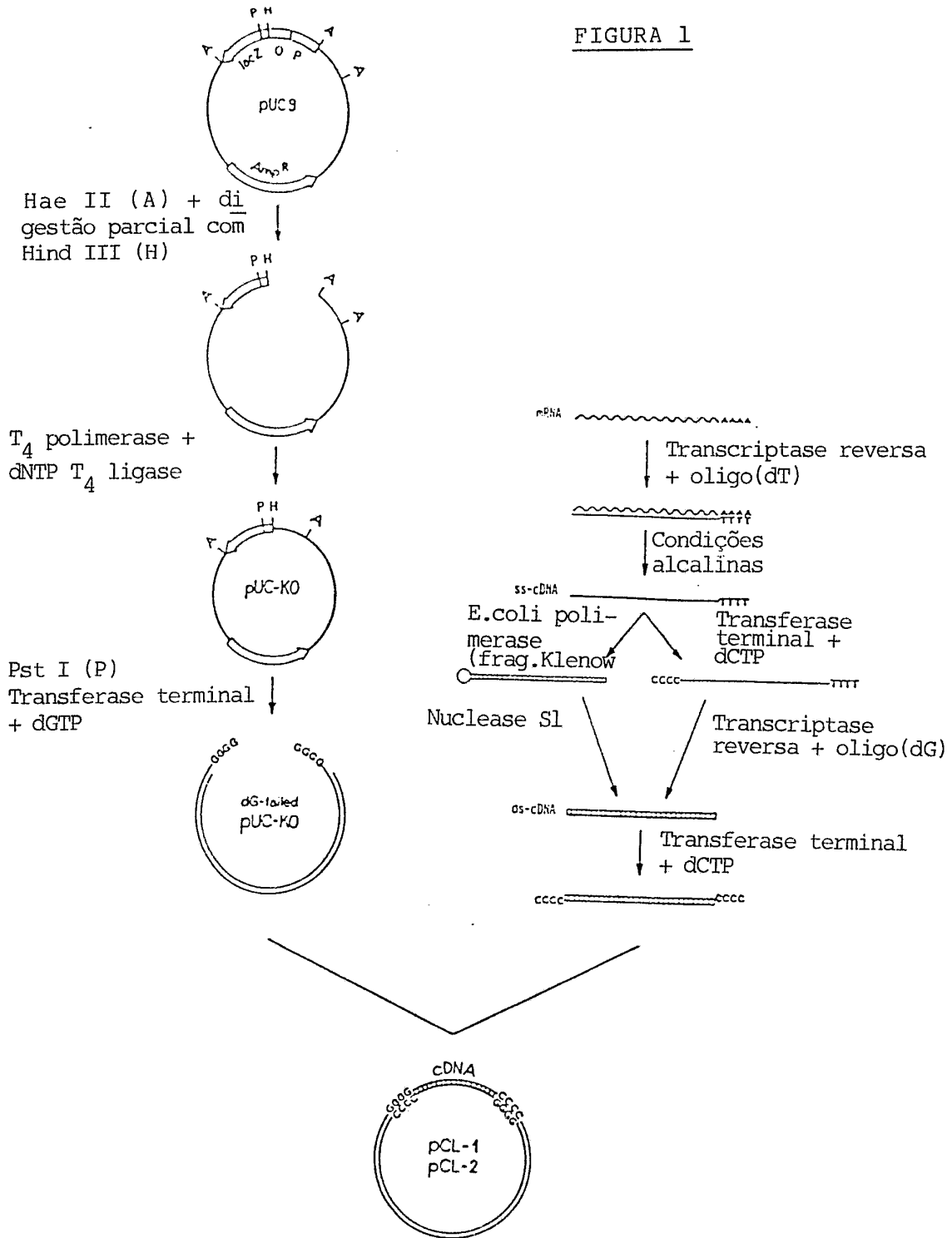
Lisboa, 20 de Julho de 1987



**J. PEREIRA DA CRUZ**  
Agente Oficial da Propriedade Industrial  
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.ª  
1200 LISBOA

*[Handwritten signature]*

FIGURA 1





*[Handwritten signature]*

FIGURA 2

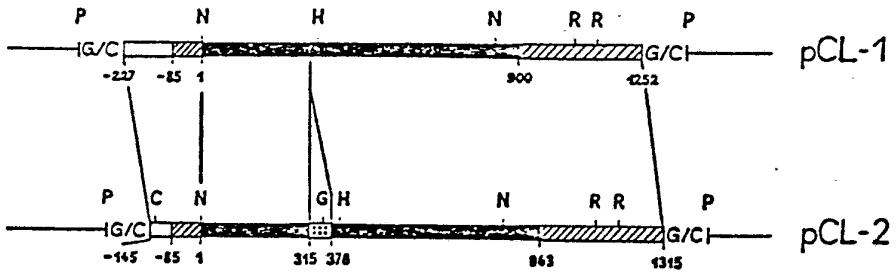


FIGURA 3

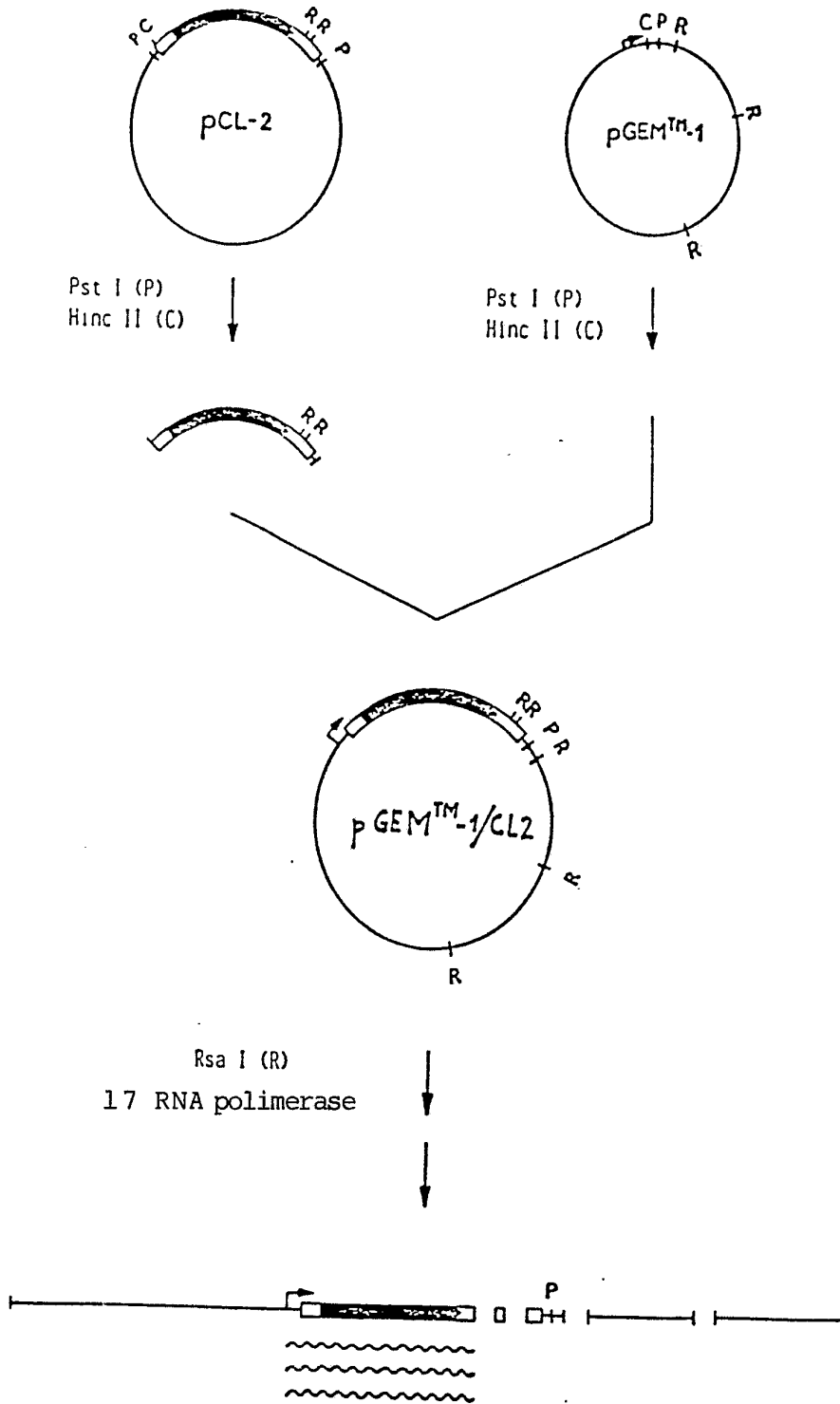


FIGURA 4

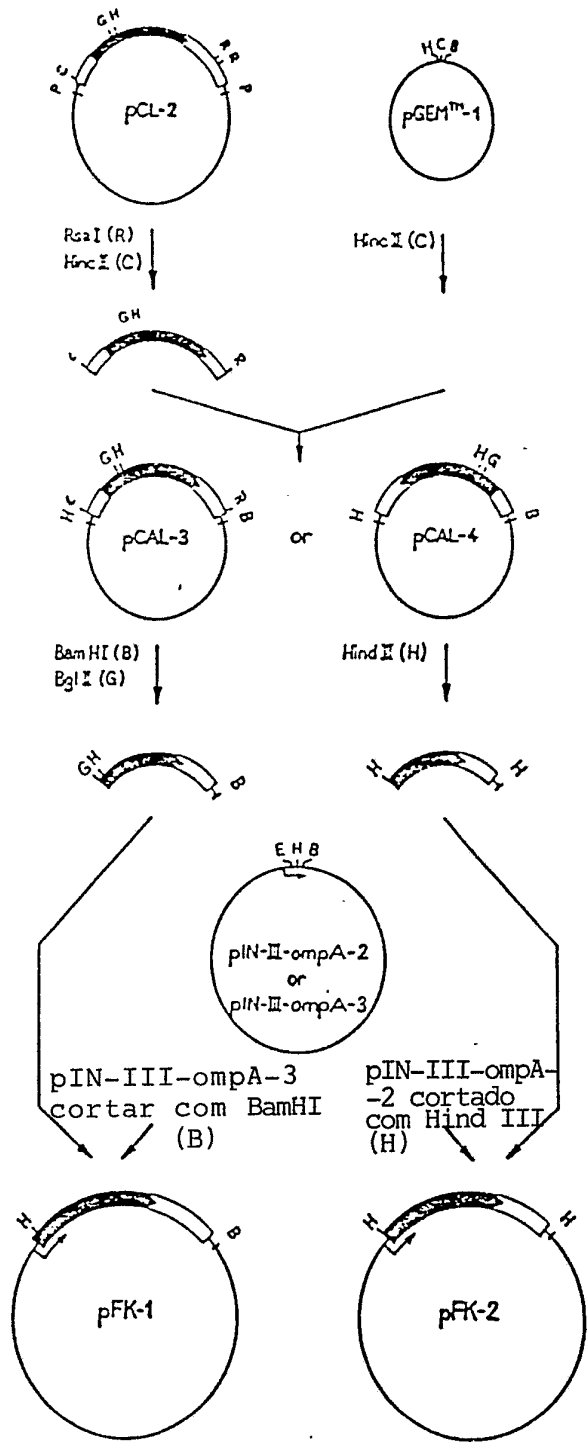


FIGURA 5

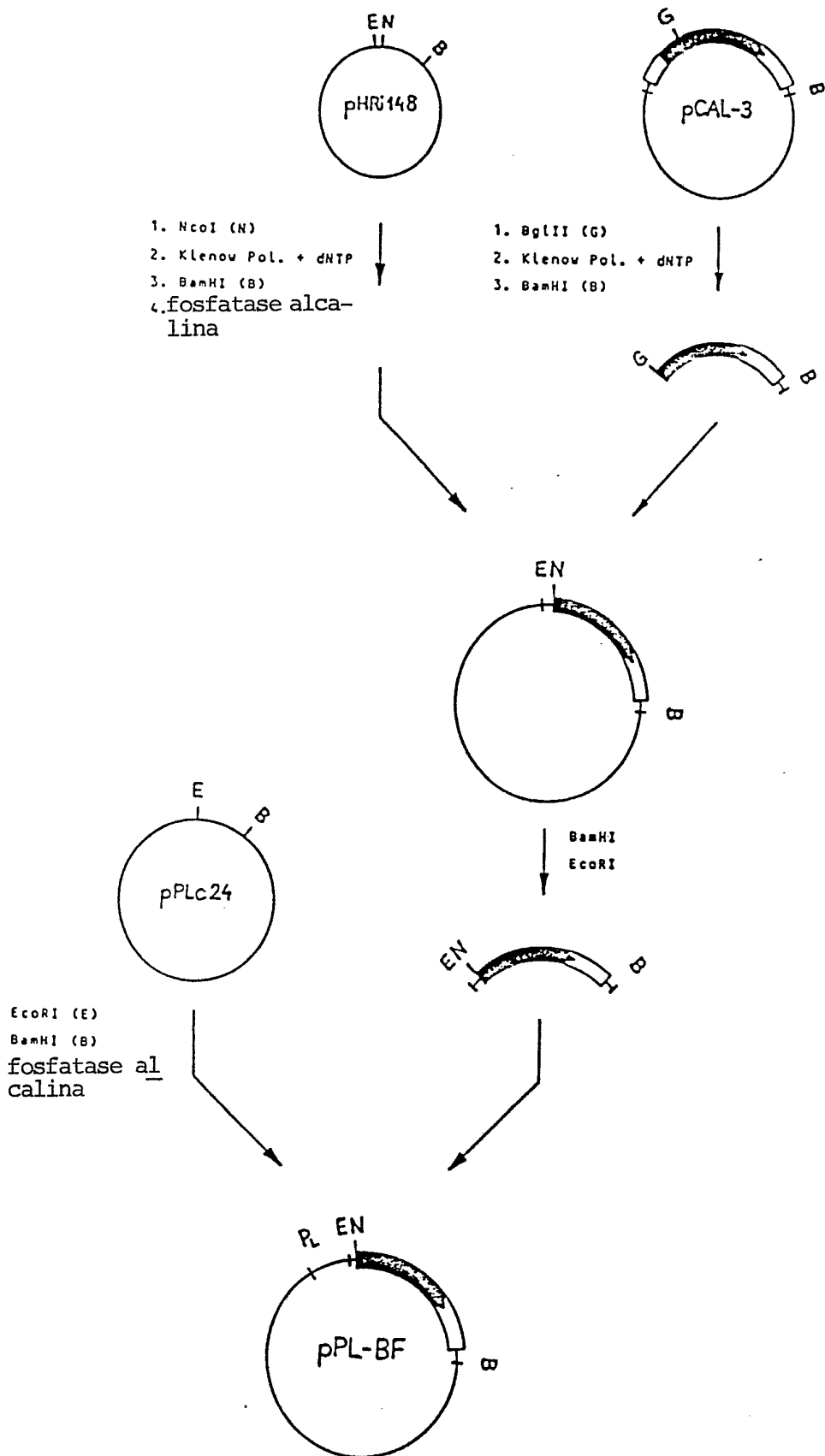


FIGURA 6

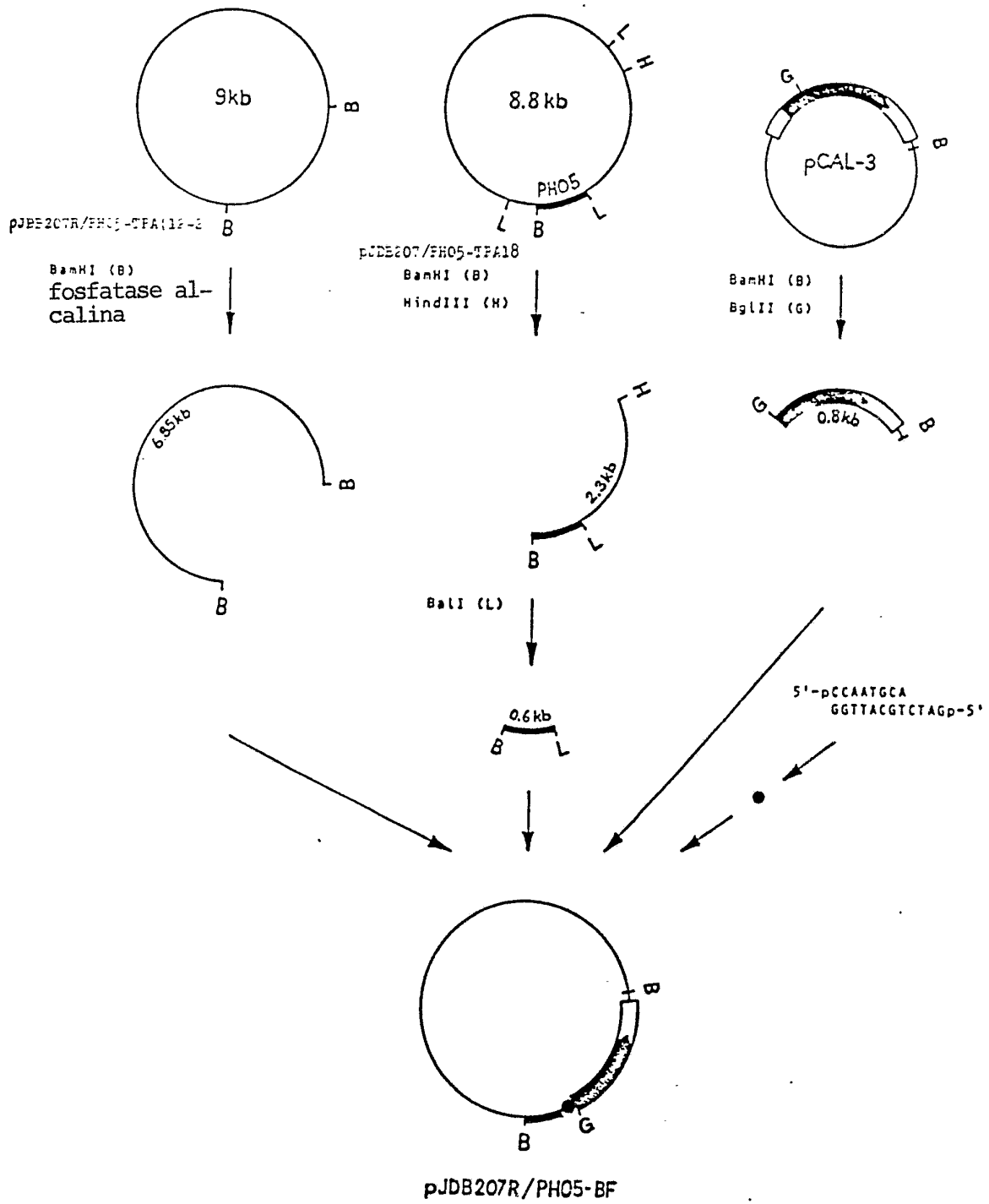
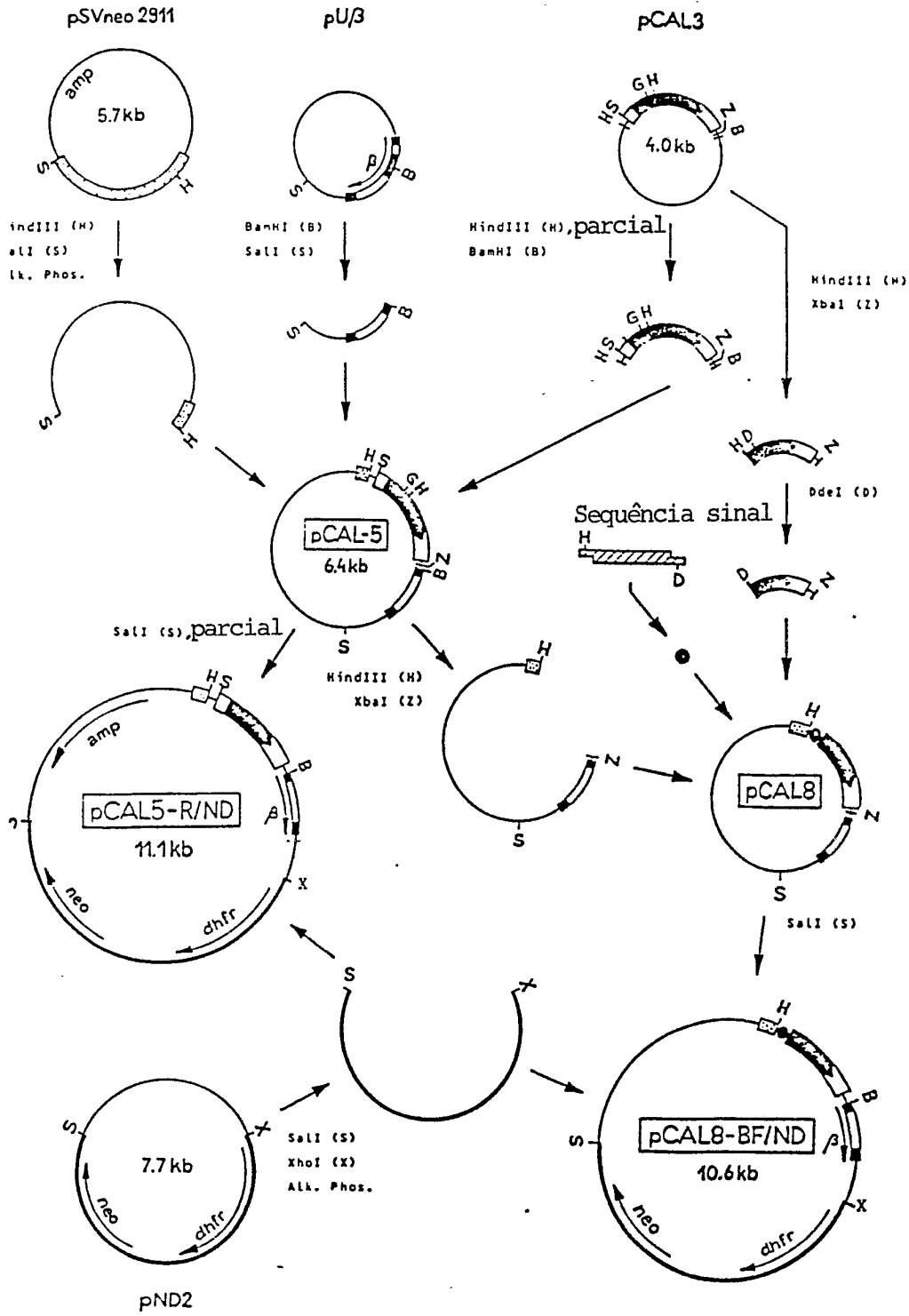


FIGURA 7



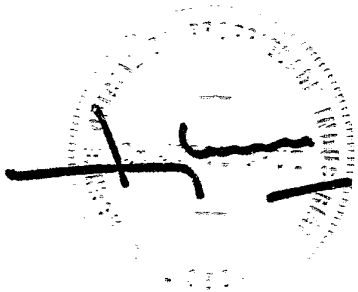


FIGURA 8

