MEMÓRIA DESCRITIVA

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 93.957

NOME: SRI INTERNATIONAL

EPÍGRAFE: "METODO E VECTORES PARA ESTABILIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEINAS HETEROLOGAS"

INVENTORES: Paul H. Johnson, norte-americano, Jerome B. Lazar, norte-americano, e Indira Sohel, indiana, todos cientistas, residentes respectivamente em 652 San Benito Avenue, Menlo Park, California 94025, em 1377 Bluebird Court, Sunnyvale, California 94087, e em 34666 Siward Drive, Fremont, California 94536, Estados Unidos da América

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção da União de Paris de 20 de Março de 1883.
4 de Maio de 1989, nos Estados Unidos da América, sob o Nº.07/347.545

Titular: SRI INTERNATIONAL

Epígrafe: METODO E VECTORES PARA ESTABILIZAÇAO DA EXPRESSAO DE PROTEINAS HETEROLOGAS

M E M O R I A D E S C R I T I V A

Campo técnico da Invenção

A presente invenção refere-se, na generalidade, aos campos da biotecnologia e purificação de proteínas. Mais particularmente, a invenção refere-se ao campo de expressão de proteínas, tecnologia de DNA recombinante para criar proteínas de fusão expressas de forma estável, e melhorar a produção de polipéptidos expressos de forma insuficiente em hospedeiros microbianos, e a purificação dos componentes individuais da proteína de fusão.

Antecedentes da Invenção

Muitas proteínas heterólogas não são capazes de serem expressas em Escherichia coli em quaisquer quantidades mensuráveis, e, se detectáveis, não são capazes de serem expressas a níveis comercialmente recuperáveis devido à instabilidade da proteina estranha no hospedeiro. As pequenas proteínas (e.g., hormonas peptídicas de menos de 100 aminoácidos) parecem ser especialmente sensíveis à degradação ou proteólise do hospedeiro. O grau de instabilidade varia de hospedeiro para

hospedeiro e de proteína para proteína.

Assim, em muitas situações e por razões que não foram completamente esclarecidas, proteínas heterólogas, apesar do uso de promotores transcricionais activos e elevado número de cópias de plasmídeos, são produzidas em apenas menores quantidades, se não totalmente, num microorganismo hospedeiro. Mais ainda, aqui descrito com grande detalhe, os sistemas de expressão que são bastante adequados para expressão à escala laboratorial de uma proteína desejada não são adequados para fermentação de alta densidade.

Um dos modos pelo qual a instabilidade ou os problemas de degradação proteolítica têm sido resolvidos, emprega o uso de uma sequência de DNA que codifica uma proteína adicional que, por si própria, é estável numa célula hospedeira e que liga esta sequência à sequência de código da proteína desejada. Um pequeno número de proteínas procarióticas tem sido usada como auxiliar de fusão nesta forma: E. coli, lacZ, trpE, cloranfenicol acetil transferase (CTA), recA e cII lambda, por exemplo.

Enquanto a literatura estabelece que proteínas de fusão são úteis para expressão de proteínas heterólogas em bactérias, as tentativas para usar proteínas de mamíferos, como auxiliares de fusão para a expressão ou aumento da produção recuperável de proteínas heterólogas, não têm sido referidas. Mais particularmente, não foi referido o uso do péptido activo do tecido conjuntivo III humano (também referido como CTAP-III), como um componente na construção de proteínas de fusão para estabilizar a expressão de uma proteína insuficientemente expressa ou instável. A luz do facto de que muitas proteínas

importantes não podem ser expressas com sucesso na bactéria em qualquer produção comercialmente recuperável, há a necessidade de desenvolver sistemas adequados para a fermentação de alta densidade, para expressão bacteriana e recuperação de tais proteínas.

DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO

Um dos aspectos da invenção diz respeito a um método de estabilização da expressão de proteínas heterólogas num hospedeiro procariótico, para a produção de uma proteína de fusão, que compreende a construção de um gene híbrido compreendendo uma primeira sequência de DNA que codifica o péptido activador do tecido conjuntivo III, ligado a uma estrutura com uma segunda sequência de DNA que codifica um polipéptido heterólogo, normalmente não recuperável, de forma estável, num sistema de expressão bacteriano, onde o referido gene híbrido , após a tradução, produz uma proteína de fusão em quantidade recuperável.

Um segundo aspecto da invenção diz respeito a um vector de expressão bacteriano capaz de aumentar o nível de expressão de um polipéptido heterólogo instável, produzido bacterianamente, compreendendo um gene híbrido possuindo uma sequência de DNA que codifica o péptido activador do tecido conjuntivo ligado, em estrutura, com uma sequência de DNA heterólogo que codifica um polipéptido instável, normalmente não recuperável em elevada quantidade, num sistema de expressão bacteriana.

Um outro aspecto da invenção fornece um método aperfeiçoado para a produção recombinante da proteína

desejada, que compreende:

(a) ligação da sequência do DNA que codifica a referida proteína heteróloga, em estrutura, com uma sequência de DNA que codifica o péptido activador do tecido conjuntivo III humano (CTAP-III), para formar um gene híbrido que codifica uma proteína de fusão;

(b) introdução do gene híbrido em condições de expressão no referido hospedeiro, pelo qual o referido polipéptido é expresso; e

(c) isolamento da referida proteína de fusão para fornecer o polipéptido em elevada produção.

Ainda outro aspecto da invenção fornece uma sequência de DNA que codifica o péptido activador do tecido conjuntivo III ligado, em estrutura, com uma sequência de DNA que codifica um polipéptido heterólogo, em que as duas sequências de código são unidas por nucleótidos que codificam aminoácidos que definem um sítio de clivagem selectiva tendo, pelo menos, um aminoácido.

As concretizações preferidas das proteínas heterólogas para o uso na invenção descrita acima incluem agentes anticoagulantes e antitrombóticos, tais como a hirudina e péptidos antimetastásicos, como o péptido laminin B_1 aqui descrito.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Fig.1 é a sequência de nucleótido e principal aspecto estrutural do sistema de expressão bacteriana para a proteína CTAP-III.

A Fig.2 é um diagrama que mostra a estratégia de

ligação para a construção do gene sintético para a variante 1 de hirudina (HV-1).

A Fig.3 é um diagrama que mostra a estratégia de ligação para a construção do gene sintético para o factor 4 das plaquetas (PF4).

A Fig.4 é um diagrama que mostra a estratégia de ligação para a construção do gene sintético para a variante 1 do factor 4 das plaquetas (PF4var1).

A Fig.5 é um diagrama que mostra a sequência de nucleótidos e aminoácidos da proteína de fusão pBR-CRM/CTAP (Leu_{21})/HIR.

A Fig.6 é um diagrama que sumariza a construção do vector de expressão do CTAP-III (Leu_{21})/HIR.

A Fig.7 é um diagrama que mostra o perfil de purificação de fase reversa HPLC da(s) proteína(s) CTAP-III/$lamB_1$-40 antes de (A) e após (B) clivagem por brometo de cianogénio.

A Fig.8 é um diagrama que mostra a instabilidade de hirudina livre e a estabilidade da CTAP-III expressa em E. coli.

A Fig.9 é um diagrama que demonstra a estabilidade da proteína de fusão CTAP-III/hirudina, até 11 horas após a indução da expressão em E. coli.

A Fig.10 é um diagrama de fluxo que ilustra o processo de purificação para a hirudina.

A Fig.11 é um diagrama que ilustra a quantificação da expressão da hirudina pela separação da hirudina e do CTAP-III usando a fase reversa HPLC, após a clivagem por brometo de cianogénio.

A Fig.12 é um digrama que ilustra a purificação de hirudina por cromatografia de interacção hidrofóbica (HIC).

A Fig.13 é um diagrama que ilustra o grau de pureza da hirudina após a etapa final de purificação, como calculada pela fase reversa HPLC analítica.

MODOS DE REALIZAR A INVENÇÃO

A. Definições

Os termos "proteína heteróloga", "péptido heterólogo", "polipéptido heterólogo" são usados permutavelmente e referem-se a um péptido ou, pelo menos, a uma porção do qual não está normalmente contida no genoma da célula hospedeira. Exemplos de proteínas heterólogas incluem péptidos virais e eucarióticos codificados por cDNA, DNA genómico ou DNA sintético ou suas combinações.

O termo "expressão de proteína de forma estável", como aqui usado, refere-se a uma propriedade do péptido activador do tecido conjuntivo-III humano, componente da proteína de fusão que confere estabilidade invulgarmente alta in vivo a uma proteína estranha. Por exemplo, a hirudina possui uma semi-vida em E. coli de aproximadamente 10 minutos; contudo a fusão de hirudina CTAP-III tem uma semi-vida superior a 10 horas.

"Fermentação de alta densidade" refere-se a um nível de densidade celular correspondendo, aproximadamente, a uma densidade óptica superior a 10 a 650 nm e que resulta na produção de proteína em cerca de 50 a 1000 mg/l.

"Alta expressão de proteína" ou "Expressão de proteína aumentada" refere-se a um nível de expressão onde a proteína de

fusão pode compreender 5% ou mais do total de proteína produzida por cada célula. A ordem de grandeza preferida para níveis de alta expressão de proteína é de 10 a 30% ou mais, do total de proteína celular.

"Péptido activador do tecido conjuntivo-III" ou "CTAP-III", como aqui usado, refere-se a um polipétido que ocorre naturalmente, isolado a partir de plaquetas humanas, que é capaz de activar células do tecido conjuntivo. Um gene sintético que codifica CTAP-III humano ou análogo do CTAP-III, no qual a metionina na posição 21 é substituída por leucina, é descrito na Publicação Internacional No. WO85/01067, publicado a 14 de Março de 1985, e aqui incorporado especificamente para referência.

"Polipétido CTAP-III homólogo", como é aqui usado, refere-se a uma composição e sequência de aminoácidos que é (a) substancialmente semelhante à sequência primária de CTAP-III humana, nativa, e (b) tem actividade biológica que é comum à CTAP-III nativa. Uma semelhança substancial da sequência de aminoácidos, significa que as sequências são idênticas ou diferem por uma ou mais alterações de aminoácidos (delecção, adições, substituições) que não provocam dissemelhanças funcionais adversas entre a proteína alterada e a CTAP-III humana nativa.

"Ponto isoeléctrico diferencial" ou " pI diferencial", como é aqui usado, considera uma diferença de nível inicial mínimo de, aproximadamente, 1,5 unidades de pH entre os polipéptidos CTAP-III e o péptido heterólogo em questão. Esta diferença permite a separação da molécula de CTAP-III do polipéptido heterólogo, usando cromatografia de troca iónica, em condições de pH adequadas. Se a proteína heteróloga em questão

tem pI semelhante ao da CTAP-III (Leu_{21}) (que tem um pI de aproximadamente 7,8) podem ser usadas técnicas de mutagénese localmente dirigidas, para introduzir sítios de clivagem específicos no polipéptido CTAP-III. A molécula CTAP-III alterada irá, após a clivagem, alterar o pI e a densidade de carga dos fragmentos do péptido CTAP-III resultantes, para permitir a separação eficaz dos fragmentos CTAP-III da proteína heteróloga em questão, usando cromatografia de troca iónica.

B. Péptido activador do tecido conjuntivo III humano

A CTAP-III, com a substituição da leucina no aminoácido da posição 21, tem sido construída usando um total de 38 oligonucleótidos sintéticos como descrito em WO85/01067, supra. Como foi mostrado na Fig. 1 , o gene é dividido em três fragmentos: fragmento I = EcoRI a BamHI; fragmento II= BamHI a XbaI; e fragmento III= XbaI a EcoRI. Os asteriscos na Fig. 1 indicam o limite dos 38 oligonucleótidos. Os oligonucleótidos foram sintetizados pelo método fosfotriéster (Ohtsuka et al (1982) Nuc Acids Res 1: 6553-6560), purificados, caracterizados, e ligados para produzir o gene completo, utilizando a metodologia convencional.

Como foi descrito na secção de definição, o gene que codifica CTAP-III, que é usado para construir o gene híbrido da invenção, pode incluir modificações da CTAP-III humana, nativa. Uma tal modificação envolve a substituição da metionina na posição 21 da sequência de aminoácidos CTAP-III (aqui e posteriormente referidas como CTAP-III(Leu_{21})). A metionina pode ser substituída por um aminoácido que não afecte, adversamente, a

estabilidade da molécula. São preferidos os aminoácidos que possuem propriedades hidrofóbicas e cadeias laterais aciclicas semelhantes, como a leucina, isoleucina, e valina. A leucina é um substituto particularmente preferido. A substituição da metionina interna confere insensibilidade, à proteína modificada, para agentes como brometo de cianogénio, que fazem a clivagem das cadeias polipetídicas, especificamente nos resíduos da metionina.

Outras modificações podem ser feitas no CTAP-III para alcançar o efeito oposto, que consiste em introduzir metioninas internas nas posições designadas para afectar o ponto isoeléctrico (pI) e a distribuição de cargas de certos fragmentos de CTAP-III que são formados após a clivagem por brometo de cianogénio. Para as proteínas com um pI semelhante ao da CTAP-III (Leu_{21}), entre cerca de 6,5 e 8,5 (CTAP-III (Leu_{21}) tem um pI de aproximadamente 7,8), então é usada CTAP-III (Met_{21}) na construção da fusão. A seguir à clivagem por brometo de cianogénio, são produzidos dois fragmentos derivados do CTAP, tendo pIs de cerca de 4,2 e 9,3 . Neste caso pode ser usada cromatografia de troca iónica para completar a purificação da proteína em questão através de manipulação adequada do pH da solução tampão e da diluição do gradiente salino. A CTAP-III é produzida a níveis elevados em E. coli, sob o controlo de uma região reguladora da colicina modificada e tem uma semi-vida tão longa que não pode ser medida com precisão; isto é, a proteína parece ser infinitamente estável nas células. Por essa razão foi escolhida para ser usada como componente de fusão, para testar se iria conferir esta estabilidade a outras proteínas. Na prática desta invenção, as proteínas de fusão assim construídas podem

utilizar CTAP-III quer na terminação amina quer carboxilo do péptido heterólogo. Mais vulgarmente, proteínas de fusão produzidas bacterianamente, são construídas de modo a que a proteína heteróloga em questão compreenda a terminação carboxilo. Tais construções permitem a libertação simultânea da proteína de fusão e da metionina do terminal amina, após a clivagem no sítio de clivagem. A clivagem de uma proteína ou polipétido é aqui definida como a hidrólise de uma ligação peptídica numa proteína ou polipéptido.

Em contraste com as proteínas bacterianas endógenas, usadas como auxiliares de fusão, o CTAP-III possui propriedades farmacêuticas desejáveis . Os CTAPs estão a ser investigados como fármacos para a regeneração do tecido conjuntivo (e.g., cicatrização de feridas). (Ver Castor et al (1985) Biochemistry 24:1762-1767.) Assim, na prática da invenção, a expressão da proteína de fusão-CTAP permite a recuperação de duas proteínas desejáveis, em produções comercialmente viáveis.

C - Vectores de fusão CTAP-III

O vector plasmídeo bacteriano, empregue para a expressão do gene híbrido da invenção, é uma modificação do vector pNP6 descrito em Waleh e Johnson [(1985) Proc Natl Acad Sci USA 82:8389-8393 e WO 85/01067, supra, os quais foram aqui especificamente incorporados para referência]. Este plasmídeo é um derivado pBR322, em que um subfragmento do operão colicina E1 foi clonado no sítio PstI do pBR322. O subfragmento da colicina E1 consiste numa sequência controlo da expressão da colicina E1, compreendendo um promotor, um sítio operador para a ligação

repressora, um sitio de ligação ribossómica, um codão de iniciação da tradução, parte do gene estructural da colicina E1, e uma terminação transcricional. A sequência controlo da expressão contém uma região reguladora da iniciação transcricional, induzivel, em que o promotor pode ser regulado por um repressor sensivel à temperatura, lexA, um inactivador-repressor induzivel à temperatura, recA, ou por indução quimica.

Modificações subsequentes neste plasmideo têm removido várias extensões do gene estrutural da colicina E1, desde 54 nucleótidos de um total de 1566 (dando origem à fusão colicina-504), a 1554 nucleótidos (dando origem a um péptido colicina E1 com 4 aminoácidos). Outras modificacões incluem (1) alterações na região promotora; (2) a introdução de sitios de restrição únicos; (3) remoção da sequência CAP (proteina repressora catabólica).

As alterações na sequência do promotor foram feitas para construir um promotor que se assemelhasse mais rigorosamente a uma sequência promotora de consenso (Hawley e McClure (1983) Nuc Acids Res 11:2237-2255). Estas alterações na região -10 da região reguladora do pNP6 reforçaram o promotor colicina E1. Sitios de restrição únicos XhoI e HpaI foram introduzidos entre o operador lexA e o sitio da ligação ribossómica (S-D), para permitir que a região reguladora e a sequência de código para o dominio amina terminal do gene inserido, sejam manipuladas mais facilmente. Vários sitios de restrição únicos (StuI, por exemplo), têm sido introduzidos acima do promotor, permitindo, assim, que a cassette de expressão (as regiões de controlo genético e o gene sintético em questão) seja prontamente transferida. Por fim, a região de ligação CAP no pNP6 foi

removida, permitindo, assim, a indução das células que contêm este plasmideo de expressão, num meio de cultura contendo glucose. A sequência de nucleótidos e as caracteristicas estruturais principais deste sistema de expressão modificado para CTAP-III (pNP6-CRM/CTAP) são mostradas na Fig.1. As sequências de nucleótidos originais , na região promotora, são indicadas por parêntesis.

D- EXPRESSAO DA PROTEINA HETEROLOGA

Quando a expressão directa (e.g., expressão de uma sequência de DNA que codifica uma proteina livre de proteinas endógenas ou fragmentos de proteinas) resulta na produção de uma proteina estável em bactérias, a proteina contém, tipicamente, uma metionina no terminal amina, que pode ou não ser removida eficazmente por enzimas hospedeiros. Em segundo lugar, verificou-se que um número de proteinas estranhas não podem ser expressas em qualquer produção significativa em bactérias. Verificou-se ser útil o método de fusão na protecção de proteinas que, de outro modo, seriam consideradas proteinas estranhas ou produtos peptídicos de degradação intracelular. A presente invenção fornece um vector de expressão que produz uma proteina excepcionalmente estável para uso nas fusões, com qualquer número de proteinas heterólogas. Este vector também oferece o beneficio adicional de o CTAP-III, uma proteina de mamiferos, de interesse e de utilidade, poder ser expresso e recuperado em associação com a proteina em questão. São discutidas a seguir concretizações especificas de um número de proteinas heterólogas para serem usadas na presente invenção.

A hirudina é uma pequena proteina isolada a partir das glândulas salivares da sanguessuga medicinal, Hirudo medicinalis. E o mais potente e mais especifico inibidor conhecido da trombina, a protease sérica, que actua na regulação da hemostasia e que catalisa a fase final da coagulação sanguinea--conversão do fibrinogénio em fibrina coagulável. A hirudina mostrou ser um anticoagulante eficaz e agente antitrombótico em animais e seres humanos, e pode ser unicamente adequada ao tratamento clínico de tromboses arteriais e venosas -- particularmente como auxiliar na terapia fibrinolítica, coagulação intravascular disseminada, deficiência anti-trombina-III, e talvez algumas formas de cancro com metástases.

As estruturas primárias das três variantes da hirudina, designadas por HV-1, HV-2, e HV-3, foram determinadas e o alinhamento da sequência de aminoácidos é descrita a seguir, juntamente com a sequência consensual. A linha superior é HV-1, a linha do meio é HV-2, a terceira linha é HV-3, e a última linha é a sequência consensual.

```
        10        20        30        40        50        60
vvYTDCTESGQNLCLCEGSNVCGqGNKCILGSdGekNQCVTGEGTPkPqSHNdGDFEEIPEE_YLQ
  ||||||||||||||||||||| |||||||| | |||||||||| | ||| |||||||||  |||
ITYTDCTESGQNLCLCEGSNVCGKGNKCILGSnGKgNQCVTGEGTPnPeSHNnGDFEEIPEE_YLQ
|||||||||||||||||||||||||||||||| || |||||||||| | ||| ||||||||  |||
ITYTDCTESGQNLCLCEGSNVCGKGNKCILGSqGKdNQCVTGEGTPkPqSHNqGDFEpIPEdaYde

itYTDCTESGQNLCLCEGSNVCGkGNKCILGS-Gk-NQCVTGEGTPkPqSHN-GDFEeIPEe_Ylq
```

As letras minúsculas indicam posições de variabilidade. Para a sequência consensual, as minúsculas indicam uma posição comum para duas das três variantes. Posições marcadas por um hifen (-) e sublinhadas (_) indicam variabilidade completa e

supressão, respectivamente.

Vários laboratórios construiram genes sintéticos para HV-1 e expressaram hirudina biologicamente activa. Fortkamp et al [(1986) DNA 5:511-517; em "Hemostasis and Animal Venoms" (Pirkle e Markland, eds.) pp. 295-306, Marcel Dekker, Basel, 1988] fizeram a fusão de um gene sintético de hirudina com um gene repressor C1 cortado do lambda bacteriófago para criar uma proteína híbrida com uma metionina adicional no ponto de fusão. Apesar de a proteína de fusão ser inactiva como inibidor da trombina, a clivagem por brometo de cianogénio na metionina isolada liberta hirudina activa. De igual modo, Bergmann et al [(1986) Bio Chem Hoppe Seyler 367:731-740)] produziram HV-1 como uma fusão com beta-galactosidase. Dodt et al [(1986) FEBS Lett 202:273-277] aumentaram, subsequentemente, as produções de expressão usando uma fusão com a sequência de sinal da fosfatase alcalina que permite que a hirudina seja excretada para o periplasma de E. coli e seja recuperada na sua forma nativa com elevada actividade biológica. Braun et al [(1988) Biochem 27:6517-6522] usaram um sistema secretor diferente, contendo o péptido de sinal da principal proteína da membrana exterior da E. coli, OmpA, para secretar HV-1 correctamente processada e activa.

Harvey et al [(1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:1081-1088] construiram um património de cDNA a partir de tecidos de sanguessuga e demonstraram múltiplas cópias. Análises de hibridação Northern sugeriram a existência de três espécies de RNAm distintas que codificam a hirudina, e análises de hibridação Southern sugeriram a existência de vários genes. Um cDNA que codifica a variante HV-2 da hirudina foi expresso

intracelularmente em E. coli, sob o controlo do promotor do lamba do bacteriófago, mas com fraca produção (EP 158.564, publicado a 16 de Outubro de 1985). A HV-2 foi subsequentemente expressa em leveduras com uma produção significativamente aumentada , usando um sistema secretor que permite o processamento correcto da proteina madura (Loison et al (1988) Biotechnol 6:72-77; French 2.611.723, publicado a 9 de Setembro de 1988).

Enquanto que estes sistemas são aceitáveis para a produção de hirudina à escala laboratorial, como se evidencia a partir dos resultados fornecidos pela Tabela 1, nenhum deles é aceitável para a fermentação de alta densidade e produção de hirudina.

TABELA 1

EXPRESSAO MICROBIANA DE HIRUDINAS RECOMBINANTES

Organismo	vector/ promotor	1 Modo	Variante	Produção (mg/l)	Act.Esp.[2] U/mg
E. coli	ptg927 lam-PL	I	HV-2	<0.01	---
E. coli	pHIR21 tac	P	HV-1	4	560IU
E. coli	pMF1, pRudi2 lacUV5/tac	I	HV-1	4.8	8,500
E. coli.	pHIR20 lam-PL	I	HV-1	0.16	500IU
Leveduras	pTG1833 PGK	S	HV-2	1.6	13,000AT
E. coli	pNP6ΔRI-CRM/ HIR4	I	HV-1	10-15	11,300AT
E. coli	pIN-III-ompA2 lpp/lac	P	HV-1	13	----

1
I, intracelular; S, secreção extracelular; P, secreção periplásmica.

2
AT-U, unidades antitrombina; IU, unidades internacionais.

3
Produção após purificação . Braun et al (1988) Biochem 27:6517

4
Descrito no exemplo 4.

A hirudina usada nos exemplos seguintes é produzida a partir de um DNA sintético que codifica a variante HV-1. Contudo, como é aqui usado, "hirudina" pretende referir-se a qualquer uma das três variantes e suas variações óbvias. A construção do gene que codifica a hirudina é fornecida nos exemplos, e a sequência de DNA é fornecida na Fig. 2.

Outras proteínas com interesse para usar na presente invenção incluem proteínas de ligação à heparina, como o factor 4 das plaquetas e uma variante da proteína do factor 4 das plaquetas descoberta recentemente (colectivamente referido como "PF4"). O PF4 é uma proteína secretada pelas plaquetas com várias funções biológicas, incluindo actividades de pró-coagulação, antiheparina, imunorregulação , e quimiotácticas.

O PF4 foi isolado a partir do sangue de bovinos, ratos e humanos e purificado para homogenização (Wu et al (1977) Prep Biochem 7:479; Doi et al (1987) Mol Cellular Biol 7:898; e Levine e Wohl (1986) J Biol Chem 251:324, respectivamente) e a sua sequência de aminoácidos e propriedades fisico-químicas foram determinadas (ver Walz et al (1977) Throm Res 11:893). Uma sequência de cDNA é divulgada por Poncz et al (1987) Blood 69:219, que codifica uma sequência principal completa de 30

aminoácidos, precedida por uma metionina e seguida por uma região que codifica uma proteina madura com 70 aminoácidos.

A expressão bacteriana do PF4 é divulgada no Pedido de Patente Europeia No. 89.300128.9, depositado a 6 de Janeiro de 1989, cuja divulgação é aqui incorporada para referência. Como é aí explicado, um gene sintético para PF4 consiste em 243 pares de base de DNA que são reunidos a partir de dois subfragmentos principais (designados por I e II), constituídos por oito e quatro oligonucleótidos, respectivamente. Os 12 oligonucleótidos foram sintetizados num Applied Biosystems DNA Synthetiser, usando a química da fosforamidite.

Os 12 oligonucleótidos sintéticos foram purificados, caracterizados, e ligados para produzir fragmentos I e II como ilustrado na Fig 3. Os oligonucleótidos usados para construir este gene introduzem sítios de restição EcoRI nos limites deste gene, facilitando, assim, a subclonagem deste gene, como um único fragmento EcoRI, num vector de expressão.

Recentemente foi descoberta uma variante do gene do PF4, designado por "PF4var1". O termo "PF4" aqui usado pretende referir-se a qualquer uma destas duas proteínas. A clonagem e expressão do gene que codifica esta nova proteína é descrito em Green et al (1989) Mol Cell Biol 9(4):1445-1451 e no Pedido de Patente Norte Americana co-pendente, com o No. de Série 07/302,425, depositado em 26 de Janeiro de 1989, ambos aqui incorporados especificamente para referência. A sequência de cDNA para PF4var1 indica que ,no que respeita à proteína madura, os resíduos de aminoácidos que diferem do PF4 estão todos localizados na porção carboxi da molécula, especificamente nas

posições 58 (Pro--->Leu), 66 (Lys--->Glu), e 67 (Leu---> His). A natureza destas alterações pode ter um efeito significativo na estrutura e função do PF4var1. Em adição a estas alterações na proteína madura, PF4var1 inclui uma inserção de três argininas e várias outras variações de aminoácidos na sequência principal.

Como foi explicado em cima para o PF4, pode ser construído um gene sintético que codifica a PF4var1, usando oligonucleótidos semelhantes aos usados para o PF4, mas contendo as alterações de bases apropriadas para posições 58, 66, e 67 dos aminoácidos. A Fig 4 ilustra uma sequência de DNA sintético para a expressão do PF4var1. Os 12 oligonucleótidos usados para criar a sequência total de código, unidas por duas sequências de ligação EcoRI, são indicadas pelas setas em cima da sequência de DNA.

Também foi expresso , como uma proteína de fusão-CTAP, um péptido laminin antimetastásico, usando o vector da presente invenção. Este péptido partilha uma correspondência substancial com a região que abrange os resíduos dos aminoácidos 897 a 936 na proteína laminin B_1 humana (Pikkaraimen et al (1987) J Biol Chem 262:10454-10462). A sequência do péptido é:

Pro_1-Cys Pro Asp Gly Pro Asp Ser Gly Arg Gln Phe
Ala Arg Ser Cys Tyr Gln Asp Pro Val Thr Leu Gln Leu Ala
X Val Cys Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp Asp-Y,

onde Pro_1 é, quer Pro quer des-NH_2Pro, X é quer Cys quer seleccionado a partir do grupo constituído pelos aminoácidos alifáticos neutros, e Y é quer -OH quer -NH_2. Como são aqui usados, aminoácidos alifáticos neutros são definidos como alanina, valina, leucina, isoleucina, serina e treonina, especialmente a serina.

Um gene sintético que codifica este péptido de 40

aminoácidos, designado aqui por $LamB_1$-40, está ilustrado no Exemplo 7. As especificações da sua construção são fornecidas com algum detalhe nos seguintes exemplos.

E. Cultura de Células Hospedeiras

Estirpes hospedeiras, usadas em clonagem e expressão procariótica, encontram-se muito disponíveis e incluem estirpes de E. coli como MC1060, DH1, RR1, C600hf1, HB101, JA221, MM294, e JM101.

O mecanismo de regulação do vector de expressão do pNP6 e seus derivados baseia-se na inducibilidade do operão colicina E1 da E. coli por agentes químicos ou físicos, que danificam o DNA. Como é sabido pelos especialistas deste campo, outros sistemas de vectores, para além do sistema colicina E1, são controlados do mesmo modo. a mitomicina C mostrou ser o agente de indução química mais eficaz. Contudo, o uso de mitomicina C para a produção de proteínas tendo aplicações farmacêuticas, requer a remoção completa ou inactivação desta droga química durante o processo de produção e purificação, que é um processo trabalhoso e dispendioso.

A luz ultravioleta (UV) é igualmente eficaz na indução do operão da colicina E1. Contudo, um sistema de indução UV não pode ser facilmente adaptado a culturas em grande escala e a nível industrial. Por esse motivo, são necessários mecanismos alternativos aplicáveis à indução da expressão de genes heterólogos , para a produção industrial das suas proteínas recombinantes codificadas. Um sistema desejável deve ser simples, barato e o seu uso não deve requerer métodos especiais no

processo de purificação.

Uma vez que o promotor da colicina E1 é regulado por controlo negativo (por exemplo, uma proteína repressora, codificada pelo gene lexA, ligado ao operador), pode ser utilizada a iniciação da transcrição através da alteração da temperatura. Alternativamente, ou em adição , a indução pode ser realizada por activação induzida pela temperatura da proteína recA que resulta na inactivação do repressor lexA. Deste modo, para desenvolver um modo de indução barato, simples , é empregue uma estirpe hospedeira sensível à temperatura. Tais estirpes incluem DM511, DM936 e DM1187 (Mount et al, (1975) J Bacteriol 121:1203-1207). Estas estirpes possuem uma mutação quer nos genes recA quer nos lexA que são não reprimidos para funções SOS e fazem a expressão do gene híbrido desejado no vector pNP6, a altos níveis, quando a temperatura se altera de 30°C para cerca de 42°C. Como será apreciado pelos especialista neste campo, os plasmídeos que transportam as mutações ts podem ser também utilizados para os objectivos da presente invenção.

O presente modo de indução para a expressão do gene híbrido desejado, a níveis elevados, pode também ser aumentada pela adição de bases de ácidos nucleicos ou nucleósidos, preferivelmente bases púricas (por exemplo, adenina ou adenosina; contudo a base livre, timina, também funciona bem) ao meio de cultura, ao mesmo tempo da indução para amplificar os efeitos das mutações sensíveis à temperatura do recA e lexA e resulta na expressão ainda maior das funções reguladas por SOS. O melhoramento possui uma expressão pelo menos 10% superior para além da observada para induções sensíveis à temperatura.

F. Purificação

Os microorganismos transformados crescem num meio de cultura tipicamente adequado, a uma densidade óptica (OD) de, pelo menos, cerca de 10 a 650 nm, e, preferivelmente, entre cerca de 20 e 40 ou superior a 650 nm. A composição do meio de cultura irá depender do microorganismo particular envolvido e irá conter, tipicamente, fontes assimiláveis de carbono e azoto, fontes de energia como a glucose, e magnésio, iões sódio e potássio e, opcionalmente, aminoácidos e bases púricas e pirimidínicas .

Depois das células terem sido recolhidas da cultura, podem ser concentradas, se necessário, a cerca de 0,1 a 1,0 g/ml, preferencialmente de 0,2 a 0,5 g/ml por filtração, centrifugação, ou outros métodos convencionais.

A seguir à concentração, a lise celular é completada pela destruição das membranas celulares. Podem ser usadas nesta fase do processo técnicas de destruição celular convencionais como homogenização, sonicação, ou compressão ciclica. Os métodos preferidos são a sonicação ou a homogenização com um Destruidor Celular Stansted. O ponto final da fase de destruição pode ser monitorizado por densidade óptica , com a densidade óptica da suspensão a decrescer tipicamente a cerca de 65% a 85%. Em qualquer caso, a destruição deve quebrar substancialmente todas as células, de forma a que substancialmente não haja células intactas que subsistam na primeira fase de purificação. Antes da destruição, a força iónica e o pH da fase liquida do concentrado são ajustados, se necessário, para um nivel que facilite a remoção das proteinas da E. coli nas etapas subsequentes, enquanto retêm a proteina de fusão como um complexo insolúvel nos

restos celulares. O pH pode ser ajustado por adição de tampões adequados. Na maioria dos casos, os pHs usados estarão entre cerca de 7,5 a cerca de 9,0.

A solubilização de proteína de fusão é realizada num meio caotrópico usando um desnaturante forte como o sal de guanidina ou ureia, apesar de poderem ser utilizados detergentes como Triton, SDS e sais do ião tiocianato. Tipicamente, uma variação de concentração de 1 a 7 M para os sais de guanidina é manipulável, sendo preferida a 4-6 M, enquanto os detergentes são usados na ordem de 1-2% de solução. O pH da solução deve ser também compatível com as características da proteína de fusão.

Uma vez que a proteína de fusão está solubilizada, deve ser depois clivada selectivamente, de acordo com a natureza do sítio de clivagem selectiva. Um dos métodos para fazer a clivagem selectiva utiliza o brometo de cianogénio. Esta técnica requer a ausência de uma metionina disponível diferente da do sítio de clivagem, ou a capacidade para distinguir selectivamente entre uma metionina a ser clivada e uma metionina do interior da sequência do polipéptido. Alternativamente pode ser utilizada uma protease que reconheça e faça a clivagem no sítio identificado por um tipo particular de aminoácido. Proteases comuns incluem tripsina, quimotripsina, pepsina, bromelaína, papaína ou semelhantes. A tripsina é específica para aminoácidos básicos e faz a clivagem no lado carboxílico da ligação peptídica quer para a lisina quer para a arginina. Existem também enzimas que fazem a clivagem nas sequências específicas dos aminoácidos. A enteroquinase bovina faz a clivagem no lado carboxílico da lisina ou arginina que é precedida pelos resíduos ácidos do ácido

aspártico, ácido glutâmico, ou carboximetil cisteína . Outras enzimas que reconhecem e fazem a clivagem de sequências específicas incluem: colagenase, factor X, e o enzima processador da trombina e de poliubiquitina.

Se a proteína solubilizada vai ser purificada por troca iónica, o agente solubilizante pode ser removido por diálise ou um processo equivalente como diafiltração ou cromatografia líquida de fase reversa (LC).

As fases no processo de recuperação subsequente à fase de clivagem, são principalmente destinadas a separar o polipéptido heterólogo em questão do CTAP-III e das proteínas clivadas endógenas de E. coli, para fornecer a proteína heteróloga com um elevado nível de pureza (preferivelmente a pelo menos cerca de 85% e, mais preferivelmente, a cerca de 95%) em produção de alta densidade de, pelo menos, cerca de 50 mg/l e, mais preferivelmente, cerca de 50 a 500 mg/l.

A seguir à etapa de clivagem, os componentes do polipéptido da proteína de fusão podem ser facilmente isolados numa forma substancialmente pura usando cromatografia de troca iónica. Pode ser usada cromatografia de troca, quer catiónica quer aniónica, dependendo das propriedades de carga diferencial dos dois componentes do polipéptido, ou se o CTAP-III pode ser recuperado no seu todo ou em fragmentos.

Os produtos de reacção de clivagem são sujeitos a cromatografia de troca iónica para purificar a proteína heteróloga em questão. Utiliza-se cromatografia de troca aniónica, quando a proteína heteróloga é ácida. Neste caso é preferível uma resina de troca aniónica forte possuindo os grupos

catiónicos ligados a um suporte sólido. Os suportes polissacarídeos são geralmente preferidos e incluem resinas de troca iónica usadas comummente, como por exemplo, contas de dextran, agarose ou celulose.

Os especialistas neste campo reconhecerão que a resina de troca aniónica forte se refere a resinas com grupos catiónicos que mantêm a sua carga positiva ao longo de uma variação de pH relativamente alargada. Os grupos catiónicos ligados ao suporte podem ser seleccionados a partir de grupos de amónio quaternário, como $-CH_2CH_2N^+(CH_2CH_3)_2CH_2CH(OH)CH_3$. Exemplos de resinas de troca aniónica adequadas, comercialmente disponíveis para serem utilizadas na prática desta invenção incluem QAE-Sephadex A-25, DE-52, QE-52 celulose, Cellex QAE, Safarose-Q e Mono Q de fluxo rápido.

A resina de troca aniónica é geralmente utilizada na forma de uma coluna compacta. Esta coluna é geralmente calibrada usando técnicas convencionais e a solução dos produtos da reacção de clivagem é introduzida na coluna. O CTAP-III (Leu_{21}) que possui um pI alcalino (aproximadamente 7,8) não se liga eficazmente a valores de pH abaixo de aproximadamente 6,8, e a proteína em questão tendo um pI ácido, não se liga à coluna. A proteína em questão é eluída aumentando-se a força iónica da solução tampão, tipicamente de 0 a 0,75 M NaCl. A coluna pode ser regenerada através da lavagem com solução de NaOH e detergentes não iónicos, para remover qualquer proteína residual contaminante ou agentes solubilizantes, e a coluna pode ser calibrada.

Por exemplo, quando quer a hirudina quer o péptido laminin B1 são fundidos com CTAP-III (Leu_{21}), pode ser utilizada

uma coluna de troca aniónica (por exemplo, quer Sefarose-Q ou Mono-Q da Pharmacia), para separar as duas proteínas com base nas diferenças dos seus pontos isoeléctricos (hirudina=3,8, péptido laminin B_1=3,65, CTAP-III=7,8). Num tampão de pH 5,5 a hirudina liga-se à coluna de troca aniónica enquanto o CTAP-III não o faz. A eluição da hirudina pode ser realizada com um gradiente linear (0 a 0,5 M) de NaCl. Fracções "pool" de hirudina tipicamente superiores a 90% pura, podem ser sujeitas, facultativamente, a posterior purificação usando cromatografia de interacção hidrofóbica (HIC), cromatografia de filtração gel, cromatografia líquida de fase reversa (RP-LC) ou suas combinações.

A fase de troca iónica pode também utilizar uma coluna de troca catiónica através da qual os grupos aniónicos sa~o ligados ao suporte sólido. Nesta concretização podem ser usadas as resinas adequadas, comercialmente disponíveis , incluindo por exemplo, celulose carboximetil (CM) e Sefadex sulfopropil. Neste ambiente, o CTAP-III (Leu_{21}) é ligado à coluna e a proteína em questão, neste exemplo, possuindo um pI mais ácido do que o CTAP-III, subirá na coluna e pode ser recuperada a partir dela. As condições de eluição, para a recuperação do CTAP-III, são semelhantes às descritas para a troca aniónica.

Do mesmo modo, para a purificação de uma proteína desejada, por exemplo o PF4, que tem um valor de pI semelhante ao do CTAP-III (aproximadamente 7,8), a sequência natural, CTAP-III (Met_{21}) é usada na construção da fusão. A seguir à clivagem por brometo de cianogénio, o CTAP-III (Met_{21}) é clivado em dois péptidos com valores de pI de, aproximadamente, 4,2 e 9, 3 que podem ser prontamente separados da proteína PF4 por cromatografia

de troca iónica, tal como descrita acima.

As amostras de proteínas podem ser reduzidas por incubação com um agente redutor tal como ditiotreitol (DTT), mercaptoetanol, glutationa, ou cisteína , para evitar a formação de pontes dissulfito intermoleculares ou intramoleculares, durante o processo de recuperação, e antes de usar qualquer uma das fases de cromatografia subsequentes.

A cromatografia de interacção hidrofóbica utiliza suportes hidrofóbicos, tais como fenil-sefarose, fenil-TSK HPLC ou fenil superose. Este processo separa as proteínas baseando-se nas propriedades hidrofóbicas da proteína, ao contrário da cromatografia de troca iónica que separa as proteínas baseando-se na propriedade de carga da proteína. A selecção dos tampões apropriados e as condições de eluição são conhecidas dos especialistas neste campo.

A cromatografia de filtração em gel pode ser realizada em duas etapas que remove ambos os componentes pirogénicos e os contaminantes da proteína, possuindo pesos moleculares superiores ou inferiores ao da proteína heteróloga desejada, (Por exemplo, a hirudina tem um peso molecular de cerca de 7.000 (pH baixo) e desloca-se a 28.000 (pH neutro) Kilodaltons. Os geis que são capazes de fraccionar a solução para permitir a separação da hirudina daqueles contaminantes estão comercialmente disponíveis.

A coluna deverá ter o tamanho que permita a resolução adequada dos componentes desejados. Uma vez que, no processo da invenção, a proteína tem um nível de pureza alto (virtualmente, sempre tão alto como 85% ou mais) após a fase de troca iónica, a desvantagem usual--e.g., a capacidade diminuída da filtração gel

quando comparada com a troca iónica, não é característica neste caso.

Enquanto que a filtração gel é um método preferido,a RP-LC tal como RP-HPLC é uma alternativa viável. A RP-LC é capaz de remover moléculas da solução que têm pesos moleculares aproximados aos da proteína heteróloga recuperada e não podem ser, por isso, removidas completamente por filtração gel. Em adição, são também eficazmente removidos pela RP-LC os contaminantes como a endotoxina bacteriana. Contudo, uma vez que são usados na fase de eluição ácidos orgânicos como ácido acético ou ácido trifluoracético, e um solvente orgânico como propanol ou acetonitrilino , podem ser encontrados vestigios desses sistemas de eluição ligados à proteína purificada.

Assim que a proteína é recuperada da fase de cromatografia a mesma é enrolada o que, no caso da hirudina, acontece rapidamente a alta concentração, mas para outras proteínas pode requerer tratamento com um composto sulfridílico, sob condições de oxidação e concentração mais baixa da proteína. As condições de enrolamento podem incluir o uso de um tampão "redox" contendo ambas as formas, reduzida e oxidada, dos compostos sulfidrílicos por exemplo, beta-mercaptoetanol, glutationa, cisteamina ou cisteína, como descrito na Patente Norte Americana No. 4.511.502.

Todas as preparações finais da proteína podem ser, por rotina, caracterizadas por HPLC analítica, espectroscopia U.V., composição de aminoácidos, análise de sequência de aminoácidos N-terminal e espectrometria de massa. A produção final do material purificado é de, pelo menos, 40 mg/l e, preferivelmente, 50 a 100

mg/l de cultura.

G. TESTES PARA PROTEINAS HETEROLOGAS

Existe uma variedade de testes de actividade, desenvolvidos para determinar a qualidade da preparação de hirudina e para utilizar na quantificação da hirudina em várias experiências bioquímicas e farmacológicas. Dois desses métodos foram aqui aperfeiçoados e podem ser rotineira e reproduzivelmente usados . O primeiro, um teste de substrato cromogénico, mede a inibição pela hirudina da capacidade da trombina para hidrolizar pequenos substratos peptídicos sintéticos. O segundo, um teste de coagulação da fibrina, mede a cinética da formação de coágulos, usando quer plasma humano quer o fibrogénio purificado como substrato da trombina.

No teste cromogénico, a actividade da antitrombina é obtida, medindo a inibição da libertação de p-nitroanilina do substracto cromogénico H-D-fenilalanil-L-pipecolil-L-arginina-p-nitroanileto dihidrocloreto (S-2238, fornecida por Kabivitrum), pela trombina na presença da hirudina. A concentração de trombina é de 2 nM (tipicamente 0,12 unidades de NIH/ml, e a hirudina pode ser testada reproduzivelmente a uma concentração aproximada na ordem dos 0,3 a 1 nM, usando substracto 296 μM, em tampão Tris 50 mM, 100mM NaCl, pH 7,8, e polietileno glicol-6000 0,1% (PEG). PEG é incluido para inibir a ligação da trombina à superficie plástica da microplaca ou cuvette; pela mesma razão, os vasos de reacção são pré-tratados com PEG-20.000 a 1%, antes do teste.

A hirudina inibe a conversão, mediada pela trombina, do

fibrinogénio num coágulo de fibrina. Esta actividade anti-- coagulatória pode ser testada pela monitorização da formaçao de coágulos quando o fibrinogénio humano purificado (10mg/ml) é misturado com trombina (0,06 NIH unidades/ml) e variando as concentrações de hirudina em Tris 50 mM , NaCl 100 mM, PEG 0,225% , pH 7,4. A concentação de hirudina, a 50% de inibição, é depois calculada a partir da curva de titulação. Um dos testes para medir a actividade imunoestimulatória do PF4 pode ser realizado injectando ratinhos intravenosamente, com um agente imunossupressor como a concanavalina A (Con A) juntamente com eritrócitos de carneiro (SRBC), e medindo a redução da produção de anticorpos contra SRBC usando um teste de formação de rosetas. A supressão parece ser induzida pela proliferação de células T do fenótipo supressor provocado pela Con A . O PF4 restaura a resposta imune através da inibição ou inversão da activação das células T supressoras.

Um dos testes usados para medir a actividade do péptido laminin B_1 mede a ligação das células tumorais que possuem o receptor laminin ao péptido imobilizado na superfície da cultura de tecidos (Graf et al (1987) Cell 48:989-996). Este teste é um metodo conveniente e sensível para as medições de rotina da ligação do receptor celular laminin e, por isso, um bom indicador da actividade antagonista do laminin.

Os exemplos seguintes ilustram ainda as concretizações várias da invenção. Estes exemplos não pretendem limitar de qualquer modo, a invenção. Nestes exemplos todos os valores da temperatura, a menos que seja indicado o contrário, estão expressos em graus celsius.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Preparação de vectores de Expressão Derivados do pNP6

A construção de um vector pNp6, um derivado do pBR322, compreendendo a sequência controlo da expressão da colicina E1, é descrita em WO 85/01067, supra, bem como em Waleh e Johnson (1985), supra, e uma estirpe E. coli MM294 transformada com este vector foi depositada na American Type Culture Collection sob o número ATCC 39418. Derivados deste vector como pNP6ΔRI/Col(4)/CTAP(Leu21), aqui referidos como pNP6/CTAP-III-N MOD, úteis na prática da presente invenção são também descritos em W085/01067 ou são aqui fornecidos.

A- O plasmideo pNP6ΔRI foi criado para remover o sítio EcoRI localizado perto do gene resistente à tetraciclina no interior da sequência pBR322 original, criando assim um sítio único EcoRI no interior do gene colicina. O vector pNP6 foi digerido com EcoRI em condições de reacção limitadas de forma a produzir moléculas lineares (clivadas em apenas um dos dois sítios). Purificam-se as moléculas lineares de pNP6 por electroforese gel de agarose, e subsquentemente reagiram com DNA polimerase I e todos os quatro desoxiribonucleótidos trifosfatos, de modo a preencher as extremidades das cadeias simples. As moléculas resultantes foram circularizadas numa reacção de ligação das extremidades cegas, usando ligases T4 , e depois usadas para transformar E. coli 294.

Para a transformação em E. coli 294, uma cultura



crescida em "L-broth" durante a noite, foi diluida 1:100 em meio "L-broth" fresco, e incubada com agitação a 37°C, até que a DO_{600} atingisse 0,6. Neste ponto, centrifugou-se 35 ml de cultura, a 6.000 rpm, durante 10 minutos a 4°C, e resssuspendeu-se o pellet em 20ml de $CaCl_2$ 0,05 M. As células foram incubadas em gelo durante 15 minutos antes de serem recolhidas por centrifugação a 4.000 rpm durante 10 minutos. Ressuspenderam-se as células em 4 ml de $CaCl_2$ 0,05 M, e misturaram-se com 200 µl de uma solução de DNA preparada por adição de 50 µl da mistura de emparelhamento, e 150 µl Tris-HCL 10 mM (pH 7,5) contendo $MgCl_2$ 10 mM, e $CaCl_2$ 10 mM. Incubou-se a mistura a 0°C durante 25 minutos, seguida de uma incubação a 50°C durante 10 segundos e à temperatura ambiente durante 10 minutos. Nesta altura, adicionou-se 14 ml de "L-broth", e a cultura foi agitada a 37°C durante 30 minutos. Depois, adicionou-se à cultura 480 µl da solução de tetraciclina 1,25 mg/ml, e a incubação continuou durante mais 30 minutos. Foram plaqueadas aliquotas de 100 µl, em placas de agar preparadas de fresco contendo 25 ml de "L-broth", 1,5% de agar e 25 µg/ml de tetraciclina . Testaram-se depois os transformantes resistentes à tetraciclina (Tc^r), para determinar a sua a sensibilidade à ampicilina (Ap^s), por plaqueamento em agar contendo 25 µg/ml de ampicilina.

As colónias transformantes Tcr Aps foram depois pesquizadas para a produção espontânea da colicina. Assinalaram-se as colónias simples nas placas de L-agar e incubaram-se a 37°C durante a noite. As colónias foram mortas por exposição ao vapor de clorofórmio, depois cobertas com 5 ml de "L-broth" contendo agar a 0,7 % e 0,1 ml de uma cultura crescida durante a

noite de E. coli K-12. Depois de o agar ter solidificado, as placas foram incubadas durante a noite a 37°C. Marcaram-se as colónias com uma zona de inibição em seu redor, como produtoras de colicina.

Os transformantes produtores de colicina foram seleccionados e o DNA do plasmideo foi isolado a partir de clones individuais e digerido com EcoRI, para identificar aqueles que contêm um único sitio EcoRI intacto no interior do gene da colicina. A localização do único sitio EcoRI foi confirmada por mapeamento adicional da endonuclease de restrição.

B. O plasmideo pNP6ΔRI/Col(4)/CTAP(Leu_{21}) foi construido pela digestão do pNP6ΔRI com SstII (SacII) e enzimas de restrição EcoRI. O fragmento maior, contendo as sequências de replicação e de regulação do gene da colicina, foi separado dos fragmentos menores que contêm o gene da colicina, por electroforese gel e ligado a um DNA sintético (contendo a sequência de código do CTAP-III (Leu_{21})), com um terminal coesivo SstII no terminal de código amino-terminal, e um terminal coesivo EcoRI no terminal de código carboxi-terminal, como se mostra a seguir:

```
--ATG GAA ACC GC   G ATG-------TAA TGA CTGCAG     AATTC--
  Met Glu Thr Ala    Met CTAP-III(Leu21)
--TAC CTT TGG    CGC TAC-------ATT ACT GACGTCTTAA     G--
```

Usou-se o DNA do plasmideo recombinante, resultante, para transformar células E. coli 294; testaram-se para a expressão da proteina CTAP-III, colónias seleccionadas para a resistência à tetraciclina; isolou-se o DNA a partir de clones

que demonstravam expressão positiva e verificou-se a estrutura correcta da construção, pela análise da sequência do DNA. Detalhes dos métodos são descritos nos exemplos subsequentes.

C. Um vector de fusão da colicina, pNP6ΔRI/Col(150), pode ser preparado para o projeco de um gene hibrido de tamanho médio, contendo os 150 aminoácidos de colicina que precede o gene em questão. A construção do pNP6ΔRI/Col(150)/PF4 é descrita com pormenor no Pedido de Patente Europeia No. 89300128.9, supra, e aqui incorporado para referência. Sumariamente, a construção deste plasmídeo foi iniciada pela clonagem da sequência genética sintética que codifica o PF4 (ilustrado na Fig.3) no único sítio EcoRI do pNP6ΔRI. Este plasmídeo recombinante codifica uma proteína colicina de 504 aminoácidos, fundida através de um resíduo de metionina com a proteína PF4 de 70 aminoácidos.

Um derivado melhorado do pNP6ΔRI/Col(504)/PF4 foi construído por redução subsequente do tamanho do segmento de colicina. Assim, um gene hibrido de tamanho médio foi construído por supressão de, aproximadamente, 1.000 pbs do DNA do pNP6ΔRI/Col(504)/PF4, em condições de digestão parcial do EcoRV. Existem três sítios de restrição EcoRV no pNP6ΔRI; dois no interior do gene estrutural colicina E1 e o outro no interior do gene tetraciclina. Uma vez que os transformantes são seleccionados para Tc^r, apenas resultarão os transformantes desejados tendo o fragmento EcoRV suprimido do gene colicina . O plasmídeo resultante , pNP6ΔRI/Col(150)/PF4, codifica apenas 150 aminoácidos da colicina que precede a sequência de código de iniciação do PF4 (no sítio EcoRI), e contém 1 único resíduo de

metionina ligando o segmento colicina e o PF4. A fusão deste segmento menor de colicina com a proteina do PF4 demonstrou aumentar a recuperação e a purificação do PF4.

O tamanho do péptido de fusão da colicina pode ainda ser reduzido a um segmento com 57 aminoácidos por supressão da região entre o SstII e o sitio de restrição único do EcoRV no plasmideo pNP6ΔRI/Col(150)/PF4. O DNA do pNP6ΔRI/Col(150)/PF4 purificado, foi clivado em moléculas lineares com enzimas de restrição SstII e depois tratado com polimerases DNA T4 e dCTP, condições nas quais a actividade da exonuclease 3′ e 5′ da polimerase, converte as terminações geradas pelo SstII do DNA do plasmideo em extremidades cegas. O DNA produzido nesta reacção foi clivado com enzimas de restrição EcoRV e o fragmento maior de DNA resultante foi purificado, convertido em DNA circular, numa reacção de ligação de DNA e depois usado para transformar células. O plasmideo resultante, designado por pNP6ΔRI/Col(57)/PF4 , codifica os 57 aminoácidos da colicina que precede a sequência de codigo do PF4, e contém um único resíduo de metionina ligando o segmento da colicina ao PF4.

Estes vectores de fusão da colicina modificados foram subsequentemente usados em experiências para expressar a hirudina e um péptido laminin B_1 como aqui descritos.

Exemplo 2

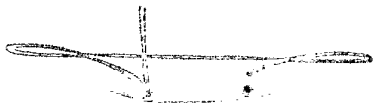
Construção do pBR-CRM/CTAP(Leu_{21})

A. Construção de uma Região (Promotora) Reguladora da Colicina Modificada (CRM)

Desenhou-se e construiu-se uma região reguladora modificada do promotor da colicina E1. As alterações de nucleótidos introduzidas são sumarizadas na Fig 1. O oligómero sintético de 151 bases foi sintetizado num Applied Biosystems 308A DNA synthesizer em oito fragmentos, quatro segmentos complementares de outros quatro , desenhados de tal modo que partilham sequências complementares de 7 a 10 pares de bases nas suas extremidades sobrepostas.

Purificaram-se os fragmentos sintetizados por electroforese gel. As terminações 5' dos polinucleótidos foram fosforiladas usando-se quinase polinucleotídica T4 e marcadas com [gama-^{32}P]-ATP. As cadeias complementares foram emparelhadas e ligadas.

O DNA com 151 pares de bases foi purificado em gel e ligado à EcoRI-HindIII clivada, purificou-se os fragmentos grandes do plasmídeo bacteriano pBR322, substituindo assim a sequência promotora Tet excisada. Designou-se a construção resultante por pBRG8. Uma vez que o promotor sintético substituiu a sequência promotora Tet excisada, os transformantes resistentes à ampicilina foram pesquisados para determinar a resistência à tetraciclina após o tratamento com Mitomicina C (indução do promotor da colicina). O DNA plasmídeo das colónias seleccionadas, foi purificado e analisado por meio da digestão de enzimas de restrição, bem como por hibridação de manchas para detectar a presença das sequências de DNA sintéticas. A sequência promotora sintética foi verificada pela sequenciação do DNA de cadeias duplas seguinte:



```
                                                        *
5'-AATTCAGGCC TGACGTCGAC AGTCTTGACA GGGAAAATGC
    3'-GTCCGG ACTGCAGCTG TCAGAACTGT CCCTTTTACG

                                                      *
AGCGGCGTAT AATGTGTGCT GTATATAAAA CCAGTGGTTA TATGTACAGT
TCGCCGCATA TTACACACGA CATATATTTT GGTCACCAAT ATACATGTCA
    *
                                    *
ATTTATTTGT TAACTCGAGT GTTTTAAAAG TCAAAGAGGA TTTTATAATG
TAAATAAACA ATTGAGCTCA CAAAATTTTC AGTTTCTCCT AAAATATTAC
*                                             *

GAAACCGCGG A-5'
CTTTGGCGCC TTCGA-3'
```

B. Removeu-se a região reguladora da colicina, modificada(CRM) do plasmídeo pBRG8 por digestão enzimática de restrição e clonou-se no plasmídeo pNP6ΔRI/Col(4)/CTAP (Leu_{21}), substituindo a região reguladora antiga da colicina E1. Designou-se a nova construção por pNP6ΔRI-CRM/CTAP (Leu_{21}).

C. O plasmídeo pNP6ΔRI-CRM/CTAP (Leu_{21}) foi digerido com enzimas de restrição AatII e ScaI e o fragmento contendo as regiões reguladoras da colicina do gene CTAP-III foi purificado. O plasmídeo pBR322 foi digerido com enzimas de restrição AatII e NruI e o fragmento maior contendo o gene da resistência à ampicilina e a origem da replicação foi purificado. Ligaram-se os dois fragmentos (ScaI e NruI produzem extremidades cegas e, assim, podem ser ligados juntamente) para a produção do novo vector de expressão do plasmídeo designado por pBR-CRM/CTAP (Leu_{21}).

Exemplo 3

Construção do Gene da Hirudina

O gene sintético para a hirudina (Fig.2) consiste em 228 pares de bases do DNA que são reunidos a partir de dois subfragmentos principais (designados por I e II), compostos por dois conjuntos de seis oligonucleótidos separados no sitio BamHI. Os 12 oligonucleótidos foram sintetizados num Applied Biosystems DNA Synthesizer usando a química da fosforamidite.

Purificaram-se, caracterizaram-se e ligaram-se os 12 oligonucleótidos sintéticos, para produzirem os fragmentos I e II, conforme descrito a seguir e ilustrado na Fig.2.

Purificação e Caracterização dos Oligonucleotidos

1. Purificação

Foram preparados geis de poliacrilamida (12%) com ureia 7 M, Tris-borato 90 mM, e tampão EDTA 2 mM. Poços de amostras foram formados com um pente com dentes com, pelo menos, 2 cm de largura. Após 3 horas, o gel foi submetido a uma pré-electroforese durante 30 minutos. Misturaram-se volumes iguais de 1 a 5 A_{260} unidades das amostras dos oligonucleótidos não purificados e 7 M de ureia com tampão Tris-HCl, pH 7,5. Adicionou-se a amostra de DNA ao gel, e adicionou-se a cada um dos poços uma mistura corada (0,17% de azul de bromofenol, 0,27% xileno cianol ,Tris-HCl 10 mM, pH 7,5), para monitorizar a taxa de migração dos oligonucleótidos. A electroforese foi realizada a 400 a 600 volts até o azul de bromofenol ter migrado 30 cm a partir do topo do gel. Removeram-se ambas as placas, envolveu-se o gel numa capa de plástico, e o DNA foi visualizado usando luz UV de onda curta. Retirou-se cuidadosamente a banda desejada usando uma lâmina. Colocou-se o pedaço de gel num tubo Eppendorf

e esmagou-se com uma vareta de vidro. Depois adicionou-se 0,5 ml de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) ao tubo que ficou a rodar durante a noite para a extracção do DNA. Centrifugou-se o tubo a 15.000 rpm durante 10 min., e recuperou-se o sobrenadante. A amostra de DNA foi diluída 10 vezes com TE, ligada a uma coluna Sep-Pak C-18 e lavada com 20 ml de água para a dessalinização. A recuperação do DNA por eluição de acetonitrilo é, geralmente, entre 50 e 80%. Liofilizou-se o eluido e depois ressuspendeu-se em 0,5 ml de água.

2. Marcação das Terminações, Electroforese Gel e Autoradiografia

Liofilizaram-se 10 pmoles da amostra. Dissolveu-se a amostra seca em 1 µl de tampão quinase 10x concentrado (Tris-HCl 700 mM, pH 7,6, $MgCl_2$ 100 mM, KCl 1 mM, ditiotreitol 50 mM), 5 µl de H_2O, 66 pmoles de ATP frio, 0,6 pmoles de (ATP-[^{32}P-gama], 1 µl de spermidina (1mM), 1 µl da solução quinase T4 contendo, pelo menos, 70 unidades de terminações coesivas (NEB) de actividade. A amostra foi incubada durante 30 min a 37°C. Após a adição de 5 µl da mistura corada, a amostra foi adicionada a um gel de poliacilamida (20%, 0,4 mm de espessura, 15 cm de comprimento), e electroforizada até o azul de bromofenol migrar até ao cimo do gel, e autoradiografada por exposição do gel ao filme de raios X durante 10 a 30 minutos.

3. Emparelhamento e Ligação dos oligonucleótidos

A Fig 2 mostra os 12 oligonucleótidos usados na construção do gene sintético. Os oligonucleótidos de 1 a 6 e de 7

a 12 compõem os fragmentos I e II respectivamente. Estes dois fragmentos foram unidos in vitro e subclonados em vectores M13 como é descrito a seguir.

Os dois conjuntos de 6 oligonucleótidos purificados foram emparelhados, ligados e subclonados em vectores M13 designados por M13-HIR (I) e M13-HIR(II). Para cada um dos fragmentos (I ou II), foram misturados os pares complementares da extremidade 5' dos diferentes oligonucleótidos fosforilados, aquecidos a 95°C durante 2 min, e depois emparelhados por arrefecimento gradual até 40°C. Os três oligonucleótidos de cadeia dupla (com extremidades sobrepostas), de cada fragmento, foram misturados e incubados juntos a 37°C, durante 1h, antes da ligação .

Misturas de reacção para a ligação consistem em Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), $MgCl_2$ 10 mM, ditiotreitol 20 mM, ATP 1 mM, 100 pmoles de DNA (concentração de extremidades 5'), 100 unidades de extremidades coesivas (NEB) de ligases T4 num volume total de 100 µl. Incubaram-se as misturas de reacção durante a noite a 16°C.

4. Sistemas de Transformação

Cultivou-se E. coli num meio 2x YT até a OD_{660} se situar entre 0,6 e 0,7 . Recolheram-se as células por centrifugação, ressuspenderam-se em $CaCl_2$ 50 mM (metade do volume da cultura), e conservaram-se em gelo durante 20 minutos. As células competentes recolheram-se e ressuspenderam-se em 1/10 de volumes de $CaCl_2$ 50 mM.

O DNA das formas replicadas (RF) M13 comercialmente

disponível, que tinha sido previamente digerido com endonucleases EcoRI e BamHI, foi ligado aos fragmentos I e II da hirudina, e misturado com as células JM101 competentes, e conservado em gelo durante 40 minutos. A mistura foi submetida ao calor a 42°C durante 2 minutos e misturada com IPTG , Bluo-gal, agar fluido (46°C), e com as células JM101 crescidas de fresco. Plaqueou-se a mistura em placas de agar YT e incubou-se durante a noite a 37°C.

As células JM101 transformadas por M13 intacto sintetizaram beta-galactosidase e produziram placas azuis. As células transformadas por M13 contendo um fragmento de hirudina não sintetizaram beta-galactosidase e produziram placas brancas.

5. Preparação do DNA das Formas Replicadas M13 (RF) ou do DNA do Plasmídeo

Um litro de células, contendo o fragmento da hirudina, cresceu durante a noite na presença de 25 µg/ml de tetraciclina e adicionou-se 100 µg/ml de cloranfenicol (para amplificação dos plasmídeos) a uma densidade celular apropriada e deixou-se a crescer durante a noite. As células foram colhidas por centrifugação durante 20 min a 5000 x g a 4°C, e depois suspendidas em 200 ml de TEN (10, 1, 150) e recentrifugadas. Ressuspenderam-se as células em 5 ml de glucose 50 mM, EDTA 10 mM e Tris 25 mM (pH 8,0), e transferiram-se para dois tubos de centrifuga de 30 ml com tampa com rosca.

Adicionaram-se ao tampão anterior 5 ml de 4mg/ml de lisozima (2,5 ml a cada tubo), e misturaram-se e agitaram-se suavemente os tubos por inversão e incubaram-se durante 10 min à temperatura ambiente ou 30 min no gelo. A seguir, adicionaram-se

20 ml (10 ml a cada tubo) de NaOH 0,2 N e 1% de SDS. A solução foi misturada suavemente por inversão (20 a 30 vezes), ou por meio de um vortex suave, e depois incubada durante 10 min à temperatura ambiente. Cerca de 15 ml (7,5 ml para cada tubo) de acetato de potássio 3M e ácido fórmico 4,4% (pH 4,8) foram depois adicionados e misturados suavemente, para permitir que o DNA cromossómico viscoso e a proteina formassem um coágulo. A solução foi incubada durante 1 h no gelo e depois centrifugada durante 20 min a 10.000 x g. Adicionou-se um volume de isopropanol à solução sobrenadante, que foi depois centrifugada durante 10 min a 10.000 x g. O sobrenadante foi decantado e os pellets foram lavados com 10 ml de etanol 70% a -20°C. Os pellets foram centrifugados durante 5 min a 10.000 x g, o etanol foi removido e os pellets secaram ao ar in vacuo. Subsequentemente, os pellets foram dissolvidos em 1,0 ml de TE e tratados com 20 µg/ml de RNase A livre de DNAse, durante 30 min a 37°C.

A mistura de reacção foi depois extraída com cloroformio: álcool isoamílico (24:1) e aplicada (com glicerol 5% e corante 0,02%) a uma coluna de agarose M BioGel A-50 com 2,5 x 25 cm. As fracções "pool" de DNA foram precipitadas com etanol, extraídas com fenol, re-extraídas com éter, re-precipitadas com etanol, lavadas, secas e ressuspendidas em 1,0 ml de TE.

6. Purificação e Caracterização dos Fragmentos

Os fagos recombinantes foram pesquizados do seguinte modo para determinar a presença dos fragmentos I e II do gene da hirudina. A cultura dos fagos cresceu num meio YT contendo células hospedeiras JM101. O DNA das formas replicadas (RF) de

cadeia dupla do M13-HIR(I) ou do M13-HIR(II) foi isolado como descrito acima. O DNA padrão de cadeia simples foi isolado a partir do sobrenadante lisado por precipitação em NaCl 2,5 M, PEG 20% (6.000), durante 30 min em gelo extraído com fenol, e depois precipitado com etanol e acetato de sódio. A sequência de ambos os fragmentos foi confirmada pela sequenciação dideoxi M13. Os fragmentos foram removidos do DNA RF por digestão com endonucleases de restrição com EcoRI e BamHI, e purificados por electroforese de agarose em SeaPlaque ®(Marine Colloids) num tampão Tris-acetato 50 mM, pH 8,2. O fragmento do gene da hirudina, visualizado através da luz ultravioleta de onda longa, após ter sido corado com brometo de etídio, foi excisado do gel com uma lâmina.

7. Ligação dos Fragmentos I e II dos Genes da Hirudina

Porções do gel contendo os fragmentos do gene da hirudina foram fundidos a 70°C, durante 5-15 min, e depois equilibrados a 37°C. Após a adição de um volume igual de tampão, mantido no gelo, concentrado 2x contendo as ligases T4, a mistura de ligação foi incubada durante a noite a 20°C. A ligação foi terminada quelatando o $MgCl_2$ com EDTA, em concentrações molares iguais, e inactivando as ligases a 70°C durante 15 min. A mistura de reacção foi digerida com EcoRI para produzir o monómero do gene da hirudina.

8. Transformação do Gene da Hirudina Intacto

A reacção de restrição EcoRI foi terminada como referido acima e ligada ao vector de clonagem M13 desfosforilado,

previamente digerido com endonucleases EcoRI. A mistura de ligação na agarose de SeaPlaque® foi refundida e diluida por um factor de 10 a 50 em TCM conservado no gelo (Tris 10 mM, pH 7,5, $CaCl_2$ 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM), antes da transformação nas células JM101

9. Pesquisa e Sequenciação de Clones

Os fagos foram rapidamente pesquisados para detectar a presença da sequência da hirudina como se segue. O DNA RF foi reduzido com EcoRI endonucleases, e o DNA de cadeias simples do fago, dos clones que produziam o padrão de restrição EcoRI de diagnóstico correcto, foi isolado como foi descrito acima e usado como o padrão para a sequenciação do M13 dideoxi. Esta construção M13 possui dois sitios EcoRI e foi designada por M13-HIR.

Exemplo 4

Construção de Vectores de Expressão da Hirudina

A. Vector pPN6ΔRI/Col(4)/HIR

Desenhou-se um linker-HL sintético para criar um sitio SstII e suprimir o sitio EcoRI que precede a sequência que codifica a hirudina no M13-HIR. Os dois oligonucleótidos de cadeia simples do linker foram sintetizados, purificados e emparelhados para a formação:

```
5' -CGACCGCGGTAATGGTTGT-3'
      TGGCGCCATTACCAACATA
```

Ambos, o vector M13-HIR e o linker-HL emparelhado,

foram digeridos com endonucleases AccI e depois ligados. As células JM101 foram transformadas com o DNA ligado, os transformantes foram pesquisados por análise de restriçao SstII, e o DNA de cadeia simples do fago foi isolado e sequenciado.

Separou-se o fragmento HIR-HL do vector RF usando digestões SstII e EcoRI, e purificou-se por electroforese gel de agarose SeaPlaque®. Após a digestão SstII e EcoRI do vector plasmideo pNP6ΔRI/Col(4)/CTAP(Leu_{21}) e a electroforese gel para remover o gene CTAP, ligou-se o fragmento HIR-HL ao DNA do plasmideo digerido com SstII e EcoRI. A mistura de ligação foi usada para transformar células competentes de E.coli 294 RecA + e foi colocada em gelo durante 40 min. A mistura foi submetida ao calor durante 2 min a 42 C e misturada com "L-broth", incubada a 37°C durante 1 h, antes do plaqueamento em placas de agar LB contendo 25 ml de "L-broth", 1,5% de agar, 25 μg/ml de tetraciclina. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C.

Foram pesquisados transformantes Tc^r com KpnI endonuclease (única para o gene hirudina) e a sequência do DNA plasmideo foi confirmada por técnicas de sequenciação dideoxi de cadeia dupla. O plasmideo expressa um pequeno polipéptido de fusão contendo quatro resíduos da proteina colicina (Col4), ligada à proteina da hirudina através de um resíduo de metionina. A clivagem química da proteína de fusão da hirudina/col(4), pelo brometo de cianogénio, liberta a proteina da hirudina livre.

B. Vector pNP6ΔRI/col(504)/HIR

Ligou-se o gene da hirudina sintético do M13-HIR ao

fragmento maior do gene da colicina (resíduos 1-504), para investigar o potencial para a expressão aumentada e a estabilidade da hirudina. Um linker ColHL sintético

5' -CGACGAATTCTGTTAACCATGGTTGT-3'
(TGCTTAAGACAATTGGTACCAACATA)

foi desenhado para facilitar a clonagem e ajustar a estrutura de leitura do gene da hirudina no novo vector. Os dois oligonucleótidos do linker de cadeia simples foram sintetizados, purificados , emparelhados e ligados a um fragmento digerido pelo AccI, do M13-HIR RF contendo o gene da hirudina. O DNA ligado foi transformado em células JM101 e os transformantes foram pesquisados por digestão HpaI e EcoRI, e o DNA de cadeia simples dos fagos foi sequenciado.

O fragmento HIR-ColHL foi separado do M13RF por digestão EcoRI, purificado por electroforese gel de agarose SeaPlaque®, e depois clonado no sítio EcoRI simples do vector de expressão do plasmídeo pNP6ΔRI. Os transformantes Tcr foram pesquisados com endonucleases HpaI para a presença de enxerto, e com PstI para a orientação do enxerto. A sequência do DNA do plasmídeo foi confirmada através de técnicas dideoxi de cadeia dupla. Este vector de expressão produz uma grande proteína de fusão da hirudina incluindo os resíduos 1-504 do gene da colicina.

C. Vector pNP6ΔRI-CRM/HIR

Um ligante sintético

5'-CGCTCGAGTGTTTTAAAAGTCAAAGAGGATTTTATAATGGTTGT-3'
(3'-GAGCTCACAAAATTTTCAGTTTCTCCTAAAATATTACCAACATA-5')

foi desenhado para criar um sítio XhoI e eliminar o sítio 5' EcoRI do M13-HIR. Os dois oligonucleótidos de cadeia simples do linker foram sintetizados, purificados, emparelhados e ligados a um fragmento AccI contendo hirudina do M13-HIR-RF. O DNA RF do M13 de ligação HIR das células JM101 transformadas, foi pesquizado com XhoI e o DNA de cadeia simples do fago foi sequenciado.

O fragmento de ligação HIR foi removido do RF usando-se digestão XhoI e EcoRI, e separado por electroforese em gel de agarose SeaPlaque®. O fragmento foi depois clonado no vector pNP6ΔRI-CRM/CTAP(Leu_{21}) (descrito no exemplo 2B), que tinha sido previamente digerido com XhoI e EcoRI para remover o gene CTAP.

Transformantes Tc^r foram pesquisadas com endonuclease KpnI -- um sítio único que reside no interior do gene da hirudina. A sequência do DNA do plasmídeo foi confirmada através de técnicas dideoxi de cadeias duplas. Esta construção foi designada por pNP6ΔRI-CRM/HIR, e contém a região reguladora da colicina melhorada (CRM).

D. Construção de Vectores Derivados para as Fusões Colicina-Hirudina

A construção das fusões dos genes colicina-hirudina é semelhante à metodologia explicada no exemplo 1C, para os vectores derivados compreendendo as sequências dos genes híbridos colicina-PF4. O vector pNP6ΔRI/Col(150)/HIR foi construído removendo do fragmento EcoRV de, aproximadamente, 1.000 pb, a partir do vector pNP6ΔRI/Col(504)/HIR, e o vector pNP6ΔRI/Col(57)/HIR foi construído removendo do fragmento SstII-

EcoRV de, aproximadamente, 279 pb, a partir do pNP6ΔRI/Col(150)/HIR.

E. Construção do pBR-CRM/CTAP(Leu 21)/HIR

O gene da hirudina foi inserido no vector de expressão para o péptido laminin B_1 (descrito no exemplo 7C) como ilustra a Fig 6. Um linker R foi desenhado para facilitar a inserção do gene da hirudina na estrutura de leitura correcta com o gene CTAP. Os dois oligonucleótidos de cadeia simples do linker foram sintetizados, purificados, emparelhados e ligados a uma hirudina contendo o fragmento da digestão AccI do M13-HIR RF. O DNA ligado foi usado para transformar as células JM101. Os transformantes de M13-HIR-R foram pesquisados por sequenciação dideoxi M13 de cadeia simples.

Separou-se o fragmento HIR-R do RF por digestão EcoRI e electroforese em gel de agarose SeaPlaque®. Inseriu-se o fragmento HIR-R no único sitio EcoRI do pBR-CRM/CTAP(Leu_{21})/$LamB_1$-40, entre o gene CTAP e o gene $LamB_1$-40. A seguir à transformação das células, foram depois pesquisados transformantes resistentes à tetraciclina (Tc^r) com KpnI endonuclease, para detectar a presença do gene da hirudina , e HpaI para a correcta orientação do enxerto. A sequência correcta do DNA do plasmideo foi confirmada por técnicas de sequenciação com dideoxi de cadeia dupla, e o DNA para a proteina de fusão é mostrado na Fig 5.

O vector de expressão do plasmideo resultante para a hirudina designado por pBR-CRM/CTAP(Leu_{21})/HIR, produz uma proteina de fusão excepcionalmente estável entre CTAP(Leu_{21}) e a

hirudina, ligada por um segmento de 5 aminoácidos (Arg-Ile-Leu-Val-Asn) e uma Met simples precedendo a sequência da proteina da hirudina.

Exemplo 5

Estabilidade no Estudo dos Impulsos e na Marcação de Encaixes

Tipicamente, 100 ml de culturas E.coli RecA+ contendo genes sintéticos da colecção de plasmideos derivados da colicina pNP6, codificando quer genes livres quer genes de fusão, cresceram num meio M9CA : (Na_2HPO_4 42 mM, KH_2PO_4 22 mM, NaCl 8,6 mM, NH_4Cl 1,8 mM, $MgSO_4$ 2 mM, 0,5% glucose, $CaCl_2$ 0,1 mM, Tiamina-HCl 1 mM, 0,2% ácido casamino), a 37°C até a OD_{660} =0,36-0,4. Tipicamente uma aliquota de 0,5 ml da cultura foi marcada (t=0) com 50 uCi de cisteina-[^{35}S], durante 15 min a 37°C. A seguir a este intervalo de 15', os 100 ml da cultura foram induzidos com 1µg/ml de Mitomicina C e, simultaneamente, 0,5 ml de células marcadas -[^{35}S] foram centrifugadas, ressuspendidas numa amostra tampão de gel proteico (SDS 1%, M beta-mercaptoetanol 0,14M, glicerol 20%, Tris 40mM, pH 6,8, azul de bromofenol (BPB) 0,05%, aquecido a 95°C durante 5 min., e conservado em gelo como o controlo de pré indução. Depois da cultura ter sido induzida durante 105 min., uma aliquota de 5 ml foi removida e marcada com 0,5 mci de cisteina -[^{35}S] durante 15 min. a 37°C com agitação. Centrifugaram-se as células, lavou-se o pellet celular e depois ressuspendeu-se em 5 ml de meio M9CA e incubaram-se a 37°C uma série de amostras de 5 ml de cultura foram colhidas a vários intervalos e fornecidas como descrito

acima. As amostras seriadas no tempo foram imediatamente analizadas por electroforese gel poliacrilamida/SDS 15%. O gel foi fixado em ácido acético 10% durante 10 min., enxaguado, lavado em água durante 15 min., tratado com salicilato de Sódio 1M durante 60 min., seco no vácuo à temperatura de 60°C, durante 2 horas, e autoradiografado expondo o gel ao filme de raio X durante 6 a 8 horas.

Como se mostra na Fig.8, a hirudina expressa no plasmideo pNP6ΔRI/HIR (ou pNP6-CRM/HIR), i.e., não como uma proteina de fusão, tem uma semi vida de aproximadamente 10 min. enquanto o CTAP-III, expresso em condições semelhantes, é completamente estável pelo menos durante 10 horas.

Experiências de "pulse-chase" adicionais foram realizadas usando cada uma das construções do vector de fusão colicina-hirudina e demonstraram, por exemplo, que as proteinas de fusão colicina-hirudina, e.g., Col(57)/HIR e Col(150)/HIR exibiam uma semi-vida semelhante (ou menor que) à observada para a expressão directa da hirudina. Em contraste, a Fig.9 mostra os resultados num gel poliacrilamida (corado com prata) que demonstra a estabilidade da proteina de fusão CTAP-III/hirudina, 11 horas após a indução da expressão em E.Coli transformada com o vector pBR-CRM/CTAP(Leu_{21})/HIR.

Exemplo 6

Purificação da Hirudina Recombinante (HV-1)

A Fig.10 fornece um diagrama de fluxo que ilustra o processo de purificação descrito a seguir para a hirudina

recombinante.

A. Fermentação

Um ml da cultura congelada da estirpe 294 de E.Coli (pBR-CRM/CTAP(Leu_{21})/HIR), armazenada a -80°C em 15% de glicerol, foi descongelada e usada para inocular 500 ml de "L-broth" (10 g de triptona, 5 g de extracto de levedura, 10 g de NaCl por litro) contendo tetraciclina na concentração final de 20 µg/ml. O pH do meio foi ajustado a 7,0 com NaOH 1N. A cultura foi depois incubada, durante a noite, num incubador com agitação a 37°C. No dia seguinte, esta cultura foi usada para inocular quer 2 litros de "L-broth", preparado num frasco de 6 litros, quer 10 litros de meio de fermentação num recipiente de 16 litros. O tamanho do inóculo é cerca de 2% do volume total do meio.

As células E. coli contendo o plasmídeo de expressão para a hirudina (pBR-CRM/CTAP(Leu_{21})/HIR cresceram em meio mínimo quer a 37°C quer a 30°C (esta última temperatura para as estirpes que transportam uma mutação sensível á temperatura (ts) lexA ou RecA), até uma densidade celular correspondendo a uma densidade óptica, a 650 nm, de 4 (escala laboratorial) ou 30 (escala de fermentação de alta densidade). [Meio mínimo compreende (expresso em quantidades ou volumes por litro) 7,1 g $(NH_4)_2SO_4$, 1,7 g K_2HPO_4, 1,5 g de citrato de sódio, 5 g de ácido casamino suplementado com 100 ml de glucose a 20%, 8,3 ml de $MgSO_4$ 1 M, 1,7 ml $CaCl_2$ 1 M, 1,8 ml de $FeCl_3$ 0,1 M, 0,2 ml de elementos vestigiais, 10 ml de vitaminas]. As células foram depois induzidas por adição de mitomicina C a uma concentração final de 1 µg/ml, ou por aumento da temperatura a 42°C (durante 20 min.)

seguida de ajustamento a 37°C, e permitiu-se o crescimento de células durante um período adicional de 4 horas. Mantiveram-se os níveis de Oxigénio entre 40 e 60% do nível de saturação, o pH do meio de cultura a pH 7-7,5 por adição de hidróxido de amónia, e a concentração de glucose a aproximadamente 2%, por adição de uma solução nutritiva de glucose concentrada. Esta última compreende (por litro) 400 g de glucose, 0,4 g de $FeCl_3.6H_2O$, 2,6 g $MgSO_4.7H_2O$, 20 g de citrato de sódio, 20 ml de elementos vestigiais e 20 ml de vitaminas. Agitou-se a cultura por um motor giratório a 400-600 rpm. Adicionou-se um anti-espuma o necessário para evitar a formação significativa de espuma. Após o período de 4 horas de incubação, as células foram recolhidas e lavadas uma vez com tampão TEN (Tris-HCl 25mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM). AS células foram recolhidas outra vez, por centrifugaçào a 4.000 rpm, durante 20 min., e os pellets foram armazenados a -20°C.

B. Expressão e Análise do gene

A indução da expressão de gene de hirudina foi conseguida por adição de Mitomicina C a uma concentração final de 1 mg/litro, ou por uma alteração na temperatura de 30°C para 42°C durante 15-30 min., seguida por um decréscimo para 37°C para as estirpes ts. Após um tempo de indução total de aproximadamente 4 horas [a densidade óptica final, a 650 nm, éde, aproximadamente, 10-12 (cultura à escala laboratorial) ou 40-50 (cultura de alta densidade)], a cultura foi arrefecida e as células foram recolhidas por centrifugação ou filtração.

A expressão da síntese de proteínas de cada uma das

proteínas recombinantes com interesse, após a indução, foi seguida de electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). As amostras foram geralmente retiradas da cultura antes e 4 horas após a adição de Mitomicina C (horas 0 e 4, respectivamente). O volume das amostras foi ajustado para a densidade óptica da cultura, de modo a que igual número de células foram retiradas num dado tempo de amostragem. Recolheram-se as células por centrifugação a 6.000 rpm durante 5 min., e congelaram-se e descongelaram-se os pellets pelo menos uma vez antes da ressuspenção em 250 µl do tampão amostra. O tampão amostra consiste em 1% SDS, 20% glicerol, Tris-HCL 40 mM, pH 6,8, 0,05% BPB e 2- mercaptoetanol 0,14 M, para o gel de poliacrilamida padrão, e 2,5% SDS, DTT 10 mM, Tris-HCL 10 mM, pH 8,0, e 0,01% de PBP para o sistema gel Phast (Pharmacia). As amostras analisadas pelo sistema Phast foram ainda diluídas 40X. As amostras foram fervidas durante 5 min. antes de serem carregadas num gel gradiente da Pharmacia a 8-25%, ou num gel de poliacrilamida-SDS a 15% . O gel Phast correu e foi corado com prata de acordo com os processos e programas fornecidos pelo fabricante. O gel poliacrilamida-SDS foi electroforizado a 30 mAmp, durante 6 horas, e corado durante a noite numa mistura corada de azul de Coomassie (0,05% azul Coomassie, 25% isopropanol e 10% ácido acético), e descorada numa solução de 25% isopropanol e 10% de ácido acético . Quando necessário, os geis foram quantificados por análise dos negativos fotográficos do gel, usando um densitómetro laser com um integrador electrónico.

C. Lise celular

As células foram ressuspendidas num tampão consistindo em Tris 50 mM, NaCl 0,2 M, EDTA 5 mM, pH 8,5, (50-100 ml do tampão por litro da cultura original), e lisadas usando um Destruidor Celular Stansted ("Stansted Cell Disrupter") a uma temperatura de 5-10°C, uma pressão operacional de 11-12.000 psi, e uma taxa do fluxo de 150-200 ml por min. O material insolúvel (contendo mais de 85% do total de proteína de fusão CTAP-III/hirudina) foi recolhido por centrifugação ou filtração. A solução sobrenadante foi desprezada.

D. Redução

O material insolúvel contendo a proteína da fusão CTAP-III/hirudina foi solubilizado em hidrocloreto de guanidina (GnHCL) 6 M, Tris base 50 mM, EDTA 1 mM, (50 ml por litro de cultura de células), e ajustado a um pH entre 8,5 e 9,0. Adicionou-se o agente redutor (ditiotreitol ou beta-mercaptoetanol) a uma concentração final de 0,1 M e a solução foi incubada a 37°C durante 1 a 3 horas. A solução foi acidificada para pH 3-4 e dializada contra 20-100 volumes de ácido acético 0,1 N, durante 6 a 12 horas, com duas alterações: qualquer precipitado resultante foi removido por centrifugação ou filtração e desprezado. O sobrenadante foi liofilizado.

E. Clivagem por Brometo de Cianogénio

A mistura da proteína natural foi dissolvida em ácido fórmico 70% (aproximadamente 50 ml por litro de cultura de células), clarificada com gás Argon, e agitada lentamente á

temperatura ambiente durante 20 min., ou até a maior parte do material estar dissolvido. Foi adicionado tiosulfato de sódio (aproximadamente 65 mg por litro de cultura) e agitou-se por um período adicional de 40 min. Finalmente, adicionou-se CNBr a uma concentração final entre 0,1 e 0,4 M, e incubou-se a mistura de reacção durante 6 a 20 horas. Alternativamente, a reacção CNBr pode ser realizada usando H_3PO_4 0,2 N e GnHCl 6 M como solvente da reacção. O progresso da reacção foi seguido por análise HPLC analítica (descrito a seguir) de reacções de escala piloto. A reacção prosseguiu tipicamente até se atingir mais de 90 % do resultado final, altura em que a solução foi diluída 3- a 5-vezes com água desionizada/destilada, dializada e liofilizada.

Como se mostra na Fig. 11, a quantificação de expressão da hirudina por clivagem e separação de hirudina do CTAP-III foi determinada usando HPLC-RP. A produção de hirudina foi calculada a partir da análise da mistura de reacção CNBr, dializada após redução por HPLC analítico, usando padrões de hirudina purificada cujas concentrações foram calibradas por análise da composição de aminoácidos e medições da actividade específica.

A análise HPLC de fase reversa foi tipicamente realizada com 10 µl da solução de hirudina e com 6 µl da hirudina padrão (aproximadamente 10 µg de cada). As amostras foram ajustadas a acetonitrilo 15%, ácido trifluoroacético 0,065% (V/V) (TFA), e injectadas em volumes de 0,1 ml (amostras não tratadas) ou 1,0 ml (amostras reduzidas) em colunas C-4 Vydac. A Eluição foi realizada usando TFA 0,065% com gradientes lineares ascendentes de 15 a 30% de acetonitrilo a uma taxa de 0,5% de acetonitrilo por minuto. A hirudina HV-1 oxidada e reduzida,

elui-se em posições características idênticas às da hirudina purificada HV-1, tendo valores de actividade específica superiores a 10 unidades antitrombina por µg.

As amostras de hirudina foram reduzidas por incubação a 37°C em ditiotreitol 0,1 M, Tris base 0,2 M, pH 9, durante 45 min. antes de acidificação e diluição em acetonitrilo/TFA, e injecção na coluna HPLC. A concentração da hirudina no padrão foi determinada pela análise quantitativa da composição de um hidrolizado ácido num analisador de aminoácidos Beckman 6300, (usando um padrão interno de concentração conhecida). Os cálculos da quantidade de hirudina numa amostra (por exemplo, uma reacção de clivagem CNBr) são feitos por comparação da integração do pico da amostra e do padrão da hirudina para ambas as amostras, reduzidas e não reduzidas. Os picos de integração foram confirmados pelas experiências em duplicado. A partir desta análise, a produção de hirudina após a fase de clivagem CNBr era 50-70 mg por litro da cultura original crescida em condições de baixa densidade (densidade óptica final da cultura, a 650 nm, era de 10-12).

F. Cromatografia de Troca Aniónica (AEC)

A proteína foi dissolvida em água a uma concentração de 5-25 mg/ml e o pH da solução foi ajustado a 5,5 por adição de hidrocloreto de histidina. A coluna de Q Sefarose (Pharmacia) foi calibrada com tampão histidina 50 mM, pH 5,5. Carregou-se a coluna com aproximadamente 5 mg de hirudina por ml de resina. O CTAP-III não se liga á coluna nestas condições e elui-se no fluxo. A coluna foi lavada com tampão até não se detectar

material com absorção de U.V. A coluna foi depois eluída com um gradiente de NaCl, 0 a 0,5 M, em tampão histidina. A hirudina elui-se em NaCl, entre 0,12 e 0,15 M. O perfil de eluição foi caracterizado por um pico único principal, que tinha propriedades cromatográficas e propriedades de inibição da trombina idênticas á hirudina recombinante (HV-1) purificada. Combinaram-se fracções contendo hirudina, dializaram-se contra água e liofilizaram-se. Preparações de hirudina nesta fase tinham uma pureza tipicamente superior a 90%, tal como determinada por HPLC.

G. Enrolamento de Proteínas

A hirudina foi dissolvida em GnHCl 6 M, numa concentração aproximada de 100 mg/ml. Adicionou-se beta-mercaptoetanol a uma concentração final de 0,1 M a 0,15 M, e a solução foi ajustada a um pH de 8,2 com Tris-base 50 mM ou a um pH de 10 com bicarbonato de sódio 50 mM, EDTA 1 mM. Após aproximadamente 1 a 2 horas de incubação à temperatura ambiente, a solução foi diluída 5 a 10 vezes com GnHl 6 M em tampão 50 mM, EDTA 1 mM, e depois dializada durante um período de aproximadamente 6 a 18 horas contra 10 volumes de tampão (100 GnHCl) 50 mM. Durante este período ocorre o enrolamento que recupera a configuração nativa. Alternativamente, uma mistura 2:1 de glutationa oxidada e reduzida pode ser usada na reacção de enrolamento no lugar do mercaptoetanol. Finalmente a solução foi dializada contra a água.

H. Cromatografia Final

Fases de cromatografia opcionais podem ser utilizadas neste ponto para conseguir maior pureza da proteína hirudina. Uma

segunda cromatografia de troca aniónica, ou cromatografia de interacção hidrofóbica (HIC) ou etape de cromatografia de fase inversa, por exemplo, fornecerá uma composição de hirudina com grau de pureza superior a 95%. A HIC foi usada para purificar uma amostra de hirudina recombinante expressa directamente como uma proteína não fundida no vector pNP6ΔRI-CRM/HIR. Neste exemplo, a hirudina foi preparada a partir de células lisadas e purificada parcialmente por titulação do extracto crú com ácido cloridrico a um pH de 3,8 e desprezando o material insolúvel. O pH da solução sobrenadante foi ajustado a um pH neutro com hidróxido de sódio, diluido para dar uma força iónica de, aproximadamente 0,1 ou menos, e carregado numa Coluna de troca iónica Zeta Prep QAE 60. A coluna foi lavada com NaCl 0,1 M em tampão bis-Tris 20 mM pH 6,0, até não haver material absorvente U.V. no material eluido. A hirudina foi eluida da coluna usando tampão contendo NaCl 0,4 M. A hirudina resultante é aproximadamente 50% pura , como foi determinado por RP-HPLC analitica.

A proteina foi depois introduzida numa coluna HIC, numa escala semi-preparativa, contendo Superose fenil (Pharmacia) a uma concentração aproximada de 0,1 mg hirudina/ml, e eluida num gradiente linear de sulfato de amónia de 1,7 a 1,2 M em Tris-bis 20 mM pH 6,0, a uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min. A Fig.12 ilustra a pureza da hirudina recuperada por este processo.

A influência da variação do gradiente salino na separação foi determinada alterando a variação de 4,25 para 17 mM sulfato de amónia/min, em três corridas cromatográficas sucessivas. A resolução da linha de base foi observada em todas as três experiências; a resolução (definida como a razão entre a

distância entre os valore máximos dos picos e comprimento de base médio dos dois picos), foi de 2,25 a um gradiente de 4,25 mM de NaCl/min, 1,68 a 8,5 mM de NaCl/min, e 1,48 a 17 mM de NaCl/min. (Uma resolução de 1,5 ou superior é uma resolução da linha de base). A recuperação determinada para o gradiente de 8,5 mM de sulfato de amónia/min era de 65%, a um carregamento de 0,133 mg de hirudina por ml de resina. Nestas condições a hirudina elui-se em sulfato de amónia 1.49 M; elui-se numa concentração salina ligeiramente mais alta quando se usa o gradiente de base, e ligeiramente mais baixa em condições do gradiente de saturação. A pureza da hirudina eluida, como mostra a fig.13 era superior a 95%, como determinada por RP-HPLC-analitica.

A partir destes resultados, verifica-se que HIC é um processo extremamente útil para a obtenção da hirudina com uma pureza substancial.

Outro processo de purificação utiliza cromatografia de filtração gel após cromatografia de troca aniónica. A hirudina é purificada por cromatografia liquida proteica rápida (FPLC) usando Superose-12 (Pharmacia). O tampão de eluição é tipicamente fosfato de sódio 50 mM, NaCl 0,5 M, EDTA 0,1 mM, pH 7,0, a uma taxa de fluxo de 0,25-1,5 ml/min. A pureza de hirudina resultante é superior a 95%.

Exemplo 7

Construção de Vectores de Expressão Contendo o Gene para o Péptido Laminin B_1-40

A. Desenho e Síntese dos Fragmentos do Gene Laminin

Os seis fragmentos que formam o gene Laminin B_1-40, referidos anteriormente, foram sintetizados e purificados em gel como foi préviamente descrito. Os fragmentos 2, 3, 5 e 6 foram activados e os fragmentos 1 e 4 não, para evitar que as extremidades 3' se ligassem juntamente para formar dimeros. Os seis fragmentos foram ligados nas seguintes condições: 33,3 pmoles dos oligómeros (1 e 4 não activados; 2, 3, 5 e 6 activados) foram adicionados a Tris HCl 30 mM (pH 7,8), $MgCl_2$ 10 mM, e DTT 6 mM, e aquecidos a 90°C. Depois de arrefecidos à temperatura ambiente, foram adicionados ATP 1 mM, e 200 unidades de extremidades coesivas (NEB) de ligase T4 (uma unidade de terminação coesiva = 0,015 unidades Weiss), a um volume de 50 µl e a reacção foi incubada durante a noite a 16°. A reacção foi subsequentemente aquecida durante 15 min a 70°C para inactivar a ligase. A mistura de reacção foi digerida com enzimas de restrição EcorI para separar quaisquer dimeros 5'-5'. A mistura de ligação cortada por EcorI foi corrida num gel de agarose SeaPlaque® a 2%, e o pedaço de 149 pb foi isolado para ligação ao vector. O fragmento EcorI tinha a seguinte sequência de DNA:

```
5'-AATTCGTATG CCGTGCCCGG ATGGTCCGGA CTCCGGCCGT
   3'-GCATAC GGCACGGGCC TACCAGGCCT GAGGCCGGCA

      *
CAGTTCGCTC GTTCTTGCTA CCAGGACCCG GTTACCCTGC
GTCAAGCGAG CAAGAACGAT GGTCCTGGGC CAATGGGACG
                  *

                  *
AGCTGGCTTC TGTTTGCGAT CCAGGCTACA TCGGTTCTCG
TCGACCGAAG ACAAACGCTA GGTCCGATGT AGCCAAGAGC
                           *

TTGCGACGAC TAATGACTGC AGAAGCTTC-3'
AACGCTGCTG ATTACTGACG TCTTCGAAGT TAA-5'
```

B. Construção do pBR-CRM/Col(150)/LamB_1-40

O processo da construção do gene de fusão colicina(150)/Laminin B_1-40 foi realizado em duas fases. Um primeiro vector foi preparado inserindo o fragmento de 149 pb do gene Laminin (preparado como foi descrito acima) no pBR-CRM/CTAP(Leu_{21}) digerido pela EcorI. O fragmento SacII-EcoRI contendo o gene que codifica o CTAP-III(Leu_{21}) foi removido deste vector por digestão dupla e subsequente purificação em gel de agarose do DNA do vector restante contendo o fragmento do gene laminin. O fragmento do gene colicina (150) foi preparado de forma similar por digestão SacII-EcorI do pNP6ΔRI-CRM/Col(150)/PF4. O vector pBR-CRM/LamB_1-40 e o fragmento do gene de colicina 150 foram depois ligados para produzir pBR-CRM/Col(150)/LamB_1-40. Os clones foram pesquisados por análise de restrição do DNA do plasmídeo purificado, preparado como foi descrito no Exemplo 3, e demonstraram vários prováveis candidatos, mas a análise gel da proteína das culturas induzidas desses clones mostraram pouca ou nenhuma indução, de qualquer proteína do tamanho esperado (aproximadamente 21.000 daltons) da proteína de fusão Col(150)/LamB_1-40. A sequenciação parcial desses clones demonstrou a presença da sequência do gene laminin na estrutura de leitura da tradução correcta, com a terminação 5' da sequência do gene colicina.

C. Construção do pBR-CRM/CTAP(Leu_{21})/LamB_1-40

A clonagem da fusão CTAP/LamB_1-40 foi realizada como se segue. Uma porção da terminação - 3' do CTAP-III no vector pBR-

CRM/CTAP(Leu_{21}) foi removida por digestão dupla com XbaI e EcorI e o DNA do fragmento do vector foi purificado por electroforese em gel SeaPLaque®.

A este fragmento isolado adicionou-se um fragmento do linker de XbaI-EcorI com 71 pb, contendo uma nova terminação 3' CTAP-III sem qualquer codão de terminação da tradução.

O linker sintético foi sintetizado, purificado, activado e ligado como foi préviamente descrito e se mostra a seguir.

```
5'-CTAGACCCGG ACGCTCCACG TATCAAGAAG ATCGTTCAGA
    3'-TGGGCC TGCGAGGTGC ATAGTTCTTC TAGCAAGTCT

AAAAACTGGC TGGTGACGAA TCTGCTGACA G-3'
TTTTTGACCG ACCACTGCTT AGACGCTTGT CTTAA-5'
```

Os dois fragmentos foram depois ligados em condições descritas préviamente usando 1,0 pmole do linker e 0,1 pmole do vector em 172 µl do volume da reacção. Transformaram-se 100 µl de células de E. Coli 294 competentes congeladas com 1-10 ng da mistura de ligação para construir um vector de clonagem intermediário. Os clones resultantes foram pesquisados por análise de enzimas de restrição, como descrito previamente. O DNA de um clone representativo foi sequenciado para confirmar a correcta sequência do DNA. Desenvolveu-se este clone para produzir quantidades suficientes para a subsequente inserção do novo gene laminin.

Um novo gene laminin foi construído para (1) colocar o CTAP em fase com o laminin para a fusão do gene, (2) remover um sitio HindIII (deixando um sitio HindIII no novo plasmideo para ser usado como um sitio de restrição único) , e (3) adicionar três novos sitios de restrição única (StuI, SmaI e SalI) para

futuras mutageneses da cassette do gene laminin. Os oligonucleótidos e a estratégia de ligação são fornecidos a seguir:

```
5'-AATTCGTAT GCCGTGCCCG GATGGTCCGG ACTCCGGCCG
    3'-GCATA CGGCACGGGC CTACCAGGCC TGAGGCCGGC

          *
   TCAGTTCGCT CGTTCTTGCT ACCAGGACCC GGTTACCCTG
   AGTCAAGCGA GCAAGAACGA TGGTCCTGGG CCAATGGGAC
                       *
                     *
   CAGCTGGCTA GCGTTTGCGA CCCGGGCTAC ATCGGTTCTC
   GTCGACCGAT CGCAAACGCT GGGCCCGATG TAGCCAAGAG
                                    *

   GTTGCGACGA CTAATGAGTC GACAGGCCTC-3'
   CAACGCTGCT GATTACTCAG CTGTCCGGAG TTAA-5'
```

Tal como na construção do gene colicina-laminin, o sítio 5'EcoRI estava activado , enquanto que o sítio 3' EcoRI tinha sofrido uma mutação (GAATTC---> CAATTC) para deixar um sítio EcoRI único.

Este novo fragmento do gene foi inserido como se indica a seguir, na construção do vector intermediário no sítio EcoRI único, introduzindo assim a sequência de código do laminin em fase com a terminação da sequência de código do CTAP.

O plasmídeo intermediário foi digerido com EcoRI, tratado com fosfatase intestinal de vitela (CAP) para remover os grupos fosfato 5' para evitar as re-ligações do vector a si próprio, e foi purificado por electroforese gel de agarose. O novo gene laminin foi construído, purificado, activado e ligado como foi previamente descrito. Estes dois pedaços foram depois ligados em conjunto e a mistura da ligação foi usada para

transformar células E. coli 294 competentes . Seleccionaram-se seis clones e analisaram-se por indução com Mitomicina C, para determinar se foi produzida uma proteína de tamanho correcto (135 aminoácidos, aproximadamente 15.000 daltons). Dois dos seis clones induziram especificamente uma proteína destas dimensões.

Estes clones foram pesquisados para a orientação correcta da inserção do gene laminin por digestão dupla com EcoRI e XhoI. A orientação correcta produziu dois fragmentos de 308 pb e 3940 pb. A orientação incorrecta produziu dois fragmentos de 457 pb e 3791 pb. Dois dos seis clones possuiam a orientação correcta. A estrutura correcta do gene foi confirmada pela sequência do DNA de cadeia dupla.

Exemplo 8

Expressão, Purificação e Testes para o Péptido Laminin B_1-40

A expressão da fusão do péptido CTAP/LamB_1-40, em frascos com agitação, ou em culturas de fermentacão foi realizada como foi descrito previamente.

A purificação do péptido laminin B_1-40 é descrita a seguir. As células foram colhidas como foi descrito para a hirudina , e lisadas por sonicação (2x) em um décimo do volume da cultura original de Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM, glucose (TEG) 50 mM. O péptido de fusão insolúvel foi recolhido por centrifugação durante 20 min a 15.000 rpm num rotor SS-34 a 4°C. Os pellets foram ressuspendidos num décimo do volume da cultura

original de Ureia 7 M, Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM (ou GnHCl 6 M, Tris-HCl 25 mM, pH 8,1, EDTA 1 mM), e sonicados seis vezes em gelo (# 8 setting, extremidades largas, sonicador Branson 350 watt), durante 2 min com intervalo de 5 min. (Algumas preparações foram feitas usando PMSF 1 mM para inibir as proteases durante as fases de lise celular e de solubilização). A suspensão foi centrifugada como foi descrito acima durante 30 min a 15.000 rpm num rotor SS-34. A solução sobrenadante (aproximadamente 500 ml) foi dialisada durante 1-3 dias versus 50 litros de ácido acético 10 mM a 4°C, até se formar um precipitado pesado no saco da diálise (3.500 de peso molecular).

A suspensão foi centrifugada (15 min, 15.000 rpm, rotor SS-34, 4°C). O pellet e o sobrenadante foram analisados para determinar a presença da banda de 15.000 daltons, por electroforese em gel de poliacrilamida-SDS. Normalmente , a grande maioria (>90%) da proteína de fusão foi encontrada no pellet. Se tal não acontecesse, a suspensão total seria liofilizada para secar. A Fig 7A mostra o perfil de purificação HPLC da proteína de fusão CTAP-laminin, antes da clivagem por brometo de cianogénio.

A clivagem por brometo de cianogénio da fusão do CTAP-laminin foi realizada como foi descrito no exemplo 6E. Os produtos da reacção CNBR dialisados e liofilizados foram dissolvidos em aproximadamente 200 ml de GnHCl 6M, e titulados a pH 9-10 com Tris base 2 M. Foi adicionado DTT a 0,1 M e a mistura de reacção foi incubada a 37°C, durante 1 h, para reduzir toda a proteína. O pH da reacção foi ajustado a 2,5 - 3,5 por adição de aproximadamente 1/50 do volume de ácido fórmico 88%, para manter

as cisteínas reduzidas. Este material foi feito em 15% de acetonitrilo para análise HPLC. Qualquer precipitado que se formou foi removido por centrifugação e filtração.

A HPLC analítica foi realizada num sistema Water's 680 (controlador 680, bombas 2-510, detector 490E) usando 15 a 40% do gradiente num solvente B, a 0,5 % /min, 2 ml/min, onde o solvente A é 0,065% (v/v) TFA (ampolas Pierce Sequanol) em água (MilliQ ou Burdick e Jackson), e o solvente B é 0,065 % (v/v) de TFA em acetonitrilo (CH_3CN, Burdick e Jackson, "UV grade") usando uma coluna Vydac 214TP54 (C4, dimensões do poro 300 A^o, 5μ de contas, 4,6 mm x 250 mm). O comprimento de onda da monitorização foi 215 nm. Os resultados (Fig 7B) mostram dois picos principais, o primeiro dos quais se demonstrou ser o péptido laminin B_1-40 (por análise de sequenciação e da composição dos aminoácidos), e o segundo foi identificado como sendo a proteína CTAP-III , mais os três aminoácidos de ligação (Arg-Ile-Arg), pelo seu tempo de retenção quando comparado com CTAP-III.

A preparação da HPLC preparativa foi realizada num equipamento da Technology Separations 800 B adaptada a uma coluna de 75 mm x 250 mm A/E (expansão anular) com, aproximadamente, 1000 ml de Vydac 214TPB1520 (C_4, dimensões do poro 300 A^o, dimensões das contas 15-20 μ). A separação foi conseguida carregando a amostra no solvente B 15%, correndo um pequeno gradiente B 15-20 % e eluindo o laminin B_1-40 e o CTAP-III (Arg-Ile-Arg) usando o gradiente B 20-40 % durante 80 min (320 ml/min), e monitorizando a 215 nm. Tal como aconteceu com a separação HPLC analítica, os mesmos dois picos principais foram observados. Fracções apropriadas foram identificadas por RP-HPLC

analítica, "pooled" e liofilizadas para secar.

O péptido laminin B_1-40 foi enrolado como foi descrito para a hirudina , no exemplo 6G.

Exemplo 9

Testes de Aderência Celular

O péptido laminin B_1-40, juntamente com os péptidos YIGSR e CDPGYIGSR descritos previamente, foi dissolvido em solução salina tamponada com fosfato (PBS), e foram revestidas em placas poliestireno com 96 poços, Falcon #3915 a 37°C durante 60 min. As soluções peptídicas foram removidas e os poços lavados duas vezes com PBS. As ligações celulares não específicas foram evitadas adicionando 200 µl de albumina sérica bovina (BSA), 0,1 % (Sigma #4965) em PBS , aos poços e incubando a 37°C durante 60 min. Removeu-se o BSA lavando-os duas vezes com PBS. As células B16/F10 (melanona de murinos) na fase logaritmica da curva de crescimento foram colhidas após 2 min de exposição à tripsina 0,05 %/EDTA 0,1% em PBS, suspendidas num meio de cultura (DMEM+FBS 10%) centrifugadas, e ressuspendidas em meio de ligação (DMEM + HEPES 20 mM + BSA 0,1%). Adicionaram-se a cada poço 100 µl de células (3-4 x 104 células) e incubaram-se durante 60 min a 37°C. As células não aderentes foram removidas por rotação rápida da placa, adição de PBS, aspiração total com excepção de 50 µl do conteúdo dos poços; o processo de lavagem foi repetido mais duas vezes. Após a lavagem final, toda a solução foi aspirada lentamente e as células foram fixadas por adição de 100 µl de metanol durante 15 min. O metanol foi removido e as células foram secas ao ar antes de serem coradas durante 5 min com 100 µl

da solução de violeta cristal 0,1 %. O corante foi removido e os poços foram lavados com 200 µl de H_2O e secos ao ar. As células foram solubilizadas adicionando 100 µl de ácido desoxicólico 2 % e aquecidos levemente num forno de micro ondas. A densidade óptica da solução foi lida num leitor de placas Molecular Devices Corporation , a um comprimento de onda entre 590 nm e 405 nm. A extrapolação da densidade óptica, para o número de células ligadas, foi feita por comparação das leituras com uma curva padrão obtida incubando vários números de células numa placa de microtitulação durante 5 h (para permitir aderência firme mas não divisão significativa) , e lavando e corando como foi descrito acima.

A tabela 2 mostra que o péptido laminin recombinante ($LamB_1$-40) liga as células metastásicas tumorais mais eficazmente neste teste que os pequenos péptidos sintéticos YIGSR ou CDPGYIGSR previamente indicados. O P_1 é um produto de digestão da protease do laminin do rato, usado como o controlo positivo .

TABELA 2

Número Relativo de Células Ligadas

µg/ml Péptido*	P_1	$LamB_1$-40 Reduzido	$LamB_1$-40 Enrolado	YIGSR	CDPGYIGSR
0.00063	0.1				
0.002	1.95				
0.0063	2.3				
0.02	2.3	0.85		0.15	0.2
0.063		0.95	0.025		
0.20		1.35	0.6	0.1	0.3
0.63		2.20	0.5		
2.00		1.85	0.45	0.1	0.45

*Concentração do Péptido usado para revestir os poços da placa de microtitulação.

Exemplo 10

Contrução do pBR-CRM/CTAP(Met_{21})/PF4

A clonagem de um gene hibrido que codifica uma fusão CTAP/PF4 foi realizada em três partes : A Leu_{21} substituida do CTAP-III foi novamente alterada para a metionina nativa, para construir o vector designado por pNP6ΔRI/CTAP(Met_{21}). O fragmento XhoI-EcoRI de 303 pb, contendo o gene completo CTAP-III nativo, foi excisado deste vector e usado para substituir a mesma região CTAP no plasmideo pBR-CRM/CTAP(Leu_{21})/$LamB_1$-40 (descrito previamente no exemplo 7C), para criar pBR-CRM/CTAP(Met_{21})/$LamB_1$-40.

Por fim o gene PF4 foi removido do plasmideo pNP6ΔRI/Col(150)/PF4 como um fragmento EcoRI de 239 pb (a sequência idêntica é fornecida na Fig 3) e ligado ao fragmento do vector descrito acima para construir um vector designado por pBR-CRM/CTAP(Met_{21})/PF4. A extremidade 3' presente no gene laminin, em relação à fusão do gene CTAP PF4, não é expressa devido à presença de codões de terminação na extremidade 3'do gene PF4.

Este vector foi usado para transformar E. coli, os transformantes resistentes à ampicilina foram seleccionados, e os clones isolados foram analisados por digestão de restrição para identificar a orientação correcta do gene. Clones positivos podem ser depois induzidos para a expressão da proteina de fusão CTAP-PF4.

Modificações nos modos de realizar esta invenção, acima descritos, que são obvios para os especialistas nos campos da biologia molecular, quimica das proteinas, biologia celular ou áreas relacionadas,pretendem estar dentro do âmbito das

reivindicações anexas.

REIVINDICAÇOES

1- Um método de estabilização da expressão de proteínas heterólogas num hospedeiro procariótico para produção de uma proteína de fusão , caracterizado pelo facto de compreender a construção de um gene híbrido incluindo uma primeira sequência de DNA que codifica o péptido activador do tecido conjuntivo III (CTAP-III), ligado em estrutura com uma segunda sequência de DNA que codifica o polipéptido heterólogo, geralmente não estável, recuperável num sistema expressão bacteriana, em que o referido gene híbrido, após tradução, produz a proteína de fusão em quantidade recuperável.

2- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto de CTAP-III ser CTAP-III humano.

3- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 2, caracterizado pelo facto de CTAP-III análogo ser CTAP-III(Leu_{21}).

4- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o DNA que codifica o sítio de clivagem selectiva ser introduzido na composição, na ligação entre a referida primeira sequência de DNA e a referida segunda sequência de DNA.

5- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a referida segunda sequência de DNA codificar a hirudina.

6- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 5,

caracterizado pelo facto de o DNA que codifica a hirudina, codificar a variante hirudina HV-1.

7- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a referida segunda sequência de DNA, que codifica o péptido laminin B_1 possuir a seguinte sequência de aminoácidos:

Pro_1-Cys Pro Asp Gly Pro Asp Ser Gly Arg Gln Phe
Ala Arg Ser Cys Tyr Gln Asp Pro Val Thr Leu Gln Leu Ala
X Val Cys Asp Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp Asp-Y,

onde Pro_1 é, quer Pro, quer des-NH_2Pro, X é quer Cys, quer seleccionada a partir do grupo constituido pelos aminoácidos alifáticos neutros, e Y é quer -OH quer -NH_2.

8- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 4, caracterizado pelo facto de o vector de expressão bacteriana possuir uma região reguladora da transcrição, induzivel.

9- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 8, caracterizado pelo facto de a região reguladora da iniciação da transcrição, induzivel, consistir, essencialmente, em, lendo na direcção 5' para 3', numa região promotora da colicina E1, e uma região operadora adjacente lexA.

10- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a referida célula bacteriana ser a E. coli.

11- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 10, caracterizado pelo facto de o hospedeiro da E. coli ser uma estirpe sensivel à temperatura de lexA ou recA.

12- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 4, caracterizado pelo facto de o sitio de clivagem selectiva ser clivado pelo brometo de cianogénio.

13- Um método para a preparaçao de um polipéptido, num microorganismo hospedeiro, caracterizado pelo facto de o polipéptido ser heterólogo para o hospedeiro e poder ser produzido em baixas quantidades percentuais da proteína total, compreendendo o seu aperfeiçoamento:

(a) a ligação de uma sequência de DNA que codifica a referida proteína heteróloga, em composição com uma sequência de DNA que codifica o péptido activador do tecido conjuntivo III humano (CTAP-III), para formar um gene híbrido que codifica uma proteína de fusão;

(b) introdução do gene híbrido, em condições para expressão no referido hospedeiro, pelo qual o referido polipéptido de fusão é expresso.

(c) isolamento da referida proteína de fusão para fornecer o polipéptido em elevada produção.

14- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 13, caracterizado pelo facto de o referido hospedeiro ser uma célula bacteriana.

15- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 14, caracterizado pelo facto de a célula bacteriana ser a E. coli.

16- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 15, caracterizado pelo facto de um hospedeiro de E. coli ser uma estirpe sensível à temperatura lexA ou recA.

17- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 16, caracterizado pelo facto de as referidas condições para a expressão incluirem uma região reguladora da iniciação da transcrição, induzível.

18- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 13,

caracterizado pelo facto de a proteina heteróloga ser a hirudina.

19- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 18, caracterizado pelo facto de o DNA que codifica a hirudina, codificar a variante hirudina HV-1.

20- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 13, caracterizado pelo facto de a proteina heteróloga ser o péptido laminin B_1 , possuindo a seguinte sequência de aminoácidos:

Pro_1-Cys Pro Asp Gly Pro Asp Ser Gly Arg Gln Phe
Ala Arg Ser Cys Tyr Gln Asp Pro Val Thr Leu Gln Leu Ala
X Val Cys Asp Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp Asp-Y,

em que Pro_1 é, quer des-NH_2 Pro, X é quer Cys, quer seleccionada do grupo constituido pelos aminoácidos alifáticos neutros, e Y é, quer -OH, quer -NH_2.

21- Um método de estabilizar a expressão de hirudina num hospedeiro procariótico, caracterizado pelo facto de compreender:

a construção de um gene hibrido que codifica uma proteina de fusão, em que o referido gene compreende uma sequência de DNA que codifica CTAP-III, ligado em estrutura com uma segunda sequência de DNA que codifica a hirudina.

a introdução do gene hibrido em condições para a expressão no referido hospedeiro procariótico, onde a proteina de fusão é expressa; e

o isolamento da referida proteina de fusão, expressa de forma estável.

22- Um método de produção de uma proteina heteróloga, conforme reivindicado na reivindicação 1.

23- Um vector de expressão bacteriana, capaz de aumentar o nível de expressão de um polipéptido heterólogo, instável, produzido bacterianamente, caracterizado pelo facto de

compreender um gene híbrido possuindo uma sequência de DNA que codifica o péptido activador do tecido conjuntivo III, ligado em estrutura com uma sequência de DNA heteróloga que codifica um polipéptido instável, geralmente não recuperável, em elevada produção, num sistema de expressão bacteriana.

24- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 4, caracterizado pelo facto de as duas sequências de código estarem ligadas por nucleótidos com o código para aminoácidos que definem um sítio de clivagem selectiva possuindo, pelo menos, um aminoácido.

25- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 24, caracterizado pelo facto de a segunda sequência de código codificar a hirudina.

26- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 24, caracterizado pelo facto de a segunda sequência de código codificar um péptido laminin B_1 , possuindo a referida sequência de aminoácidos:

Pro_1-Cys Pro Asp Gly Pro Asp Ser Gly Arg Gln Phe
Ala Arg Ser Cys Tyr Gln Asp Pro Val Thr Leu Gln Leu Ala
X Val Cys Asp Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp Asp-Y,

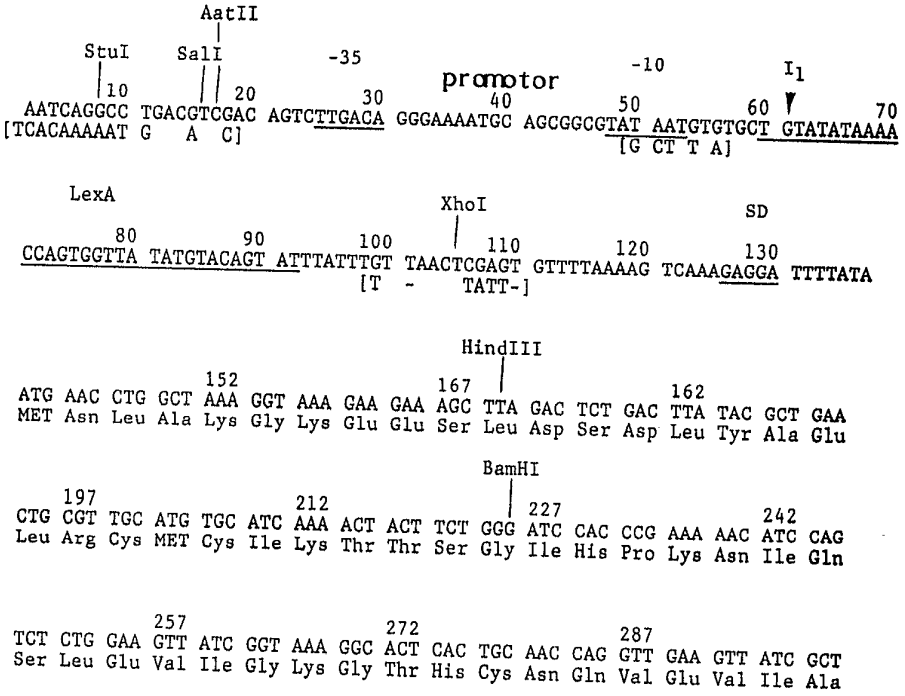
em que Pro_1 é, quer Pro, quer des-NH_2Pro, X é, quer Cys, quer seleccionada a partir do grupo constituído pelos aminoácidos alifáticos neutros, e Y é, quer -OH quer $-NH_2$.

27- . Uma sequência de DNA, conforme reivindicado na reivindicação 24, caracterizada pelo facto de o referido aminoácido que constitui o referido sítio de clivagem ser a metionina.

Lisboa, 4 de Maio de 1990

PELO AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
O [illegible]

FIG. 1-1


AatII
StuI
SalI
-35
promotor
-10
I1
10
20
30
40
50
60
70
AATCAGGCC TGACGTCGAC AGTCTTGACA GGGAAAATGC AGCGGCGTAT AATGTGTGCT GTATATAAAA
[TCACAAAAAT G A C]
[G CT T A]
LexA
XhoI
SD
80
90
100
110
120
130
CCAGTGGTTA TATGTACAGT ATTTATTTGT TAACTCGAGT GTTTTAAAAG TCAAAGAGGA TTTTATA
[T - TATT-]
HindIII
152
167
162
ATG AAC CTG GCT AAA GGT AAA GAA GAA AGC TTA GAC TCT GAC TTA TAC GCT GAA
MET Asn Leu Ala Lys Gly Lys Glu Glu Ser Leu Asp Ser Asp Leu Tyr Ala Glu
BamHI
197
212
227
242
CTG CGT TGC ATG TGC ATC AAA ACT ACT TCT GGG ATC CAC CCG AAA AAC ATC CAG
Leu Arg Cys MET Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln
257
272
287
TCT CTG GAA GTT ATC GGT AAA GGC ACT CAC TGC AAC CAG GTT GAA GTT ATC GCT
Ser Leu Glu Val Ile Gly Lys Gly Thr His Cys Asn Gln Val Glu Val Ile Ala

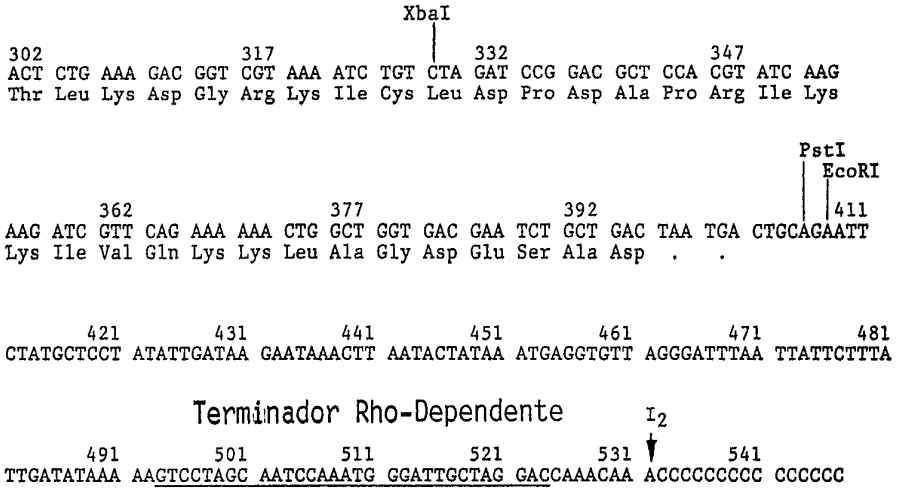

XbaI
302 317 332 347
ACT CTG AAA GAC GGT CGT AAA ATC TGT CTA GAT CCG GAC GCT CCA CGT ATC AAG
Thr Leu Lys Asp Gly Arg Lys Ile Cys Leu Asp Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys
PstI
EcoRI
362 377 392 411
AAG ATC GTT CAG AAA AAA CTG GCT GGT GAC GAA TCT GCT GAC TAA TGA CTGCAGAATT
Lys Ile Val Gln Lys Lys Leu Ala Gly Asp Glu Ser Ala Asp . .
421 431 441 451 461 471 481
CTATGCTCCT ATATTGATAA GAATAAACTT AATACTATAA ATGAGGTGTT AGGGATTTAA TTATTCTTTA
Terminador Rho-Dependente
I2
491 501 511 521 531 541
TTGATATAAA AAGTCCTAGC AATCCAAATG GGATTGCTAG GACCAAACAA ACCCCCCCCC CCCCCC

FIG. 1-2

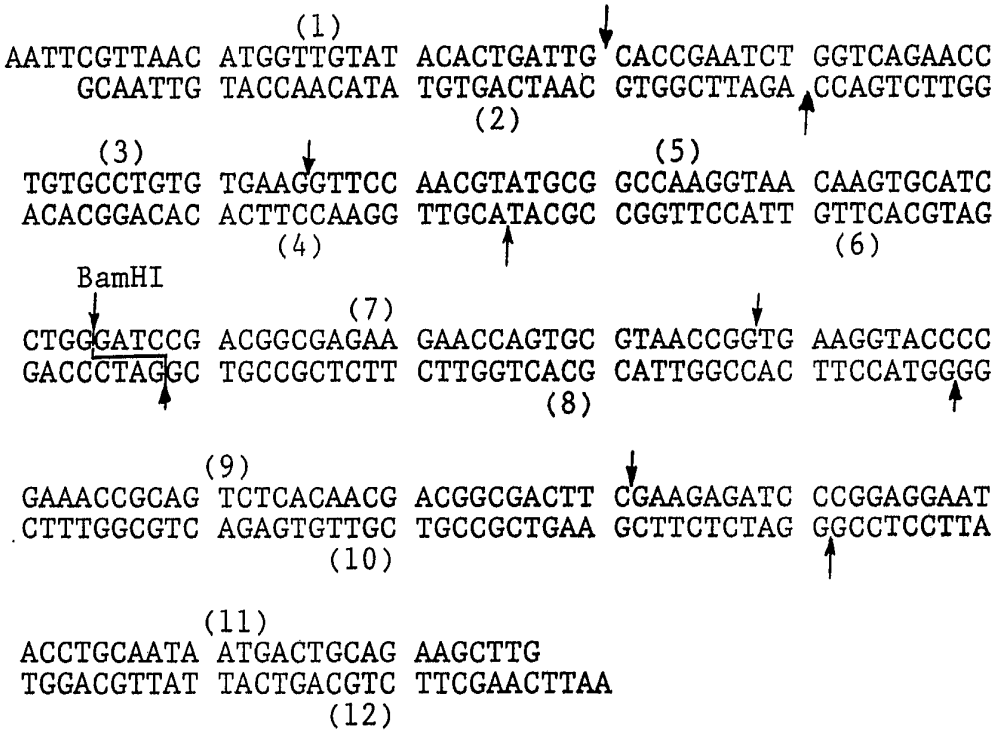

(1)
AATTCGTTAAC ATGGTTGTAT ACACTGATTG CACCGAATCT GGTCAGAACC
GCAATTG TACCAACATA TGTGACTAAC GTGGCTTAGA CCAGTCTTGG
(2)
(3)
(5)
TGTGCCTGTG TGAAGGTTCC AACGTATGCG GCCAAGGTAA CAAGTGCATC
ACACGGACAC ACTTCCAAGG TTGCATACGC CGGTTCCATT GTTCACGTAG
(4)
(6)
BamHI
(7)
CTGGGATCCG ACGGCGAGAA GAACCAGTGC GTAACCGGTG AAGGTACCCC
GACCCTAGGC TGCCGCTCTT CTTGGTCACG CATTGGCCAC TTCCATGGGG
(8)
(9)
GAAACCGCAG TCTCACAACG ACGGCGACTT CGAAGAGATC CCGGAGGAAT
CTTTGGCGTC AGAGTGTTGC TGCCGCTGAA GCTTCTCTAG GGCCTCCTTA
(10)
(11)
ACCTGCAATA ATGACTGCAG AAGCTTG
TGGACGTTAT TACTGACGTC TTCGAACTTAA
(12)

FIG. 2

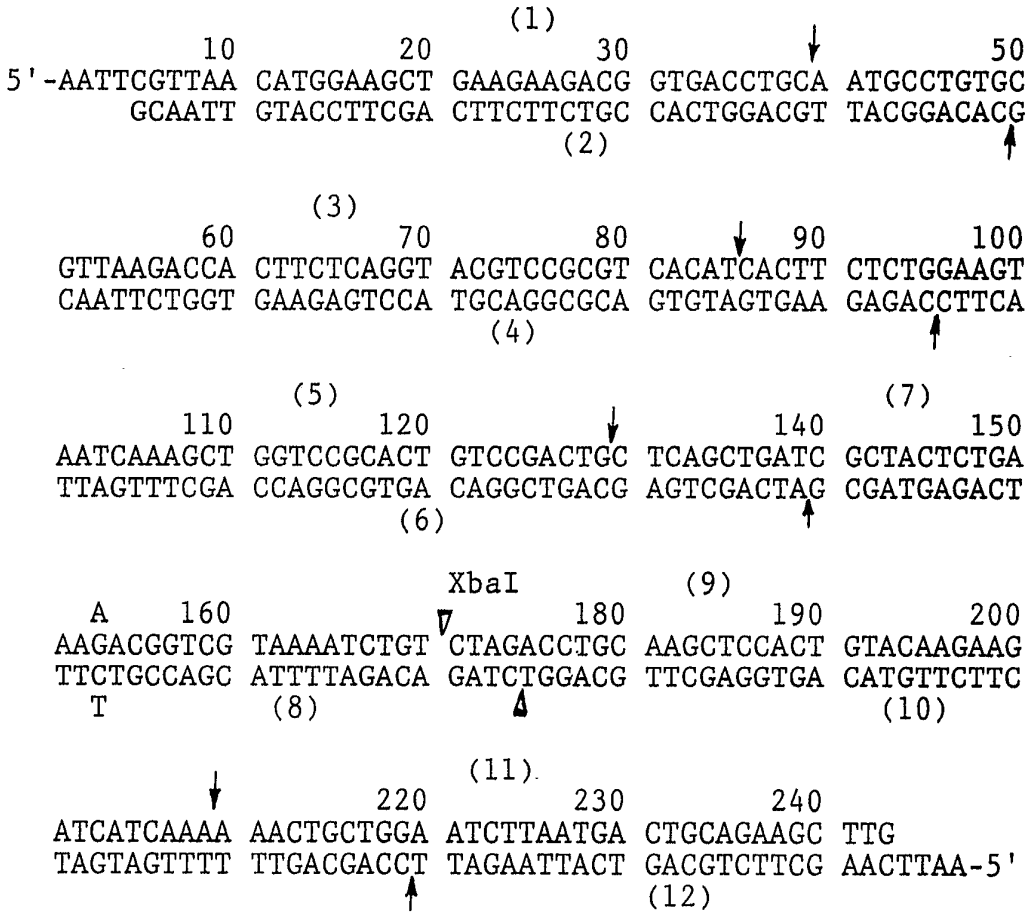

(1)
10 20 30 50
5'-AATTCGTTAA CATGGAAGCT GAAGAAGACG GTGACCTGCA ATGCCTGTGC
GCAATT GTACCTTCGA CTTCTTCTGC CACTGGACGT TACGGACACG
(2)
(3)
60 70 80 90 100
GTTAAGACCA CTTCTCAGGT ACGTCCGCGT CACATCACTT CTCTGGAAGT
CAATTCTGGT GAAGAGTCCA TGCAGGCGCA GTGTAGTGAA GAGACCTTCA
(4)
(5) (7)
110 120 140 150
AATCAAAGCT GGTCCGCACT GTCCGACTGC TCAGCTGATC GCTACTCTGA
TTAGTTTCGA CCAGGCGTGA CAGGCTGACG AGTCGACTAG CGATGAGACT
(6)
XbaI (9)
A 160 180 190 200
AAGACGGTCG TAAAATCTGT CTAGACCTGC AAGCTCCACT GTACAAGAAG
TTCTGCCAGC ATTTTAGACA GATCTGGACG TTCGAGGTGA CATGTTCTTC
T (8) (10)
(11)
220 230 240
ATCATCAAAA AACTGCTGGA ATCTTAATGA CTGCAGAAGC TTG
TAGTAGTTTT TTGACGACCT TAGAATTACT GACGTCTTCG AACTTAA-5'
(12)

FIG. 3

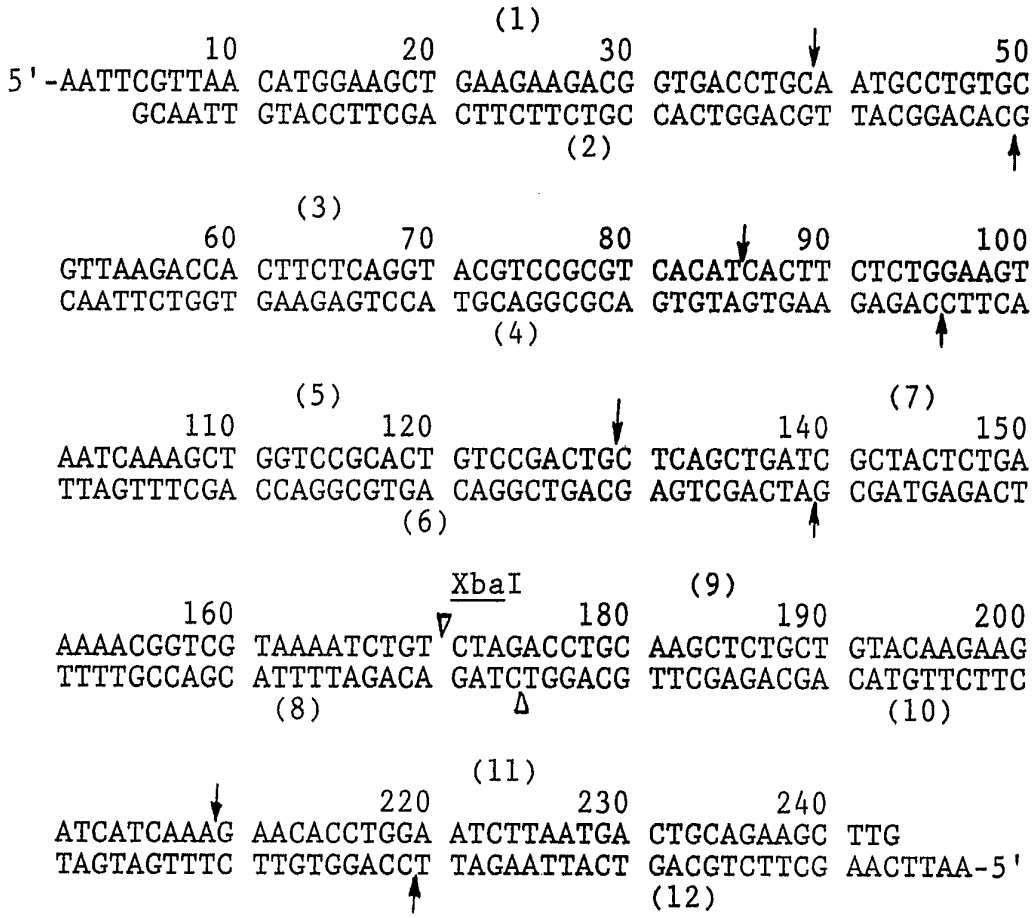

(1)
10 20 30 50
5'-AATTCGTTAA CATGGAAGCT GAAGAAGACG GTGACCTGCA ATGCCTGTGC
GCAATT GTACCTTCGA CTTCTTCTGC CACTGGACGT TACGGACACG
(2)
(3)
60 70 80 90 100
GTTAAGACCA CTTCTCAGGT ACGTCCGCGT CACATCACTT CTCTGGAAGT
CAATTCTGGT GAAGAGTCCA TGCAGGCGCA GTGTAGTGAA GAGACCTTCA
(4)
(5) (7)
110 120 140 150
AATCAAAGCT GGTCCGCACT GTCCGACTGC TCAGCTGATC GCTACTCTGA
TTAGTTTCGA CCAGGCGTGA CAGGCTGACG AGTCGACTAG CGATGAGACT
(6)
XbaI (9)
160 180 190 200
AAAACGGTCG TAAAATCTGT CTAGACCTGC AAGCTCTGCT GTACAAGAAG
TTTTGCCAGC ATTTTAGACA GATCTGGACG TTCGAGACGA CATGTTCTTC
(8) (10)
(11)
220 230 240
ATCATCAAAG AACACCTGGA ATCTTAATGA CTGCAGAAGC TTG
TAGTAGTTTC TTGTGGACCT TAGAATTACT GACGTCTTCG AACTTAA-5'
(12)

FIG. 4

```
ATG GAA ACC GCG GTA ATG AAC CTG GCT AAA GGT AAA GAA GAA AGC TTG GAC TCT
MET Glu Thr Ala Val MET Asn Leu Ala Lys Gly Lys Glu Glu Ser Leu Asp Ser

GAC TTA TAC GCT GAG CTC CGT TGC CTG TGC ATC AAA ACT ACT TCT GGG ATC CAC
Asp Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Cys Leu Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His

CCG AAA AAC ATC CAG TCT CTG GAA GTT ATC GGT AAA GGC ACT CAC TGC AAC CAG
Pro Lys Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val Ile Gly Lys Gly Thr His Cys Asn Gln

GTT GAA GTT ATC GCT ACT CTG AAA AAC GGT CGT AAA ATC TGT CTA GAC CCG GAC
Val Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Arg Lys Ile Cys Leu Asp Pro Asp

GCT CCA CGT ATC AAG AAG ATC GTT CAG AAA AAA CTG GCT GGT GAC GAA TCT GCT
Ala Pro Arg Ile Lys Lys Ile Val Gln Lys Lys Leu Ala Gly Asp Glu Ser Ala

GAC AGA ATT CGT ATG CCG TGC CCG GAT GGT CCG GAC TCC GGC CGT CAG TTC GCT
Asp(Arg Ile Arg)MET Pro Cys Pro Asp Gly Pro Asp Ser Gly Arg Gln Phe Ala

CGT TCT TGC TAC CAG GAC CCG GTT ACC CTG CAG CTG GCT AGC GTT TGC GAC CCG
Arg Ser Cys Tyr Gln Asp Pro Val Thr Leu Gln Leu Ala Ser Val Cys Asp Pro
                                                    ↓
                                                   Cys

GGC TAC ATC GGT TCT CGT TGC GAC GAC TAA TGA
Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp Asp  .   .
```

FIG. 5

FIG. 6

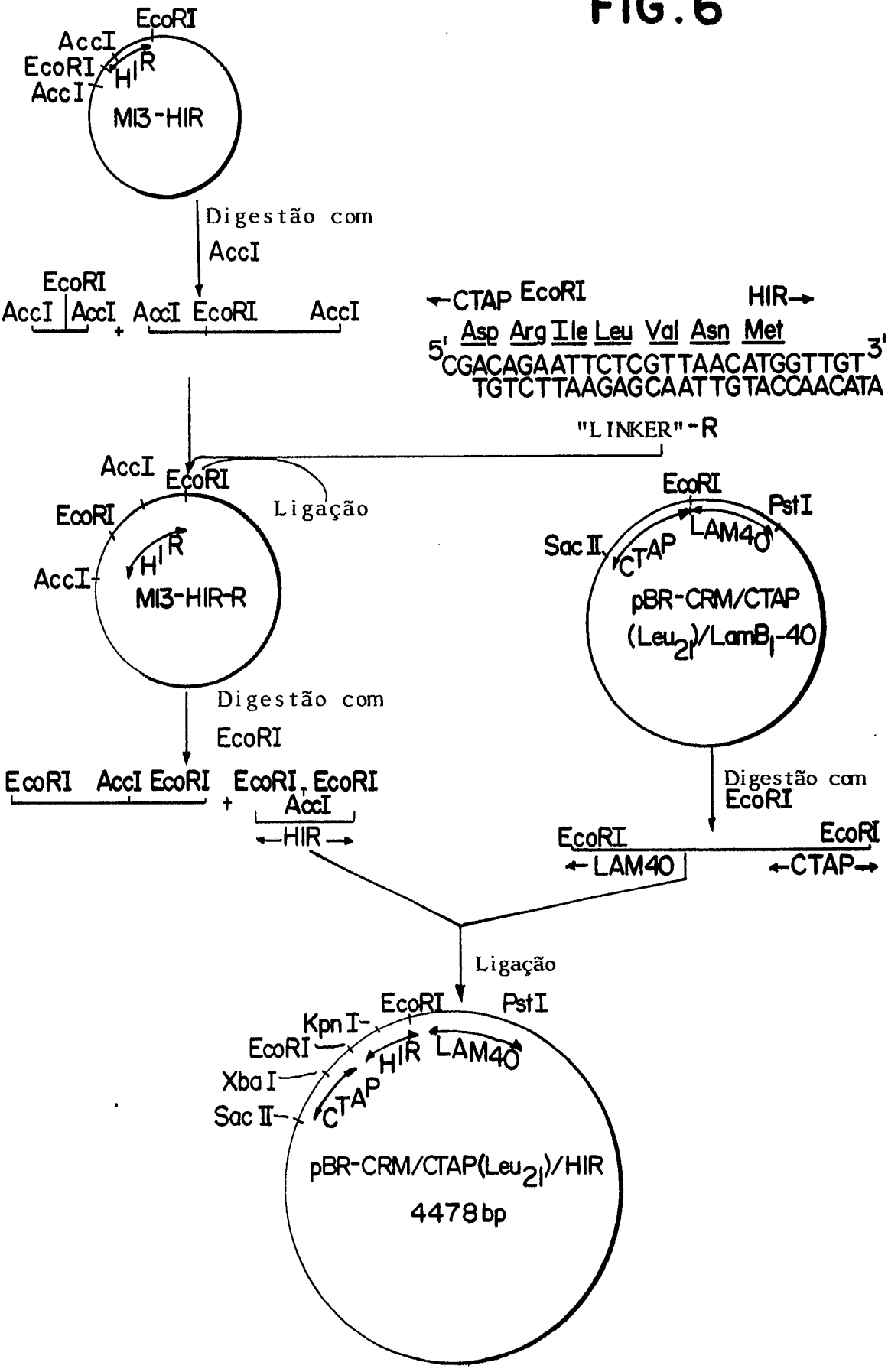

EcoRI
AccI
EcoRI
AccI
HIR
M13-HIR
Digestão com
AccI
EcoRI
AccI AccI AccI EcoRI AccI
←CTAP EcoRI
HIR→
Asp Arg Ile Leu Val Asn Met
5' CGACAGAATTCTCGTTAACATGGTTGT 3'
TGTCTTAAGAGCAATTGTACCAACATA
"LINKER"-R
AccI
EcoRI
Ligação
EcoRI
AccI
HIR
M13-HIR-R
Digestão com
EcoRI
EcoRI AccI EcoRI EcoRI EcoRI
AccI
←HIR→
EcoRI
PstI
Sac II
CTAP
LAM40
pBR-CRM/CTAP
(Leu2I)/LamB1-40
Digestão com
EcoRI
EcoRI
←LAM40
EcoRI
←CTAP→
Ligação
EcoRI
PstI
Kpn I
EcoRI
HIR
LAM40
Xba I
CTAP
Sac II
pBR-CRM/CTAP(Leu2I)/HIR
4478 bp

FIG. 7A

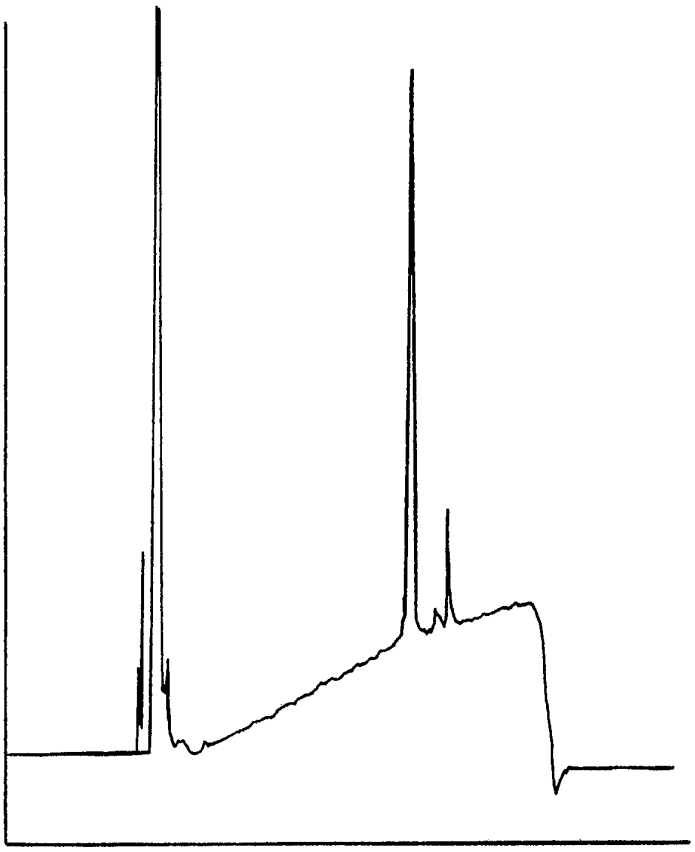


FIG. 7B

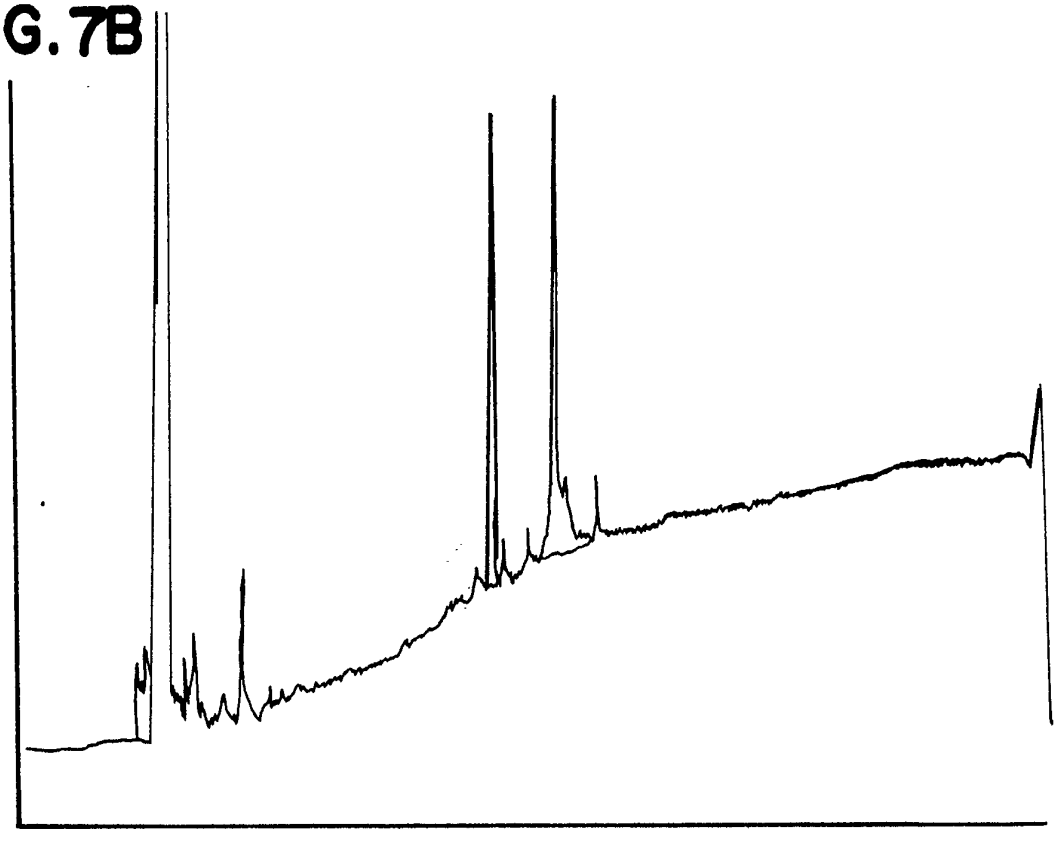
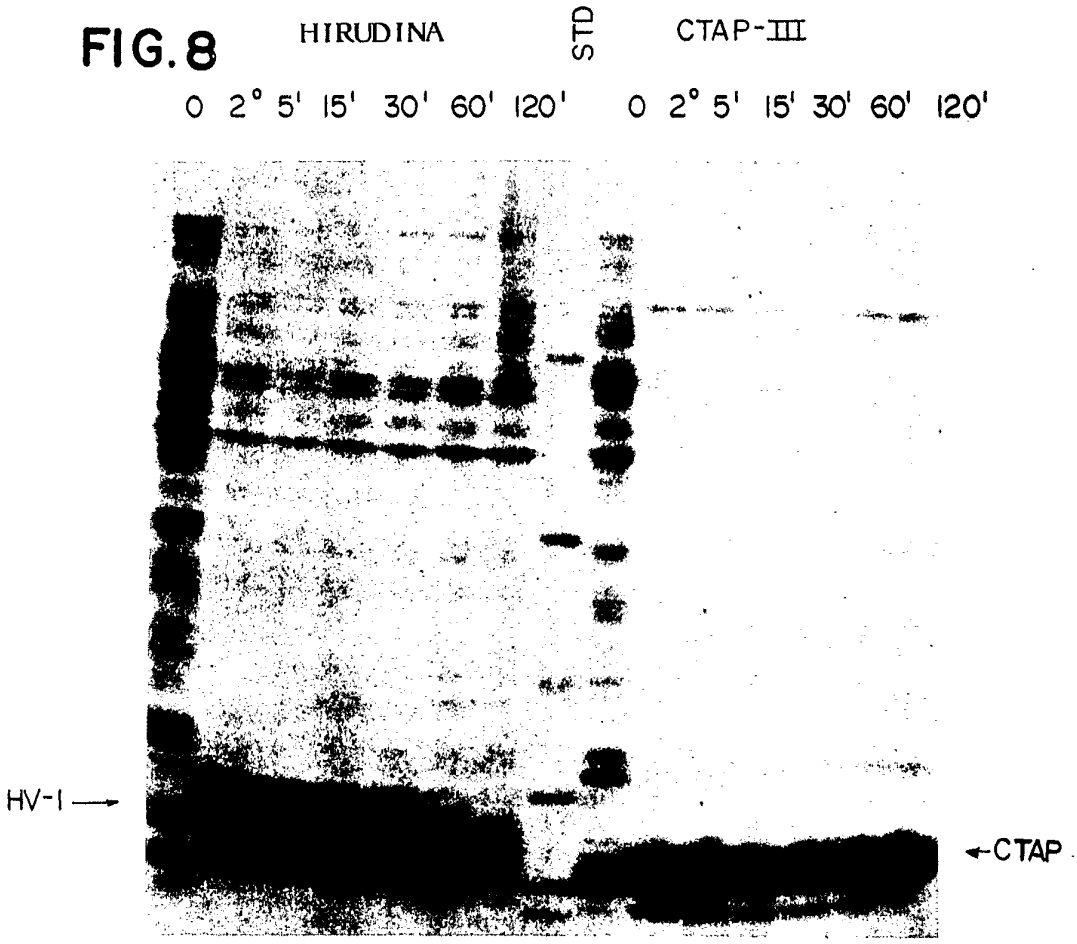


FIG.8



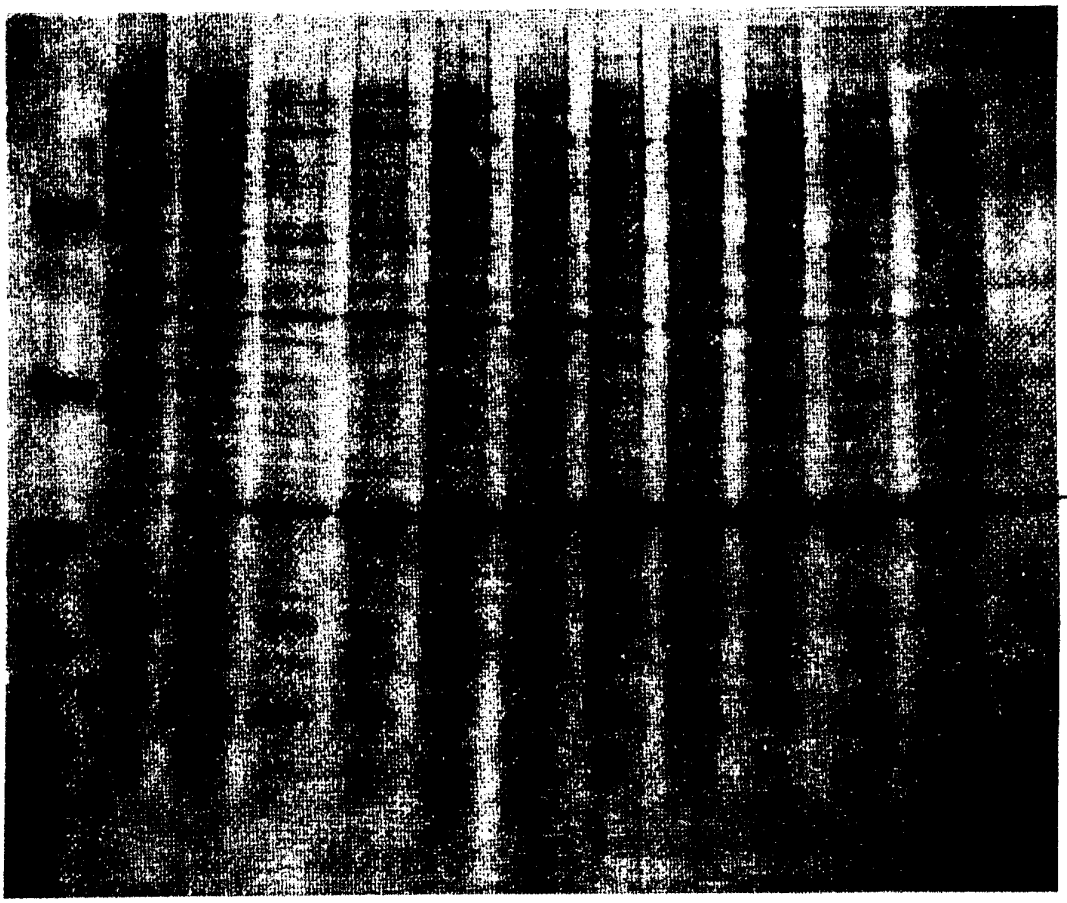


FIG. 9

PURIFICAÇÃO DA HIRUDINA RECOMBINANTE

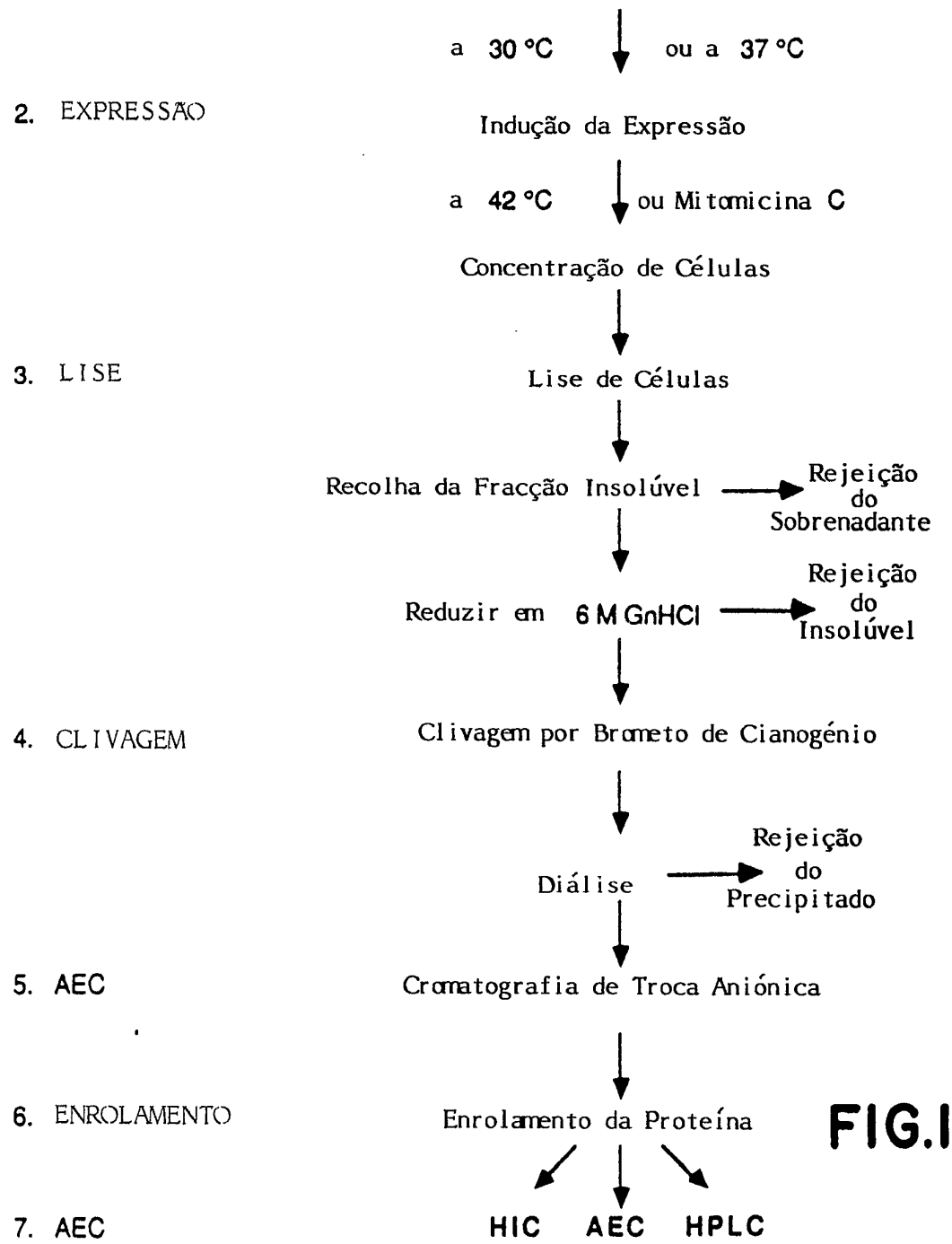


FIG.10

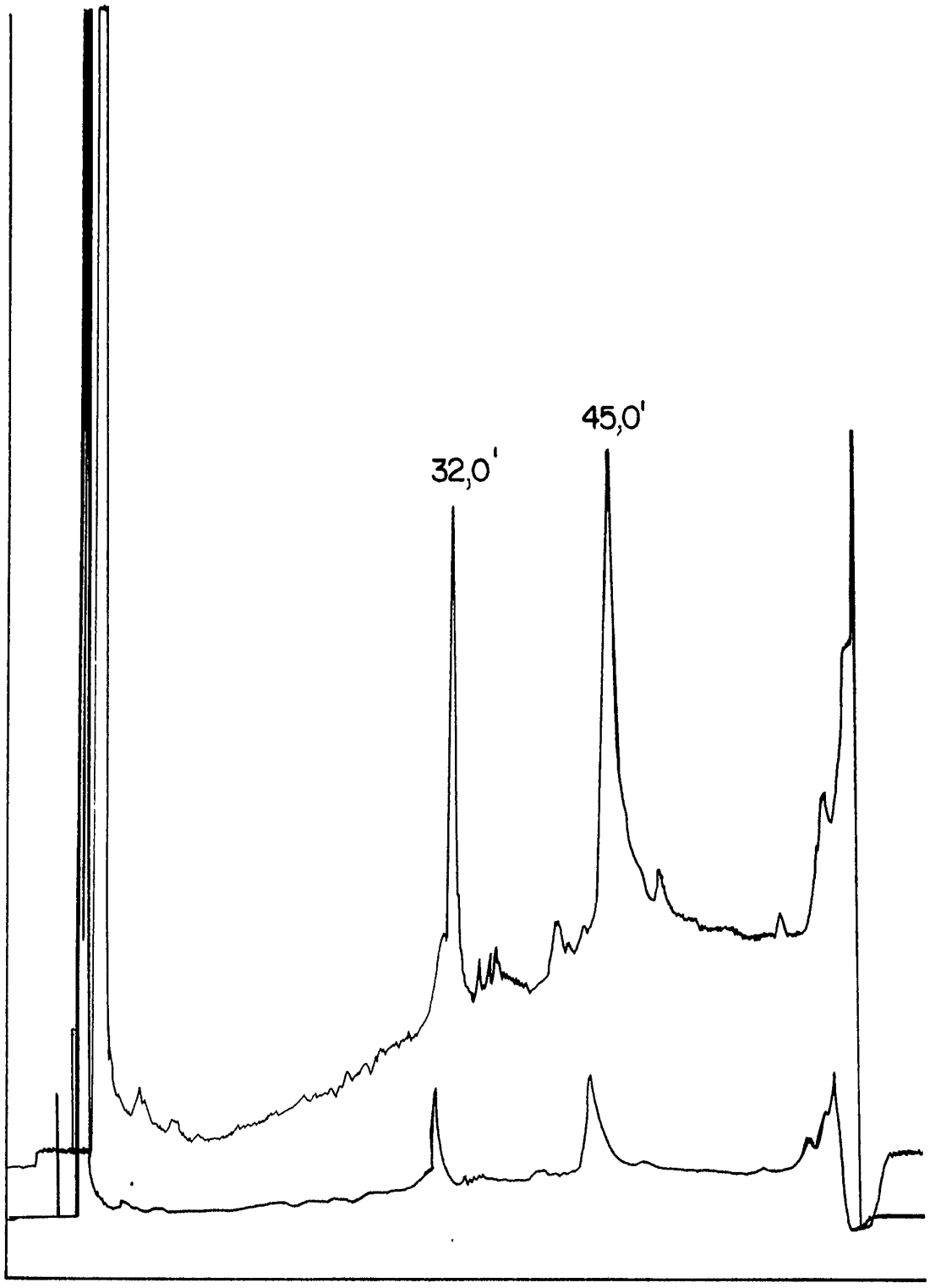


FIG.II

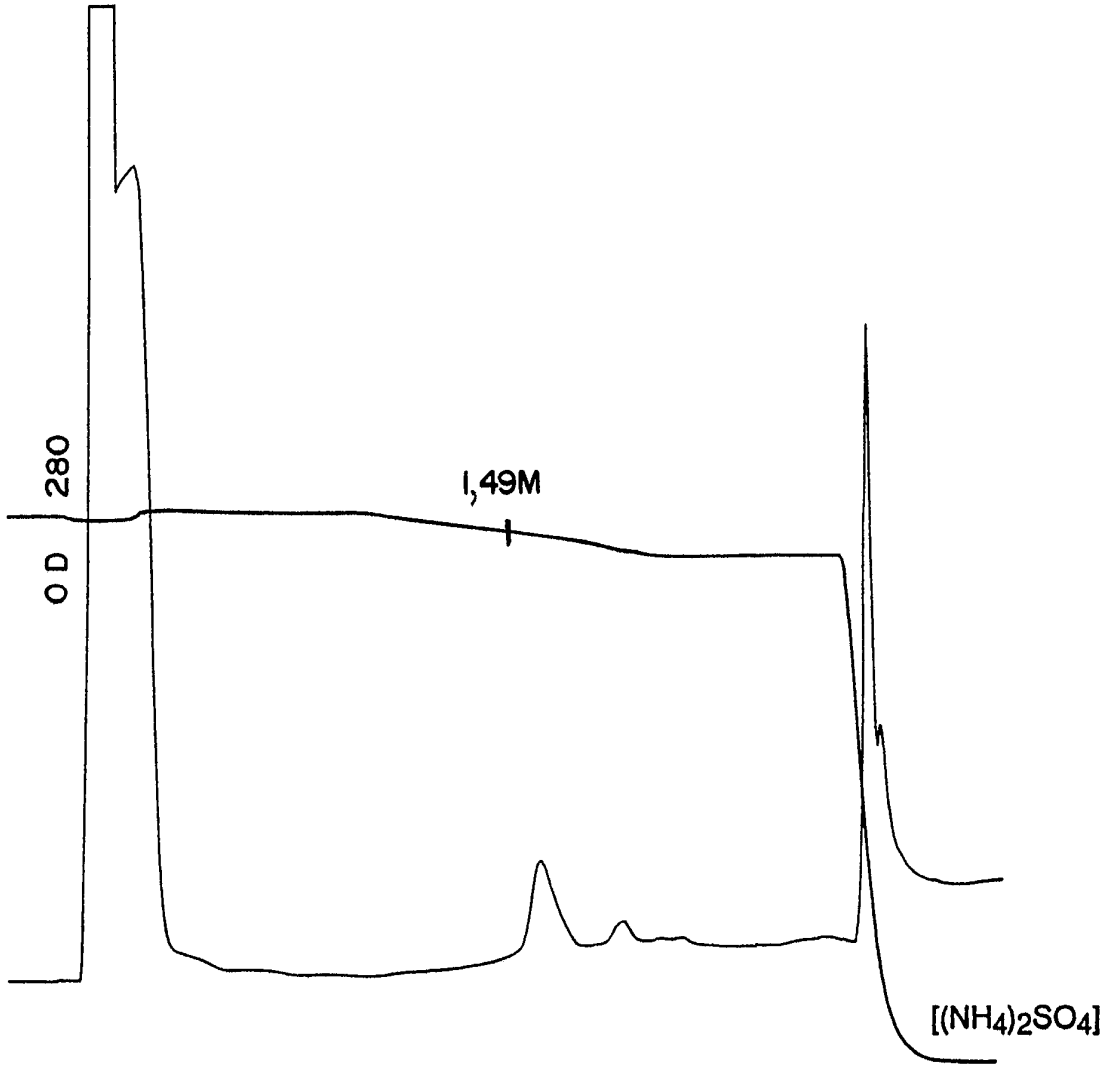


FIG. 12

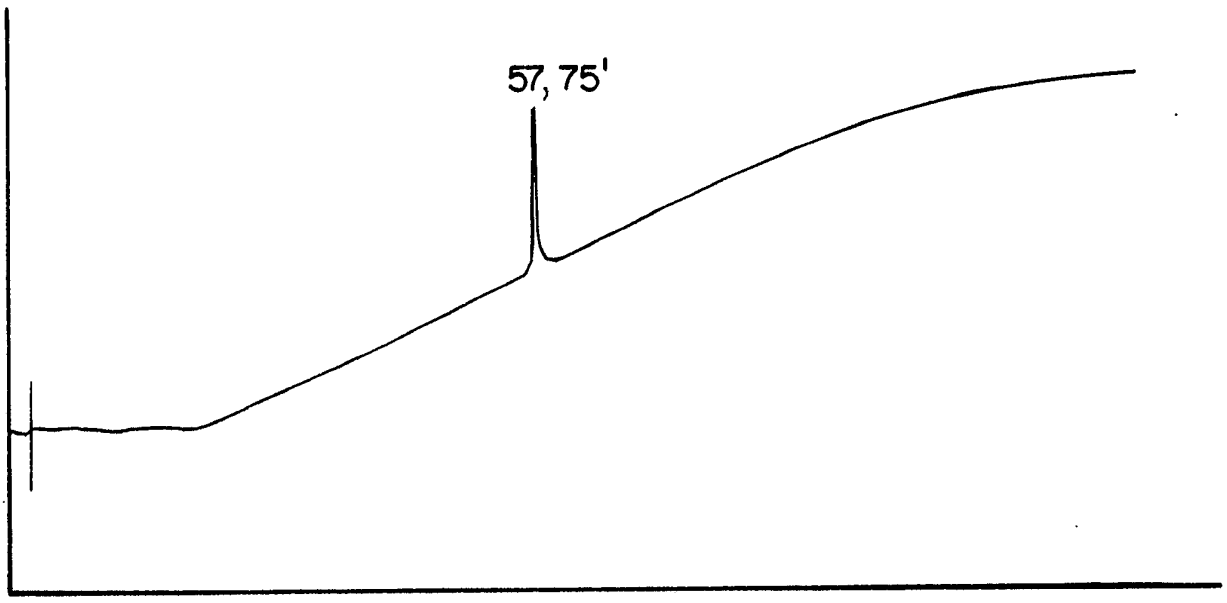


FIG. 13

RESUMO

8919 X 0199 1990/05/04 16:18:32 PAT. 93957 R

"METODO E VECTORES PARA ESTABILIZAÇAO DA EXPRESSAO DE PROTEINAS HETEROLOGAS

Esta invenção refere-se a um método para a obtenção de péptidos heterólogos a partir de proteinas de fusão, no qual pelo menos um dos componentes da fusão que é fornecido é o péptido activador do tecido conjuntivo III. Os polipéptidos de expressão que utilizam este método são a hirudina, um péptido laminin B_1, e o factor 4 das plaquetas. Também são fornecidas sequências de DNA que codificam a proteina de fusão, vectores contendo estas sequências, e hospedeiros procarióticos transformados, úteis na realização do método da presente invenção.