



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) Número de Publicação: **PT 566554 E**

(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)

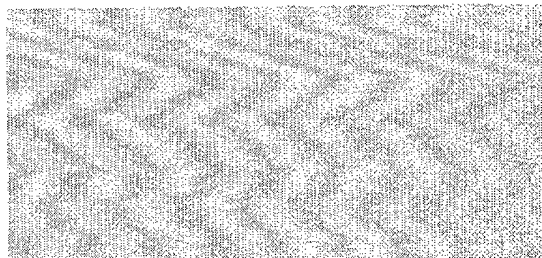
C12N015/85 A C12N005/10 B
C12Q001/18 B C12N007/02 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1993.03.12	(73) Titular(es): MONSANTO COMPANY 800 N. LINDBERGH BOULEVARD ST. LOUIS, MO 63167 US
(30) Prioridade: 1992.03.13 US 850700	
(43) Data de publicação do pedido: 1993.10.20	(72) Inventor(es): MAUREEN KATHERINE US PAUL JEROME HIPPENMEYER US
(45) Data e BPI da concessão: 2000.05.03	(74) Mandatário(s): JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA PT

(54) Epígrafe: PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES USANDO PROMOTORES DO VÍRUS DE HERPES E TRANSACTIVADORES VP16

(57) Resumo:





DESCRIÇÃO

"PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES USANDO PROMOTORES DO VÍRUS DE HERPES E TRANSACTIVADORES VP16"

BASES DA INVENÇÃO

Campo da invenção

Esta invenção refere-se à produção de proteínas recombinantes e mais particularmente a um processo para a transactivação de genes heterólogos.

Conhecimento Científico Relacionado

A capacidade para produzir de modo eficaz proteínas recombinantes em cultura de células de mamíferos é crítica para a produção simultânea de agentes de investigação e produtos comerciais. Várias aproximações e sistemas de vectores hospedeiros para a produção de proteínas recombinantes têm sido revistas (Kaufman, Genetic Engineering Principles and Methods, vol. 9, J. K. Setlow, ed., Plenum Press, New York, 1987; Warren et al., Recombinant DNA Technology and Applications, A. Prokop, R. Bajpai e C. Ho, eds., McGraw Hill, New York, 1990). Estes sistemas incluem o uso de vectores episomais de elevadas cópias tal como o papilomavírus bovino (Howley et al., Methods in Enzymology, vol. 101, Academic Press, New York, 1983), vectores amplificáveis tais como aqueles contendo o gene da di-hidrofolato reductase (Kaufman, supra), o gene da asparagina sintetase (Andrulis, Molecular Cell Genetics, vol. 17, 1985) ou o gene da ornitina descarboxilase (McConlogue,



Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, 1987) ou fortes promotores constitutivos tal como o promotor 40 do vírus simiano (Mulligan et al., Science, vol. 209, pp. 1422-1427, 1980) ou o promotor primitivo do citomegalovírus principal humano (Boshart et al., Cell, vol. 41, pp. 521-530, 1985). Todos estes sistemas contam com os níveis de transactivadores endógenos no tipo de célula particular para estimular a transcrição dos promotores usados para construir os vectores de expressão.

Um caminho alternativo para a produção de elevados níveis seria desenhar células com um activador transcricional específico ou transactivador. Se o transactivador tem um promotor alvo específico, então o promotor alvo pode ser ligado a um gene de interesse e ser inserido na célula desenhada. A quantidade de proteína alvo produzida por aquela célula irá depender de vários parâmetros. Primeiro, a actividade específica inerente ao transactivador será um factor na quantidade de transcrição devida ao promotor alvo. Adicionalmente, a quantidade de transactivador produzido pela célula alvo irá afectar a quantidade de transactivação. Por exemplo, em células de ovário de hamster Chinês (CHO) está presente um baixo nível de receptor/transactivador glucocorticóide endógeno. A transfecção de um plasmídeo que requer o receptor/transactivador glucocorticóide resulta em muito pouca expressão pelo plasmídeo. No entanto, se as células forem primeiro desenhadas para expressar elevados níveis do receptor/transactivador glucocorticóide, então é obtido elevado nível de expressão pelo mesmo plasmídeo (Israel et al., Nuc. Acids Res., vol. 17, pp. 4589-4606, 1989). Por conseguinte, a quantidade de transactivação depende da quantidade de transactivador na célula. A quantidade de transactivador irá depender do promotor usado para conduzir a expressão do transactivador e o local da integração da cassette na célula hospedeira. Em terceiro lugar, a quantidade de vector alvo numa célula particular irá influenciar o número de cópias que serão transactivadas. O local de integração do promotor alvo pode



também desempenhar um papel na expressão do promotor activado.

Outra preocupação importante é a especificidade do transactivador. Se o transactivador interage com vários promotores celulares endógenos, então será de esperar que esses promotores serão também transactivados na célula hospedeira desenhada. Esta pode ser ou não uma situação desejada dependendo do que são esses genes. Um efeito possível do uso de um transactivador promíscuo é que a sua ligação aos promotores endógenos diminui com eficácia a sua concentração livre na célula, possivelmente removendo por titulação a quantidade disponível para a transactivação do promotor alvo.

Só porque um promotor exibe elevados níveis de expressão sob condições transientes não indica que será útil para a produção de proteínas sob condições estáveis. Um exemplo ilustrativo é o promotor imediato primitivo (IE) do citomegalovírus humano (HCMV) que é um dos promotores mais fortes usados no campo para expressão transiente (Foecking et al., Gene, 45; pp. 101-145, 1986; Hippenmeyer et al., Poultry Science 70, pp. 982-992, 1991). Adicionalmente alguns genes virais não têm a regulação esperada uma vez integrados no genoma da célula tal como o gene da timidina cinase do vírus de herpes simplex (HSV) (Silver et al., Molecular and Cellular Biology 5; pp. 518-528, 1985).

Por conseguinte, embora o pedido de patente E.P. 8802149.5 mostre que uma linhagem de células na qual o VP16 (também conhecido como Vmw65, VF65 ou alfa-TIF) produzido conduz à transactivação do promotor alvo sob condições transientes e embora Post et al, (Cell, 24, pp. 555-565, 1981) mostrassem que o promotor imediato primitivo (IE) 175 (também conhecido como ICP4), quando presente no genoma duma célula, pode ser transactivado por infecção transmitida por vírus, nenhum mostrou que quando ambos o VP16 e o



promotor alvo operacionalmente ligado a um gene de interesse são integrados na mesma célula, ocorram elevados níveis de transactivação e resultem elevados níveis de produção de proteína.

Existe uma necessidade nos conhecimentos científicos para linhagens de células e sistemas que possam ser usados com uma variedade de genes para alcançar elevados níveis de produção de proteínas recombinantes estáveis.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção contém um método de produção de linhagens de células para a expressão de elevados níveis de um produto de gene. O método compreende os passos de: co-transfectar uma célula com uma primeira construção que origina com que a célula expresse a proteína transactivadora VP16 do vírus de herpes simplex e uma segunda construção compreendendo um gene de resistência de selecção a um primeiro agente de selecção; seleccionar as células que são resistentes ao primeiro agente de selecção; rastrear as células que são resistentes ao primeiro agente de selecção para células que expressem VP16; co-transfectar a célula que expressa a proteína transactivadora VP16 do vírus de herpes simplex com uma terceira e quarta construções, a terceira construção compreendendo o promotor do gene do vírus de herpes simplex operacionalmente ligado a um gene de interesse, a quarta construção compreendendo um gene de resistência de selecção a um segundo agente de selecção; seleccionar as células que são resistentes ao segundo agente de selecção; e rastrear as células que são resistentes ao segundo agente de selecção para a expressão do produto do gene do referido gene de interesse.

Outra forma de realização da invenção na qual uma linhagem de



células expressa um elevado nível de um produto de gene é fornecida. A linhagem de células compreende: uma primeira construção que origina com que a célula expresse a proteína transactivadora VP16 do vírus de herpes simplex; uma segunda construção compreendendo o promotor do gene IE do vírus de herpes simplex operacionalmente ligado a um gene de interesse; umas terceira e quarta construções cada uma compreendendo um gene de resistência de selecção a um antibiótico.

Na forma de realização acima descrita estão incluídos todos os tipos de promotores IE do vírus de herpes simplex, de preferência do vírus-1 simplex de herpes, de preferência IE175 (também conhecido como ICP4) ou IE110 (também conhecido como ICP0). As linhagens de células são de preferência derivadas de rim de hamster bebé (BHK-21) ou Ovários de hamster Chinês (CHO-DUKX-B11 ou DG44).

Tem-se a intenção de incluir na invenção todos os tipos de VP16 mas de preferência VP16 do vírus 1 simplex de herpes. O gene de VP16 e a proteína de HSV-2 são antecipados como funcionando tão bem como o gene de VP16 e a proteína de HSV-1 devido à forte similaridade na sequência de aminoácidos entre os dois (Greaves et al., Journal of Virology 65, pp. 6705-6713, 1991; Cress et al., Gene, 103, pp. 235-238, 1991).

O uso das linhagens de célula na descoberta de compostos que interferem com a transactivação dos promotores IE de HSV pela molécula VP16, é também intencionado. É previsível que uma linhagem de célula que segregue de forma estável uma proteína recombinante devido à transactivação de um promotor IE por VP16 possa ser incubada com produtos químicos ou naturais ou misturas não especificadas de produtos químicos ou naturais. Se a incubação da célula com estes compostos conduz a uma diminuição na quantidade de proteína



recombinante produzida pela célula, então o composto está potencialmente a actuar no passo de transactivação mediada por VP16 da expressão da proteína recombinante. Estes compostos serão então testados para ver se interferem com a expressão de uma proteína recombinante de uma linhagem de célula em cuja expressão não estava sob o controlo de VP16. Aqueles compostos que interferem com a expressão da transactivação mediada por VP16 e não com a expressão noutros sistemas são potenciais agentes anti-HSV.

É antecipado que linhagens de célula desenhadas para expressar VP16 serão úteis para a passagem e manutenção de mutantes de HSV que carece de VP16 funcional (Werstuck et al., Journal of Virology, vol. 64, pp. 984-991). O ADN de HSV que carece de um gene ou proteína VP16 funcional pode ser transfectado para uma linhagem de células que expresse VP16 a partir das construções de ADN integradas. A proteína VP16 irá transactivar os promotores IE do ADN de HSV conduzindo à produção de partículas de vírus. Mutantes de HSV que carecem de VP16 funcional podem ser candidatos promissores para uma estirpe de vacina.

A invenção tem a intenção de incluir linhagens de células quer a linhagem de células segregue ou não o produto do gene mas de preferência as linhagens de células que segreguem o produto do gene.

É uma finalidade da invenção fornecer um método de produção de uma linhagem de células para a expressão de elevados níveis de um produto de gene.

Outra finalidade da invenção é o fornecimento de linhagens de células que expressem um elevado nível de um produto de gene.



Ainda outra finalidade da invenção é o fornecimento ao conhecimento científico de linhagens de células que podem ser usadas para a produção em larga escala de qualquer produto de gene de interesse.

É ainda outra finalidade da presente invenção o fornecimento de um ensaio para descobrir compostos anti virais.

É uma vantagem da invenção o fornecimento ao conhecimento científico de linhagens de células estáveis que podem expressar um elevado nível de um produto de gene durante um período que excede os 5 meses.

É ainda outra vantagem desta invenção na qual é fornecido um método que permite isolar linhagens de células que produzem níveis de expressão mais elevados de um produto de gene por célula por dia mais depressa do que é conhecido na técnica e a linhagem de células é estável durante um período que excede 5 meses. Muitas outras finalidades e objectivos da invenção ficarão claros a partir das seguintes descrições da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 mostra a construção de um vector de expressão IE175. Este plasmídeo de expressão tem um único local BamH I entre as sequências do promotor e as sequências de poliadenilação tardias SV40.

A figura 2 mostra a construção de um vector de expressão IE110. Este plasmídeo de expressão tem um único local BamH I entre as sequências do promotor e o sinal de poliadenilação tardio SV40.



A figura 3 mostra a construção de um vector de expressão de repetição terminal longo (LTR) do vírus do tumor mamário de rato (MMTV). O sinal de poliadenilação SV40 está na orientação primitiva neste plasmídeo.

A figura 4 mostra as linhagens 34, 39, 47 e 49 de BHK/VP16/IE175-tPA que foram feitas passar a 1:20 a 1:40 (por volume) duas vezes por semana e analisadas quanto a produção de tPA.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS **DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS**

É uma descoberta da presente invenção que transfectantes estáveis de células de mamífero com ambos um gene que codifica uma proteína transactivadora (VP16) do vírus de herpes simplex e um promotor de gene (promotor IE) do vírus de herpes simplex ligado a um gene de interesse, podem expressar o gene de interesse a elevados níveis. De particular interesse é o facto de que o caminho específico para a construção das linhagens de células pode influenciar o resultado de formas inesperadas. Ao passo que as selecções envolvendo resistência a antibióticos em células CHO-DUKX-B11 mostraram ter maior sucesso, as selecções para a expressão para a di-hidrofolato reductase em células CHO-DUKX-B11 parecem ser adversas para a obtenção das desejadas linhagens de células altamente produtoras.

O transactivador do vírus de herpes simplex é de preferência a proteína viral tardia conhecida como VP16, VF65, Vmw65 ou alfa-T1F. O promotor alvo para a activação de VP16 é de preferência do gene IE175 (também conhecido como ICP4), do vírus de herpes simplex, embora o promotor IE110 (também conhecido como ICP0) também possa ser usado. As células BHK-21 ou os mutantes dhfr negativos de CHO tal como CHO-DUKX-B11 ou DG44, são



células de mamíferos preferidas para a prática desta invenção. Estas células são bem conhecidas pelos entendidos e estão amplamente disponíveis, por exemplo, na American Type Culture Collection, (A.T.C.C.) Rockville, MD. (BHK-21) ou em Dr. Lawrence Chasin, Columbia University, New York (CHO DUKX-B11 ou DG44). Estas células adaptam-se bem ao crescimento em suspensões de culturas e/ou podem crescer sob baixas concentrações de soro. Estas qualidades tornam-nas benéficas como estirpes para a produção em larga escala de produtos celulares (Bendig, Genetic Engineering, vol. 7, P. W. Rigby, ed., Academic Press, pp. 91-127, 1988).

De acordo com a presente invenção, as construções de ADN são usadas para cotransfectar linhagens de células. A cotransfecção envolve a introdução numa célula de pelo menos duas espécies de ADN distintas. Estas podem ser moléculas de ADN lineares ou circulares, segmentos moleculares virais ou plasmídicos doutras moléculas maiores. A transfecção pode ser consumada por qualquer meio conhecido pelos peritos. Os métodos preferidos incluem o procedimento do fosfato de cálcio (van der Eb et al., Methods in Enzymology, vol. 65, Gross and Moldave, eds., Academic Press, NY, 1980), e o uso do reagente "LIPOFECTIN"TM (GIBCO-BRL) de acordo com as instruções do fabricante. Outras técnicas tal como a electroporação são também apropriadas (Chu et al., Nucleic Acids Research, vol. 15, 1311-1326, 1987).

A expressão da proteína viral tardia, VP16, pode estar sob o controlo de qualquer promotor que seja conhecido pelos entendidos como sendo funcional para iniciar a transcrição em células de mamíferos, particularmente em células CHO dhfr negativas e células BHK-21. Promotores particularmente preferidos são o promotor primitivo SV40 e o MMTV LTR.

Genes de resistência a antibiótico de selecção incluem qualquer um



que possa funcionar marcas de selecção positivos em células de mamífero. Tipicamente estes são isolados a partir de bactérias ou leveduras. Um pré-requisito é que o antibiótico (ou um análogo do mesmo) mostre alguma actividade inibidora de crescimento relativamente a células de mamíferos. Por exemplo, o "GENETICIN"TM (GIBCO, Division of Life Technologies, Inc.) (que é o antibiótico G418) a higromicina-B (Blochliger et al., Molecular and Cellular Biology, vol. 4, pp. 2929-2931, 1984), a bleomicina-fleomicina (Mulsant et al., Somatic Cell Molecular Genetics, vol. 14, pp. 243-252, 1988) e a puromicina (de la Luna et al., Gene, vol. 62, pp. 121-126, 1988) são inibidores para o crescimento de células eucarióticas. Os genes de resistência devem estar sob o controlo de um promotor de mamífero apropriado de tal forma que sejam eficientemente expressos. De acordo com o método da presente invenção são usados dois antibióticos diferentes para consequentemente seleccionarem células CHO dhfr negativas ou células BHK-21 co-transfectadas. É necessário dizer que é usado um primeiro antibiótico para seleccionar candidatos de cotransfecção que expressem VP16 e deve ser usado um segundo antibiótico para seleccionar candidatos de cotransfecção que expressem o gene de interesse.

As células que sejam resistentes ao antibiótico de selecção são candidatos a co-transfectantes. É mais provável que uma célula que tenha recebido uma das construções de gene de resistência a antibiótico tenha recebido uma segunda construção de molécula do que uma célula que não tenha recebido a construção de gene de resistência a antibiótico. A análise para a segunda construção pode ser feita por qualquer meio conhecido dos entendidos. A produção de um produto codificado pela segunda construção pode ser determinada por vários ensaios de imunidade (Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, pp. 553-612, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988), tal como um ELISA, por ensaio enzimático ou outros métodos padrão.



É de prever que outros tipos de agentes de selecção além dos antibióticos possam também ser usados [(MacDonald, Critical Reviews in Biotechnology, Vol. 10, pp. 155-178, 1990), aqui incorporado por referência]. No entanto, os agentes de selecção preferidos são os antibióticos. É também preferido que a construção de ADN que codifica o gene de resistência a antibiótico seja introduzida por cotransfecção na célula de mamífero mas também se tem a intenção que o gene de resistência a antibiótico, sob um promotor eucariótico apropriado, possa ser ligado ao promotor IE ou construções VP16 de tal forma que a cotransfecção não seja necessária. Tal pode ser consumado recorrendo a técnicas de ADN recombinante de rotina.

De acordo com uma forma de realização preferida da invenção, uma construção de ADN codifica VP16 de vírus de herpes simplex. Os candidatos a co-transfectantes podem ser rastreados quanto à produção de VP16 por Western blotting com anti-soros anti-VP16. Tal como é do conhecimento dos peritos podem também ser usados outros métodos e são descritos em baixo.

Qualquer gene de interesse pode ser colocado sob o controlo do promotor IE175 ou IE110 do gene de HSV. Se o gene for colocado a jusante do promotor sem intervenção de sinais de terminação de transcrição diz-se que o gene está operacionalmente ligado ao promotor, e será transcrito quando a transcrição for iniciada no promotor.

Elevados níveis de transcrição do gene de interesse é um objectivo desejado da invenção. Esta é uma expressão que é aumentada para além dos níveis que são obtidos na ausência de VP16 ou dum promotor de aumento de VP16. É desejável recuperar tantos transfectantes de expressão de elevados níveis quanto possível. Estes podem ser subsequentemente sujeitos a mutação, seleccionados, desenhados ou tratados com compostos para aumentar ainda mais



a expressão. Por exemplo, se as construções de expressão foram co-transfectadas com um gene de tal forma que seja possível a amplificação do ADN transfectado, podem ser obtidos maiores níveis de expressão (MacDonald, supra). Tal amplificação conduz frequentemente a expressão excessiva de genes que foram co-amplificados.

É possível que se possa mutar a região codificante de VP16 de tal forma que a sequência de nucleótidos seja alterada mas a sequência de aminoácidos mantenha-se idêntica (devido à degenerescência do código genético). É também possível que sejam feitas deleções ou substituições na sequência de aminoácidos de VP16 e a VP16 mantenha actividade funcional. Assim, a invenção tem a intenção de incluir todas as formas funcionais do gene e proteína VP16 e derivados dos mesmos.

Nos promotores IE de HSV é sabido que a sequência de nucleótidos (TAATGARAT R=purina) é necessária para uma transactivação funcional dos genes de IE pela VP16. É de prever que um promotor contendo somente TAATGARAT, e não o resto da sequência de um promotor IE possa ainda ser transactivado. Os alvos principais de VP16 são os promotores IE de HSV-1 ou 2; de preferência os promotores IE-175 ou IE-110. No entanto, tem-se a intenção de incluir no âmbito da invenção outros promotores, naturais ou sintéticos, que respondam a VP16.

Sem elaborações adicionais, crê-se que os entendidos possam, usando a descrição precedente, utilizar a presente invenção até aos seus limites. A seguintes formas de realização específicas preferidas são, portanto, para ser interpretadas como meramente ilustrativas e não limitativas ao resto da divulgação em absolutamente caso algum.



Os seguintes exemplos são fornecidos para ilustrar a presente invenção e não têm a intenção de limitar o âmbito da mesma. Os entendidos na matéria irão prontamente compreender que variações conhecidas das condições e processos dos seguintes procedimentos preparativos podem ser usados para preparar estas linhagens de células.

Linhagens de Células

A linhagem de células (CHO-DUKX-B11) de ovários de hamster chinês (CHO) foi obtida de L. Chasin (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 77, pp. 4216-4220, 1980) e cultivadas em Ham F12 contendo 5% de soro de bovino fetal (JHR Biosciences) e L-glutamina 2mM (JHR Biosciences). Esta formulação é designada meio de crescimento CHO.

A linhagem de células BHK-21 foi obtida de A.T.C.C. (Rockville, MD). As células BHK-21 foram normalmente cultivadas em meio Dulbecco modificado Eagle (DMEM), de alto teor em glucose (JRH Biosciences, Lenexa, KS) suplementado com L-glutamina 2 mM e 10% de soro de vitelo (GIBCO-BRL, Grand Island, NY) e 100 unidades de streptomicina e 100 microgramas (μ g) de penicilina por mililitro. Esta formulação é designada por meio de crescimento BHK-21. Para isolar a BHK/VP16, foi usado 10% de soro bovino fetal extraído com carvão vegetal (Danesch et al., EMBO J. vol. 6, pp. 625-630, 1987) em vez de soro de vitelo. As células BHK-21 transfectadas com pSV2neo (A.T.C.C.) e/ou pMON1118 (Highkin et al., Poultry Science, vol. 70, pp. 970-981, 1991) foram cultivadas em meio suplementado com "GENETICIN"TM (400 μ g/ml) e/ou higromicina B (Calbiochem, San Diego, CA) (453 unidades/ml), respectivamente. Estes meios são designados meios selectivos. As concentrações de "GENETICIN"TM são dadas em força activa. O pMON1118 (Highkin et al., supra) expressa o gene de resistência a higromicina B do promotor SV40. Está



disponível um plasmídeo similar em A.T.C.C., pSV2-hph. Os plasmídeos que expressam o gene dhfr, tal como o SV2-dhfr também estão disponíveis em A.T.C.C. assim como o pSV2neo.

Construções

A digestão por enzimas de restrição e outras técnicas de clonagem molecular tal como o preenchimento das extremidades dos fragmentos de restrição 5' pendentes foram realizadas de acordo com Maniatis et al., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Os vectores foram tratados com fosfatase alcalina de intestino de vitelo (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) antes da ligação usando a ADN ligase T4 (Boehringer Mannheim or Biolabs, Beverly, MA). Os fragmentos de restrição foram isolados de géis de agarose a 1% por electroeluição em DEAE celulose (aparelho de D-Gel, Kontes Scientific Glassware/Instruments, Vineland, NJ).

Um vector de expressão contendo uma porção da região (-380 até +26) do promotor IE175 foi construído em vários passos (Figura 1). O plasmídeo pPOH23 (O'Hare et al., J. Vir., vol. 61, pp. 190-199, 1987) que contém a região do promotor IE175 desde -108 até +26 (relativamente ao início da transcrição) foi digerido com *EcoRI* e *BamHI*. O fragmento de 134 pares de bases que contém a região do promotor -108 até +26 foi subclonado no local *BamHI* de pMON3327 (Highkin et al., supra) que é um derivado de pUC18 contendo o sinal de poliadenilação SV40 (nucleótidos 2533 até 2770 do genoma do vírus SV40). O novo plasmídeo é chamado IE 175/polyA -108 até +26. Para isolar as restantes sequências da porção da região do promotor IE 175 de HSV acima descrito, o pPOH13 (O'Hare, supra) que contém a região do promotor IE175 desde -380 até +26 foi digerido com *EcoRI* e o fragmento de 301 pares de bases foi ligado ao local *EcoRI* de IE175/polyA -108 até +26. O novo plasmídeo tem a região -380



até +26 do promotor IE175 a montante de um único local *Bam*HI que é seguida por uma porção da região de poliadenilação tardia SV40 e é designado por IE175/polyA.

Um vector de expressão contendo a região do promotor IE110 foi construído como se segue. A região do promotor IE110 (-800 até +120) de HSV e uma pequena quantidade de sequência de pBR322 foi isolada de pGH83 (Roberts et al., *J. Vir.*, vol. 62, pp. 4307-4320, 1988) por digestão com *Eco*RI e *Bam*HI. O fragmento de 951 pares de bases foi isolado e ligado ao pMON3327 que foi digerido com *Eco*RI e *Bam*HI (Figura 2). O novo plasmídeo é chamado IE-110/polyA.

Um vector contendo a repetição terminal longa do vírus do tumor mamário de rato (MMTV LTR) foi construído isolando as sequências MMTV de 1,4 kbp de p201 (A.T.C.C.) por digestão com *Pst*I e ligação ao pMON3327 digerido com *Pst*I. Este novo vector é designado por MMTV/polyA (Figura3).

As sequências codificantes de VP16 foram isoladas a partir de pGH62 (ApRhys et al., *Journal of Virology*, 63, pp. 2797-2812, 1989) pela reacção da polimerase em cadeia (PCR) usando os procedimentos do fabricante usando o Estojo de Amplificação de Reagentes de ADN "GENEAMP"TM (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) e a polimerase Taq recombinante "AMPLITAQ"TM (Perkin Elmer Cetus). Este plasmídeo contém o fragmento *Bam*HI de 4,7 quilo par de bases (Kbp) de HSV-1 (estirpe MP). A sequência de VP16 está na base de dados do GenBank, número de acesso X03141, O iniciador 5' tem a sequência 5'-GATCGGATCCAACCCCAACCAATGGACCTC-3' (SEQ ID NO:1). Este iniciador incorpora um local *Bam*HI (GGATCC) na extremidade 5' do produto de PCR. A metionina iniciadora está sublinhada. O iniciador antisentido 3' tem a sequência 5'-GATCGGATCCGCGCCCCCTACCCACC-3' (SEQ ID NO:2).



Este iniciador incorpora um local *Bam*HI na extremidade 3' do produto de PCR. O códon de terminação está sublinhado como um ponto de referência. A região codificante de VP16 está também disponível no plasmídeo pMSVP16 (Novagen, Inc., Madison, WI). O produto de PCR foi subclonado no pUC18 que foi digerido com *Bam*HI. O gene VP16 em pUC18 foi isolado por digestão com *Bam*HI e as extremidades pendentes 5' foram preenchidas usando a polimerase Klenow antes da ligação a MMTV/polyA que foi previamente digerida com *Sal*I e tratada com polimerase Klenow. Este vector VP16 é designado por MMTV-VP16.

O plasmídeo pCA21 (obtido de G. Hayward, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD) tem a região codificante de VP16 sob controlo do promotor primitivo do vírus SV40. Um plasmídeo similar pode ser construído por remoção da região codificante de VP16 de pMSVP16 (Novagen, Madison, WI) e inserção no plasmídeo pSVK3 (Pharmacia LKB Biothechnology, Piscataway, NJ) por técnicas conhecidas da especialidade (Maniats et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, 1982) de tal forma que a região codificante de VP16 fique sob controlo do promotor primitivo de SV40.

Western Blot

As células foram lavadas com fosfato salino tamponizado (PBS) (disponível em GIBCO-BRL), colhidas por raspagem em 1 ml de PBS e peletizadas num micrófugo durante 3 minutos. As células foram lisadas em 100 microlitros de 1,5× tampão amostra (3× = Tris-HCL 7,5 mM, pH 6,8, glicerol a 30%, SDS a 4%, EDTA 1,5 mM, 400 microgramas/ml de bromofenol azul e ditioltreitol 60 mM), aquecidas a 70°C durante 10 minutos e fervidas durante 3 minutos. Os detritos foram peletizados antes do carregamento de 10 a 20 microlitros do sobrenadante em minigéis SDS-PAGE a 10% (Daiichi, Integrated Separation Systems, Hyde Park, MA). Após a electroforese, as proteínas foram



transferidas para immobilon-P (Integrated Separation Systems) usando uma pasta semi-seca (Janssen, JKA-Biothech, Denmark). A seguir à transferência, os restantes locais de ligação não ligados da membrana foram ligados por incubação com solução bloqueante (geletin a 0,25%, Tris-HCL 100 mM, pH 9,0) durante a noite à temperatura ambiente. A solução bloqueante foi removida e a membrana foi incubada em tampão NET (NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Tri-HCL 50 mM, pH 7,5) mais a gelatina a 0,25% e NP40 a 0,05% contendo anti-soro de coelho (diluição 1:2000) e feita crescer contra um péptido de terminação carboxilo de VP16 (aminoácidos 477-490) a 37°C durante 2 horas. A membrana foi lavada com tampão NET/gelatin/NP40 menos o antisoro à temperatura ambiente durante 1 hora e incubada com tampão NET/gelatin/NP40 contendo 0,3 mCi/ml de ¹²⁵I-Proteína A (Amersham, Arlington Heights, IL, 0,1 mCi/microlitro) durante 1 hora à temperatura ambiente. O isótopo foi removido por lavagem em NET com elevado teor de sal (NaCl 1 M) contendo sarcosil a 0,4%. Após enxaguar com água e ar de secagem, as manchas foram expostas a filme de raio X "KODAK, X-OMAT ARTM" usando um filtro de reforço de negativo "DUPONT LIGHTNING PLUSTM".

Condições de Transfecção Estáveis

As células foram germinadas em placas de cultura de tecidos de 60 mm a 2 a 3 x 10⁵ células por placa, 24 horas antes da transfecção. As células foram transfectadas quer pelo procedimento de CaPO₄ (van der Eb et al., Methods in Enzymology, vol. 65, Grossman and Moldave, eds. Academic Press, NY, 1980) seguido por choque com glicerol quatro horas após a transfecção (Frost et al., Virology, vol. 91, pp. 539-560, 1978) ou por uso do reagente "LIPOFECTIN"TM (GIBCO-BRL) de acordo com as recomendações do fabricante e usando 40 µg do reagente "LIPOFECTIN"TM em 3,0 ml de "OPTIMEM"TM/beta-mercaptoetanol (GIBCO-BRL) por placa de 60 mm de



células. O meio de transfecção foi aspirado 6 horas depois e substituído com meio de crescimento. As células foram transferidas, após 2 dias, para 5 a 10 placas de 100 mm e foi fornecido meio selectivo. As colónias resistentes a antibiótico foram isoladas 2 a 3 semanas depois e transferidas para placas de 24 cavidades de aglomerados de tecido. Quando as cavidades estavam 50 a 100% confluentes, o sobrenadante foi rastreado para o produto do gene de interesse. As linhagens positivas foram expandidas e designadas como linhagens produtoras.

Análises Padrão para Determinar a Produção de tPA e bGH

As linhagens produtoras foram semeadas em duas cavidades de uma placa de 6 cavidades de aglomerado de tecido a $2,5$ a $5,0 \times 10^5$ células por cavidade e fornecido 3 ml de meio de crescimento (sem a presença de agentes de selecção). No dia seguinte o meio foi substituído com 3 ml de meio fresco e 24 horas depois, alíquotas duplicados de sobrenadante foram recolhidos e armazenados a -20°C até serem analisados. A contagem final das células foi determinada e a produção de proteína foi normalizada para microgramas de proteína produzida por 24 horas por 1×10^6 células.

Exemplo 1

Geração de Linhagens de Células Estáveis que Expressem VP16 em Células BHK-21 e Subsequente Expressão de tPA e bGH

As células BHK-21 que foram co-transfectadas com MMTV-VP16 (20 μg) e pSV2neo (2 μg) foram seleccionadas quanto à resistência a "GENETICIN"TM e foram isoladas 34 linhagens de células. As linhagens foram primeiro rastreadas por Western blot usando antisoro de coelho feito crescer contra a terminação carboxilo peptídica de VP16 (aminoácidos 477-490). Uma



linhagem, #2, tinha uma banda fraca na Western blot que co-migrava com VP16 (dados não mostrados). A linhagem #2, juntamente com 5 outras linhagens putativas positivas, foi adicionalmente testada por transfecção transiente com 5 μ g de IE175-CAT (pPOH13). Um plasmídeo similar, o pICP4CAT, está disponível em Novagen Inc. (Madison, WI). No dia seguinte à transfecção, o meio de crescimento foi trocado por meio suplementado com dexametasona 1 μ M (Sigma, St. Louis, MO). No dia seguinte, as células foram colhidas e analisadas quanto à actividade CAT (Neumann et al., BioTechniques, vol.5, pp. 444-447, 1987). Para identificar uma linhagem de células expressora de VP16, a actividade CAT nas linhagens putativas positivas foi comparada com a actividade CAT observada na BHK-21 progenitora. A linhagem #2 tinha um aumento de 12 vezes na actividade CAT quando comparada com o controlo BHK progenitor e foi designada BHK/VP16 (dados não mostrados). Embora o Western blotting fosse o método para isolar a linhagem BHK/VP16, um método preferido pode ser um ensaio funcional usando uma construção IE175-beta-galactosidase (B-gal). O gene B-gal de *E. coli* (GenBank número de acesso V00296) foi isolado como um fragmento *Bam*HI (aproximadamente 3,3 Kbp) a partir de um plasmídeo que contém o gene sob controlo do promotor prolactina de ratazana. Cassetes B-gal similares estão disponíveis comercialmente (Promega, Madison, WI; Pharmacia-LKB, Pistaway, NJ). O fragmento *Bam*HI foi subclonado no IE175/polyA para formar o IE175-B-gal. As linhagens de células foram rastreadas quanto à actividade de VP16 como se segue. As células foram semeadas a aproximadamente 1×10^4 células por cavidade de um placa com 48 cavidades de aglomerado de tecido e foram transfectadas com IE175-B-gal usando o reagente "LIPOFECTIN"TM. Aproximadamente 40 horas depois, as células foram lisadas *in situ* pela adição de 0,5% de NP40 em solução salina Hank tamponizada (GIBCO-BRL), contendo O-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido (ONPG, Sigma) de acordo com Lim et al. (BioTechniques, vol. 7, pp. 576-579, 1989). Após 60 minutos, uma amostra de 200 microlitros foi transferida para uma cavidade de



uma placa com 96 cavidades de aglomerados de tecido. A placa com 96 cavidades foi centrifugada (Beckman JS 5,2 rotor, 500xg, 10 minutos) e 100 microlitros foram transferidos para cada cavidade de uma nova placa com 96 cavidades de aglomerado de tecido. A densidade óptica a 410 nm foi determinada usando um leitor de placa (Dynatech, MR600). A quantidade de proteína foi determinada por análise de 20 microlitros do lisado em 200 microlitros do reagente de proteína BCA (Pierce, Rockford, Ill).

O cADN ativador de plasminogênio de tecido humano (tPA) foi modificado por mutagenese local dirigida para truncar as regiões não codificantes 5' e 3' e para colocar locais únicos *Bam*HI nas extremidades. O cADN modificado contém 19 pares de bases de sequência 5' não traduzida e termina 4 pares de bases após o códon de terminação resultando num fragmento de 1,7 Kbp. Este fragmento foi digerido com *Bam*HI e ligado ao local *Bam*HI de IE175/polyA para formar o plasmídeo IE175-tPA e ao local *Bam*HI de IE110/polyA para formar o plasmídeo IE110-tPA.

A linhagem de células BHK/VP16 foi usada para desenhar três conjuntos de linhagens de células produtoras de elevados níveis de proteína. O primeiro conjunto foi obtido por cotransfecção de BHK/VP16 com os plasmídeos IE175-tPA (20 µg) e pMON1118 (2 µg). Cinquenta e cinco linhagens de células, resistentes a "GENETICIN"TM e higromicina B foram isoladas e rastreadas quanto à produção de tPA e 41 mostraram-se positivas.

O ativador de plasminogênio de tecido (tPA) foi analisado no meio condicionado de linhagens de células transfectadas pela imun análise por fluorescência de concentração de partículas (PFCIA) (Jolly et al., Journal of Immunological Methods, 67, pp. 21-35, 1985). Placas de análise Epicon, Analisador de Concentração de Partículas (PCA) e partículas de polistireno foram



adquiridas de IDEXX Laboratories, Inc. (Westbrook, Maine). tPA humano purificado e anticorpos de tPA anti-humano de cabra foram obtidos de American Diagnostica Inc. (Greenwich, CT). Os reagentes foram preparados de acordo com os protocolos dos fornecedores e a PFCIA básica foi estabelecida de acordo com os protocolos do fabricante. Brevemente, as partículas de polistireno foram revestidas com os anticorpos anti-tPA de cabra para capturar tPA no meio condicionado. As amostras de meio condicionado foram incubadas com as partículas de polistireno de anti-tPA de cabra e com anticorpos anti-tPA de cabra marcados com fluoresceína. Após 30 minutos, formou-se um complexo nas partículas de polistireno. O complexo foi lavado e a quantidade de fluorescência foi quantificada pela PCR. Os anticorpos foram marcados com fluoresceína usando isotiocianato de fluoresceína (Sigma, St. Louis, MO). Uma alternativa aproximada é adquirir um estojo de ensaio imuno-sorbente ligada a enzima (ELISA) para tPA da American Diagnostica.

As 16 linhagens de células mais produtoras da análise inicial foram testadas para a produção de tPA sob condições padrão. Nove linhagens mostraram-se positivas com 5 linhagens produzindo concentrações de tPA além de $1\mu\text{g}/10^6$ células /24 horas (Tabela 1). Como controlo, as células BHK-21 que não expressam VP16 e foram co-transfectadas com IE175-tPA e pMON1118 foram rastreadas quanto à produção de tPA. De 64 linhagens resistentes a higromicina, 41 foram positivas para a produção de tPA na análise inicial. Quinze linhagens foram reanalisadas sob condições padrão e 6 foram positivas para tPA. Os níveis de produção de tPA variaram de 0,007 μg até 0,176 $\mu\text{g}/10^6$ células/24 horas (Tabela 1).

Para determinar se os elevados níveis de produção de proteína estavam limitados somente ao promotor IE175, foi desenhado um segundo conjunto de linhagem de células por cotransfecção da linhagem transactivadora,



BHK/VP16, com IE110-tPA e pMON1118. Catorze das 19 linhagens "GENETICIN"TM/higromicina isoladas foram positivas para a produção de tPA. Destas 14 linhagens, 3 linhagens produziram elevados níveis de tPA com os níveis variando entre 4 a 21 $\mu\text{g}/10^6$ células /24 horas (Tabela 1). Para determinar os níveis de produção de tPA na ausência do transativador VP16, células BHK-21 progenitoras foram transfectadas com IE110-tPA e pMON1118. Dezoito linhagens resistentes a higromicina foram rastreadas quanto à produção de tPA. As três linhagens mais produtoras produziram 0,014 a 0,08 μg tPA/ 10^6 células /24 horas (Tabela 1). Esta experiência demonstra que o elevado nível de expressão de tPA estável pelas células BHK-21 na presença da expressão de VP16 não está limitada à transativação do promotor IE175 mas, estende-se também a outros promotores IE de HSV.

Com vista a mostrar que o elevado nível de produção de proteína não era uma função própria da molécula de tPA, foi realizada uma terceira série de experiências usando o gene da hormona de crescimento bovino (bGH).

O gene bGH genómico (GenBank número de acesso J00008) foi obtido do pBR-bGH (Ramabhadran et al., Gene 38, pp. 111-118, 1985) por PCR. O iniciador 5' liga cerca de 60 pares de bases a montante do códon de iniciação e tem a sequência 5'-GACCAATTCCAGGATCCCAGGACCCAGT-3' (SEQ ID NO:3) e contém um local *Bam*HI natural. O iniciador antisense 3' termina cerca de 20 pares de bases a juzante do códon de terminação e contém um local *Bam*HI desenhado. Este iniciador tem a sequência 5'-GATCGGTACCGCAAACA-ACAGATGGCTGGCAACTAGA-3' (SEQ ID NO:4). O produto de PCR (aproximadamente 1,7 kbp) foi digerido com *Bam*H e inserido no local *Bam*HI do plasmídeo IE175/polyA para formar o IE175-bGH.

A linhagem transactivadora, BHK/VP16 foi co-transfectada com



IE175/bGH (20 μ g) e pMON1118 (2 μ g). Quarenta e duas linhagens resistentes a "GENETICIN"TM/higromicina foram rastreadas quanto à produção de bGH. Quarenta destas linhagens foram positivas para o bGH no meio condicionado. O ensaio para a detecção de bGH foi uma PCFIA tal como foi o ensaio tPA (ver acima). Neste caso, foram usados dois anticorpos monoclonais diferentes purificados por afinidade. Um anticorpo foi usado para revestir as pérolas e o outro foi marcado com fluoresceína e usado para detectar o bGH capturado nas gotas. BGH biologicamente activo foi purificado a partir de *E. coli* e usado como o padrão. Ensaio padrão de 15 linhagens positivas mostraram que elas estavam produzindo 3 a 19 μ g bGH/ 10^6 células/24 horas (Tabela 1). Como controlo, células BHK-21 progenitoras foram co-transfectadas com IE175-bGH e pMON1118. Cinquenta e três linhagens resistentes a higromicina foram rastreadas quanto à produção de bGH e 50 mostraram-se positivas. Ensaio padrão de 19 das linhagens mais produtoras identificadas na análise mostraram que elas produziram desde 0,33 até 5 μ g bGH/ 10^6 células/24 horas. Este resultado foi surpreendente visto que os valores previstos pelas experiências com IE175-tPA e IE110-tPA foram $<0,3$ μ g tPA/ 10^6 células /24 horas. No entanto, a quantidade de bGH produzida a partir da linhagem do transactivador VP16 foi várias vezes superior, em média, do que a partir da linhagem BHK-21 progenitora. No entanto, a bGH pode não ser uma proteína de marca representativa porque parece haver um elevado nível de produção constitutiva noutros sistemas na ausência de indução (G. Hayward, comunicação pessoal).

Assim, o sistema de expressão mamífero acoplado com o transactivador VP16 pode ser usado para o eficiente isolamento de linhagens de células que produzem grandes quantidades de proteína utilizando os promotores IE110 ou IE175. Isto implica que as regiões do promotor de outros genes primitivos imediatos de HSV-1 ou HSV-2 são também bons alvos para o desenho de vectores acoplados com transactivação.

Estabilidade de Expressão

As linhagens de células que estiveram durante mais tempo em cultura contínua são aquelas geradas por cotransfecção de IE175-tPA e pMON1118 na linhagem BHK/VP16 (Figura 4). O ensaio padrão inicial na terceira passagem mostrou níveis de expressão inferiores a $10 \mu\text{g tPA}/10^6$ células/24 horas para todas as quatro linhagens. Por volta da passagem 6, observou-se um surpreendente aumento na produção de tPA em três das linhagens com níveis variando desde 27 a $44 \mu\text{g}/10^6$ células/24 horas. Os níveis de tPA após a passagem 6 diminuíram para estas três linhagens, e pareceram estabilizar em cerca de 10 a $15 \mu\text{g}/10^6$ células/24 horas. Para uma quarta linhagem, #34, que não mostrou um grande aumento na produção de tPA na passagem 6, os níveis pareceram ser mais consistentes ao longo do tempo. O nível de produção de tPA permaneceu na gama de 5 a $20 \mu\text{g}/10^6$ células/24 horas tal como medido por PFCIA durante aproximadamente 52 passagens. Cada passagem representa 3 a 5 duplicações da população por semana. Os níveis de tPA foram verificados pelo ensaio amidolítico (T.C. Wun, dados não mostrados) como descrito em baixo. Partes alíquotas do meio condicionado de tPA foram diluídos em NH_4HCO_3 1 M mais 1 mg/ml de BSA. A 20 microlitros da amostra de tPA diluído numa cuveta disponível foi adicionado 0,225 ml de Tris/HCl 0,1 M, pH 8,7, mais Triton X-100 0,5%. A mistura foi incubada a 37°C durante 3 minutos. Cinco microlitros de meio condicionado foram adicionados e foi medida a alteração de absorvância a 405 nm num espectrofotometro Gilford. A actividade padrão da cadeia simples de tPA (American Diagnostica product #115) dissolvido em NH_4HCO_3 1M mais 1 mg/ml de BSA foi usado como referência.



EXEMPLO 2

Factor de Permeabilidade Vascular (VPF)

ADN complementar (cADN) contendo a região codificante de VPF foi inicialmente isolado a partir de uma biblioteca de células U937 induzidas por éster de forbol como descrito (Keck et al., Science 246, pp. 1309-1312, 1989). O cADN codifica uma proteína de 189 aminoácidos e é designada VPF189 [EMBL/GenBank número de acesso X15997 ou M27281]. Usando tecnologia PCR duas outras formas de cADN de VPF foram isoladas. Uma forma codifica uma proteína de 165 aminoácidos que é idêntica a VPF189 excepto que os aminoácidos 116 a 138 estão eliminados devido à ligação alternada e é designado VPF165. Outra forma codifica uma proteína de 121 aminoácidos e é idêntica a VPF189 excepto que os aminoácidos 116 a 158 foram eliminados devido à ligação alternada e é designado VPF121.

Todos os cADN de VPF acima (VPF189, VPF165, e VPF121) foram subclonados no local *Bam*HI de IE175/polyA. Adicionalmente, os três cADNs de VPF foram subclonados num vector do papilomavírus bovino (BPV), pMON1123, sob o controlo do promotor metalotioneína de rato (Keck et al., supra). Finalmente, os três cADNs de VPF foram subclonados sob o controlo do promotor de repetição terminal longo do vírus de sarcoma de Rous (RSV LTR) num plasmídeo que também contém uma cassette de expressão SV2-dhfr. Os plasmídeos de expressão IE175/polyA derivados de VPF foram co-transfectados com pMON1118 na linhagem transactivadora BHK/VP16, como acima descrito. Os plasmídeos de expressão BPV derivados de VPF foram co-transfectados em células C127 de rato (A.T.C.C.) com SV2neo e seleccionados para resistência a "GENETICIN"TM. Os plasmídeos de expressão RSV LTR/SV2-dhfr derivados de VPF foram transfectados em células CHO-DUKX-B11 e seleccionados para a



expressão de DHFR (Kaufman, Methods in Enzymology, vol. 185, D. V. Goeddel, ed., Academic Press, New York, pp. 537-566, 1990). Linhagens de células de cada um dos conjuntos de transfecção acima foram isoladas usando o método de selecção apropriado e foi testado meio condicionado das linhagens para a presença de VPF, originalmente usando o ensaio de Miles (Connoly et al., Journal of Biological Chemistry vol. 264, pp. 20017-20024, 1989) mas de preferência pelo ensaio imuno-sorbente ligado a enzima (ELISA) (Harlow et al., supra) como se segue.

IgG anti-VPF de cabra foi ligada a um placa de microtitulação de cloreto de polivinilo incubando cada cavidade com 50 microlitros de uma solução de 20 µg/ml do anticorpo diluído em PBS durante 2 a 3 horas à temperatura ambiente. A solução do anticorpo foi removida e as cavidades foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente com leite seco isento de gordura (caseína) a 1% diluído em PBS para bloquear quaisquer locais que não tivessem sido ligados. As cavidades foram lavadas quatro vezes com NaCl 0,15 M contendo Tween 20 a 20% (Sigma). O meio condicionado foi adicionado às cavidades e incubou-se durante a noite à temperatura ambiente. As cavidades foram lavadas quatro vezes com a solução NaCl/Tween 20. 50 microlitros de 2,5 µg/ml de IgG anti-VPF de cabra biotinilada foi adicionada e incubada durante 2 a 3 horas à temperatura ambiente. As cavidades foram lavadas quatro vezes com e uma parte alíquota de 50 microlitros de uma diluição de 1/1600 de uma solução de estreptavidina peroxidase de rábano silvestre (KPL, Gaithersburg, MD) foi adicionada durante 90 minutos à temperatura ambiente. As cavidades foram lavadas e 100 microlitros de substracto de peroxidase de rábão foi adicionado e analisado segundo as instruções do fabricante. As concentrações de VPF foram determinadas a partir de uma curva padrão usando VPF derivado de células U937 diluídas em PBS contendo Tween 20 a 0,05% e leite seco isento de gordura a 1%. A Tabela 2 mostra que a linhagem BHK/VP16 foi tão eficiente na produção



das três formas de VPF quanto as células C127, uma linhagem na qual o vector BPV é tipicamente amplificado desde 10 a 200 cópias por célula (Stephens et al., Biochemical Journal 248, pp. 1-11, 1987) e muito mais eficiente que o sistema CHO-DUKX-B11 antes da amplificação. Além disso, as células BHK-21 não têm a desvantagem que as células C127 têm durante o scale up (McKillip et al., Bio/Technology 9, pp. 805-810, 1991). A produção de VPF189 foi baixa (<0,1 µg/ml) em todos os sistemas de células testadas devido à degradação da proteína no meio (dados não mostrados). Os níveis do mRNA de VPF189 nas células foi tão elevado quanto os níveis de VPF165 e VPF121 nas respectivas linhagens de células (dados não mostrados) indicando que o nível de transactivação não é responsável pelo aparente decréscimo na produção da proteína VPF189.

EXEMPLO 3

Molécula de Adesão Intercelular Humana (ICAM)

Um cADN (GenBank com número de acesso J03132) que codifica os amino-terminais de domínio extracelular, o domínio da transmembrana e o domínio intracelular dos carboxilos terminais de ICAM foi isolado por PCR como se segue. Foi usado RNA de célula SK-Hepatoma (A.T.C.C.) como padrão para iniciar especificamente a síntese da primeira cadeia usando um iniciador 3' antisense 5'-GCTAGGATCCCGGGATAGGTTTCAGGGAGGCG-3' (SEQ ID NO:5) que é complementar aos nucleótidos 1646 a 1669 do cADN de ICAM. Os 20 microlitros da reacção continham 10 µg de RNA, 20 picomoles de iniciador, 20 unidades de "RNASIN"TM (Promega, Madison, Wisconsin), dNTPs 2,5 mM e 200 unidades de transcriptase reversa. A síntese foi levada a cabo a 37°C durante 30 minutos e em seguida imediatamente usada para amplificação usando PCR segundo as indicações do fabricante. O iniciador 5' tem a sequência 5'-GATCGGATCCTCAGCCTCGCTATGGCTCCC-3' SEQ ID NO:6) e é



complementar aos nucleótidos 45 a 66 do cADN de ICAM (Staunton et al., Cell, 52, pp. 925-933, 1988). Adicionalmente, o iniciador inclui um local de restrição *Bam*HI (GGATCC) desenhado. O fragmento resultante de cerca de 1,6 kbp foi usado como padrão para a subsequente reacção de PCR usando o mesmo iniciador 5' e um novo iniciador 3' antisenso de tal forma que o iniciador 3' conduziu ao truncamento da molécula no aminoácido 453 excluindo desse modo os domínios transmembranares e citoplasmáticos da molécula (Marlin et al., Nature 344, pp. 70-72, 1990). A sequência do segundo iniciador 3' antisenso foi 5'-GATCGATCATGGATCCCTCATACCGGGGGGAGAG-3' (SEQ ID NO:7) e é complementar aos nucleótidos 1480 a 1497 do cADN de ICAM e introduz um local *Bam*HI imediatamente a 3' no códon do ácido glutâmico (aminoácido 435). O plasmídeo IE175/polyA foi modificado por digestão com *Bam*HI e ligado a um fragmento de ADN contendo um local *Bam*HI na extremidade 5', uma sequência contendo um decapeptídeo (YPTDVPDYAS) (Huse et al., Science, 246, pp. 1275-1281, 1989, código de letras individual), um códon de terminação e um local *Bgl*II na extremidade 3'. Este fragmento foi gerado por ligação de dois oligonucleótidos, 5'-GATCCTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTTCTTAAGAGCTC-3' (SEQ ID NO: 8) e 5'- GATCGAGCTCTTAAGAAGCGTAGTCCGGAACGT-CGTACGGGTAG-3' (SEQ ID NO: 9). Este plasmídeo IE175/polyA modificado foi designado como IE175/deca-polyA e foi digerido com *Bam*HI e ligado ao fragmento de cADN de ICAM truncado que também foi digerido com *Bam*HI resultando no plasmídeo IE175-sICAM₄₅₃-deca-polyA. O vector de expressão sICAM₄₅₃, foi co-transfectado na linhagem BHK/VP16 com o pMON1118 como descrito e produtores de elevados níveis de sICAM₄₅₃-decapeptídeo foram seleccionados. As linhagens de células resistentes a "GENETICIN"TM/higromicina B foram rastreadas quanto à expressão de sICAM₄₅₃-decapeptídeo por análise da porção de decapeptídeo da proteína de fusão por análises de imunotransferência. Em atingindo a confluência, as células foram incubadas em soro livre DMEM durante 24 horas. Uma parte alíquota de



100 microlitros de meio condicionado foi recolhido e filtrado para um papel de filtro de nitrocelulose usando um aparelho "slot blot" de vários compartimento (Schleicher e Schuell). A nitrocelulose foi então sondada com anti-soros policlonais de coelho feitos crescer contra o decapeptido (Huse et al supra) como se segue. A nitrocelulose foi incubada durante 1 hora a 37°C numa solução a 5% de albumina de soro bovino (BSA) em tampão TNT (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, Tween 20 a 0,05%) para bloquear locais de ligação ao anticorpo não específicos. A seguir à lavagem com tampão TNT, o papel de nitrocelulose foi incubado com o anticorpo anti-decapeptido de coelho a uma diluição de 1:4000 em BSA/TNT a 1% durante 1,5 horas à temperatura ambiente. O anticorpo não ligado foi removido por três lavagens de 20 minutos do papel em tampão TNT. O anticorpo de coelho foi detectado usando um sistema de detecção fosfatase alcalina de anti-IgG de cabra tal como o disponível da Promega (Madison, WI) segundo as instruções do fabricante. O sICAM₄₅₃-decapeptido no meio condicionado foi quantificado por deslocamento do sICAM₄₅₃-decapeptido marcado com ¹²⁵I a partir de placas ligadas com anti-soros policlonais ao decapeptido. A IgG anti-decapeptido de coelho foi purificada numa resina "Affi-Gel 15"® (marca registada da BioRed) (BioRed, Richmond, CA) à qual o decapeptido se ligou. As cavidades de uma placa de microtitulação de 96 cavidades estão ligadas com a IgG anti-decapeptido, os locais de ligação não específicos são bloqueados com BSA e então as cavidades são incubadas com 25 microlitros de meio condicionado das linhagens produtoras e 25 microlitros (50.000 cpm) de sICAM₄₅₃-decapeptido marcado com ¹²⁵I. Após lavagem, a quantidade de radioactividade ligada pelas cavidades é determinada e comparada com a quantidade de radioactividade deixada ligada após a competição por uma quantidade conhecida de sICAM₄₅₃-decapeptido não marcado. A Tabela 2 mostra que o maior produtor sintetizou 100 microgramas de ICAM segregado por mililitro, comparável aos níveis de expressão alcançados por hibridomas (Bending, Genetic Engineering, vol. 7, pp. 90-127, 1988).



EXEMPLO 4

Fucosiltransferase Segregada

O vector de expressão para uma forma segregada de fucosiltransferase (número de acesso X53578, Kukowska-Latallo et al., Genes and Development 4, pp. 1288-1303, 1990) foi feito em vários passos. O plasmídeo IE110/polyA (Figura 2) foi digerido com *Bam*HI. No local *Bam*HI foi clonado um fragmento de ADN de dupla cadeia que codifica a sequência do sinal IL3 humano (sublinhado) com extremidades *Bam*HI complementares desenhadas 5'-GATCCACCATGAGCCGCCGTCCTGCTCCTGCTCCAACCTCCTGGTCGGCCCCGCCATGGCTAAGCTTGGATC-3' (SEQ ID NO:10) e inclui *Nco*I (CCATGG) desenhado e locais *Hind*III (AAGCTT) desenhados próximo da extremidade 3' do sinal da sequência codificante do péptido. O plasmídeo resultante (IE110-IL3/polyA) foi digerido com *Nco*I e *Hind*III. A este local foi ligado um fragmento de ADN que codifica para um decapeptídeo [YPYDVPDYAS, letras de código individuais, (SEQ ID NO:11)] com um local *Nco*I na extremidade 5' e um local *Hind*III na extremidade 3'. Este fragmento foi derivado por ligação do oligonucleótido 5'-GATCGACCATGGCTGC-CATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTTCTAAGCTT-3' (SEQ ID NO:12) com o seu oligonucleótido complementar. O plasmídeo resultante é designado por IE110-IL3-deca/polyA. Um fragmento de ADN que codifica para parte do gene de fucosiltransferase foi isolado do RNA da célula A431 (A.T.C.C.) por PCR e tem extremidades *Hind*III desenhadas. A sequência codificante de fucosiltransferase do fragmento começa com o aminoácido 44 (serina) e termina 4 pares de bases após o código de terminação natural. Este fragmento foi ligado no local *Hind*III localizado atrás da sequência decapeptídica em IE110-IL3-deca/polyA. O gene de fusão resultante tem a sequência de sinal



IL3 humana (primeiros 19 aminoácidos), uma região codificante de decapeptídeo sintética e a região codificante de fucosiltransferase começando com o aminoácido 44 e é designado IE110-IL3-deca-FT-polyA.

As células BHK/VP16 foram co-transfectadas com IE110-IL3-deca-FT-polyA e pMON1118 como acima descrito. As linhagens de células foram analisadas quanto à actividade de fucosiltransferase segregada de acordo com Prieels et al. (Journal of Biological Chemistry, 256, pp. 10456-10463, 1981). Quando convertido para µg/ml, a linhagem mais produtora produziu 70 microgramas por mililitro (Tabela 2).

EXEMPLO 5

Este exemplo demonstra a construção das linhagens de células de CHO que são produtoras de elevados níveis de tPA.

Este exemplo mostra que a selecção para a expressão de dihidrofolato reductase (DHFR) na presença do herpesvírus VP16 conduz a um menor número de produtores de elevados níveis de tPA em células CHO DUKX-B11. A selecção para uma marca de resistência a antibiótico conduz a uma maior percentagem de produtores de elevados níveis em células CHO DUKX-B11.

As células foram co-transfectadas quer com pCA21 quer com MMTV-VP16 e pSV2neo. Os transfectantes resistentes a "GENETICIN"TM foram seleccionados e foram rastreados quanto à expressão de VP16 por transfecção com IE175-B-gal como acima descrito.

As células que expressaram VP16 foram co-transfectadas com IE175-tPA ou IE110-tPA; e pMON1118 ou pSV2dhfr. Os resultados estão



mostrados na Tabela 3.

Os dados mostram que somente 3/127 da linhagem de células CHO/VP16/175-tPA que foram seleccionadas para a expressão de DHFR expressaram elevados níveis de tPA (i.e., além de $1,0 \mu\text{g}/10^6$ células/24 horas). Em contraste, quando foi usada a higromicina como agente de selecção 6 por cento das linhagens de células expressaram mais do que $1,0 \mu\text{g}/10^6$ células/24 horas de tPA.

As transfecções de controlo para CHO-DUKX-B11 progenitoras que não expressam VP16 são ligeiramente anómalas. Usando selecção com higromicina, 0/87 das linhagens de células foram produtoras elevadas como seria de esperar. No entanto, com a selecção com DHFR, na ausência de VP16, 7/112 linhagens de células foram produtoras de levados níveis. Esta maior proporção de produtoras de elevados níveis pode reflectir algum nível de amplificação dos genes DHFR e tPA na ausência de metotrexato. Seja como for, não temos dados para confirmar este conceito.

Aplicações Adicionais

As linhagens de células acima descritas expressam VP16 e produzem quantidades significativas de proteínas segregadas a partir de genes ligados de forma operacional a um promotor IE de HSV, um alvo transactivante de VP16. Estas proteínas segregadas são rapidamente quantificadas e é portanto previsível que estas linhagens de células possam ser úteis na descoberta de compostos que inibem o evento de transactivação mediado por VP16. Especificamente, produtos naturais, químicos ou outras substâncias podem ser adicionadas às linhagens de células acima descritas e o efeito na quantidade de proteína produto produzida pode ser determinada. Aqueles produtos químicos,



naturais ou outras substâncias que diminuem a produção da proteína produto são conduzidos para a identificação de compostos que interferem com a transactivação induzida por VP16. As culturas de células de controlo que segregam proteínas sob o controlo de outros promotores seriam também testadas com os mesmos compostos para determinar se a diminuição na produção de proteína era específica para as linhagens VP16. Os compostos que especificamente diminuem a produção de proteína na linhagem VP16 seriam analisadas posteriormente e testadas para actividade antiviral. A mesma aproximação pode ser usada com ensaios transientes. No entanto, os ensaios transientes seriam muito mais trabalhosos uma vez que eles requerem transfecção de ADN para cada ensaio. Uma vez que as linhagens de células acima descritas produzem de forma estável os produtos de proteína, um fornecimento de células muito mais homogêneo pode ser usado em vários ensaios. Isto conduz a uma economia de tempo e origina uma melhor reprodutibilidade de ensaio para ensaio. Tal prática usando linhagens de células estáveis foi recentemente usada para descobrir compostos que possam inibir a transactivação do HIV LTR pelo transactivador tat (Hsu et al., Science, 254, pp. 1799-1802, 1991). Uma aproximação similar está descrita no pedido de patente WO 91/01379 (número de pedido de patente internacional PCT/US90/04021).

É antecipado que as linhagens BHK/VP16 e CHO/VP16 serão úteis na produção de mutantes de HSV aos quais falte um gene VP16 funcional. Tal como mostrado por Werstuck et al. (Journal of Virology, 64, pp. 984-991, 1990) uma linhagem de células que expresse VP16 irá elevar a infecciosidade do ADN de HSV. Porque os mutantes VP16 negativos de HSV e ADN de HSV nu carecem da capacidade para transactivar os eventos imediatos primitivos de replicação de HSV, fornecimento de VP16 em *trans* pela linhagem de célula hospedeira irá permitir a replicação eficiente dos mutantes VP16 negativos de HSV e aumentar a infectividade do ADN de HSV estéril. A utilidade de uma tal



linhagem de células que expresse VP16 estará na passagem de potenciais formas de vacinas activas de HSV que se têm traduzido como não infecciosas devido às mutações do gene VP16. É antecipado que as linhagens que expressam VP16 podem também ser desenhadas com outros gene HSV que irão completar mutantes de HSV adicionais em *trans* com vista a fornecer a lista completa dos genes necessários para o vírus HSV deficiente.

A partir das descrições precedentes, os peritos na matéria podem facilmente verificar as características essenciais desta invenção, e sem se afastarem do espírito e âmbito da mesma, podem realizar várias mudanças e modificações da invenção para a adaptar a vários usos e situações. Por consequência o âmbito da invenção não é para ser considerado limitado às formas de realização particulares mostradas ou sugeridas, mas é antes para ser determinada consoante as atribuições das reivindicações juntas.

Tabela 1. Produção de tPA e bGH em linhagens BHK

<u>Linhagem e Plasmídeo</u>	<u>Frequência*</u>	<u>Gama**</u>
BHK/VP16, IE175-tPA	9% (5/55)	3-15
BHK, IE175-tPA	0% (0/64)	0,092-0,176
BHK/VP16, IE110-tPA	16% (3/19)	4-21
BHK, IE110-tPA	0% (0/18)	0,014-0,08
BHK/VP16, IE175-bGH	100% (15/15)	8-19
BHK, IE175- bGH	100% (18/18)	3-5

* número de colónias produzindo além de 1 µg/milhão de células/24horas

** µg/milhão células/24horas das 3 linhagens mais produtoras



Tabela 2. PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS POR VÁRIOS SISTEMA DE EXPRESSÃO

<u>PROTEÍNA</u>	<u>BHK/VP16</u>	<u>C127/BPV</u>	<u>Dhfr/CHO</u>
			BASAL
tPA	15-20 µg/ml	15 µg/ml	0,2 µg/ml
VPF121	7 µg/ml	2 µg/ml	0,05 µg/ml
VPF165	3 µg/ml	3 µg/ml	0,06 µg/ml
VPF189	0,03 µg/ml	0,07 µg/ml	0,01 µg/ml
ICAM**	100 µg/ml	NT*	NT
FT***	70 µg/ml	NT	NT

*NT, Não testado

** decapéptido ICAM segregado

*** decapéptido fucosiltransferase segregado

Tabela3. Expressão de rPA em células CHO

<u>LINHAGENS DE CÉLULAS E PLASMÍDEOS</u>	<u>Rastreado</u>	<u>% de µg de Produtor</u>
CHO/VP16 + IE175-tPA/DHFR*	127	2,4
CHO/VP16 + IE175-tPA/HYGRO	48	6,25
CHO/VP16 + IE110-tPA/DHFR	41	0
CHO/VP16 + IE110-tPA/HYGRO	37	2,7
CHO + IE175-tPA/DHFR	112	6,25
CHO + IE175-tPA/HYGRO	87	0
CHO + IE110-tPA/DHFR	79	0
CHO + IE110-tPA/HYGRO	60	0

* Resultados reunidos a partir das linhagens SV40/VP16 e MMTV/VP16.



LISTAGEM DA SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE

- (A) NOME: Monsanto Co.
- (B) RUA: 800 N. Lindbergh
- (C) CIDADE: St. Louis
- (D) ESTADO: Missouri
- (E) PAÍS: USA
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 63167
- (G) TELEFONE: (314) 694-5402
- (G) TELEFAX: (314) 694-9009

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Produção de Proteínas Recombinantes
Usando Promotores do Vírus de Herpes e Transactivadores VP16

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 12

(iv) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

- (A) TIPO DO MEIO: disquete
- (B) COMPUTADOR: IBM PC compatível
- (C) SISTEMA OPERADOR: PC-DOS/MS-DOS
- (D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, Versão #1.25 (EPO)

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)



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

GATCGGATCC AACCCACCC AATGGACCTC

30

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

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

GATCGGATCC GCGCCCCCTA CCCACC

26

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 28 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

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

GACCAATTCC AGGATCCCAG GACCCAGT

28

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico



- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 4 :
GATCGGTACC GCAAACAACA GATGGCTGGC AACTAGA

37

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:5:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 31 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 5 :
GCTAGGATCC CGGGATAGGT TCAGGGAGGC G

31

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:6:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 6 :
GATCGGATCC TCAGCCTCGC TATGGCTCCC

30



(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 34 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

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

GATCGATCAT GGATCCCTCA TACCGGGGGG AGAG

34

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

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

GATCCTACCC GTACGACGTT CCGGACTACG CTTCTTAAGA GCTC

44

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)



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

GATCGAGCTC TTAAGAAGCG TAGTCCGGAA CGTCGTACGG GTAG 44

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 76 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 10 :

GATCCACCAT GAGCCGCCGT CCCGTCCTGC TCCTGCTCCA ACTCCTGGTC
GGCCCCGCCA 60
TGGCTAAGCT TGGATC 76

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 11 :

Tir Pro Tir Asp Val Pro Asp Tir Ala Ser
1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 54 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

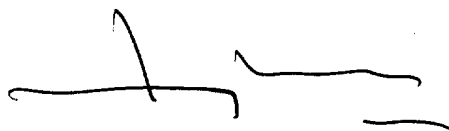
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 12 :

GATCGACCAT GGCTGCCATA CCCGTACGAC GTTCCGGACT ACGCTTCTAA
GCTT

54

Lisboa, 4 de Julho de 2000



JORGE CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 14
1200 LISBOA

1/4

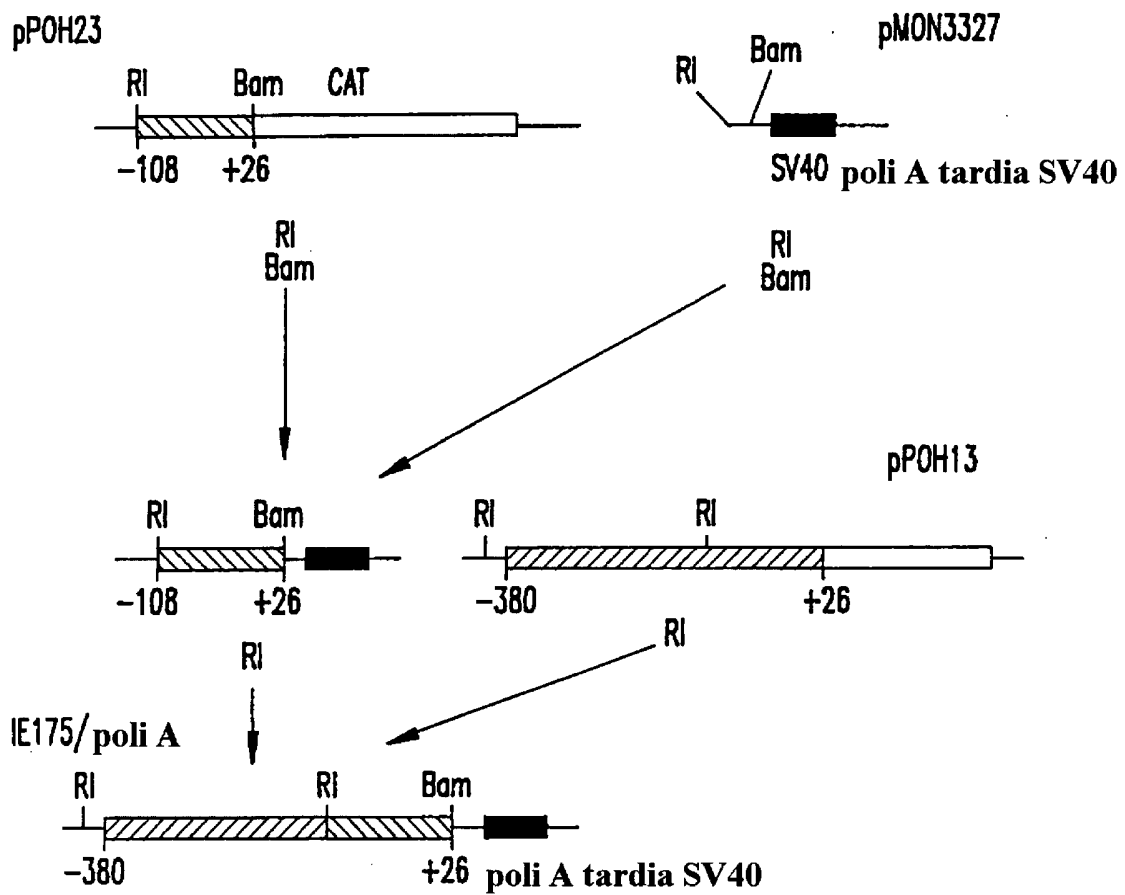


FIG.1

2/4

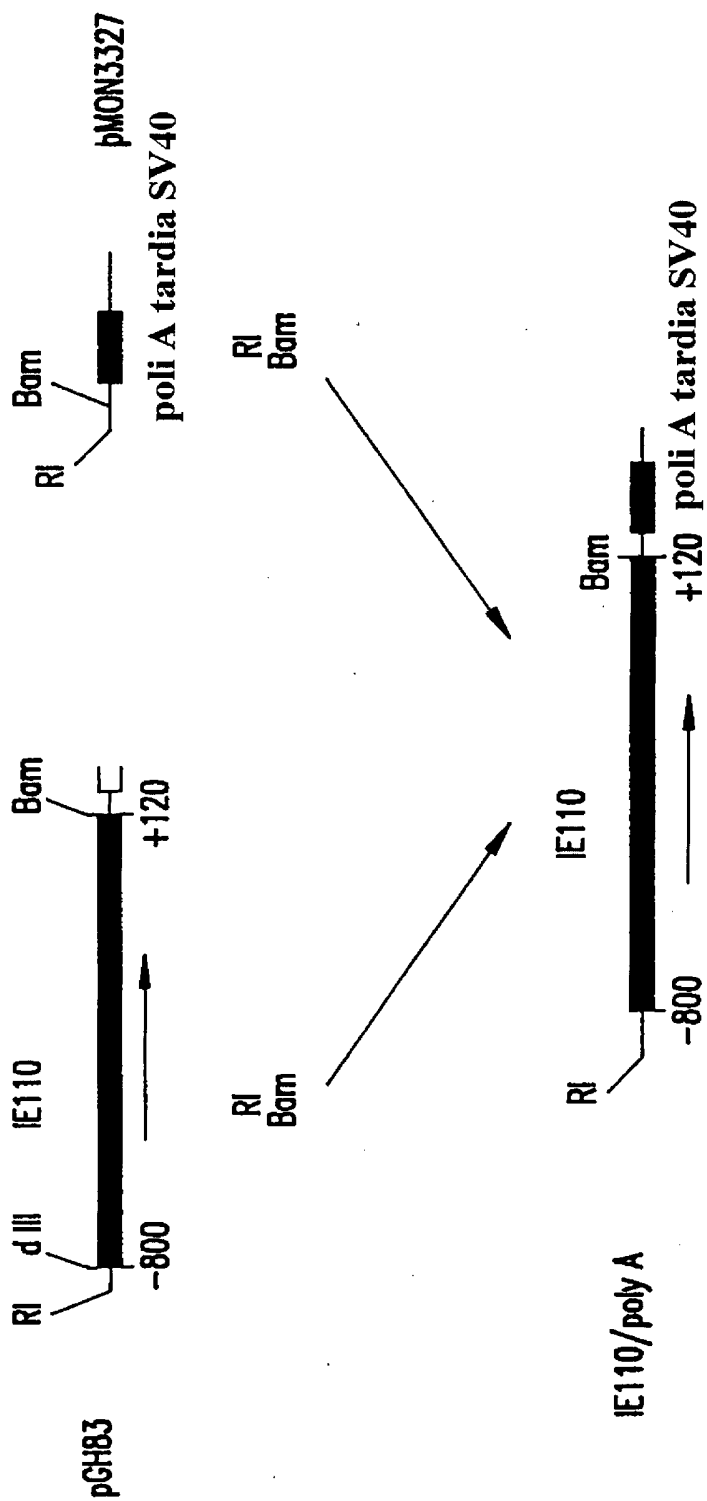


FIG.2

11

11

3/4

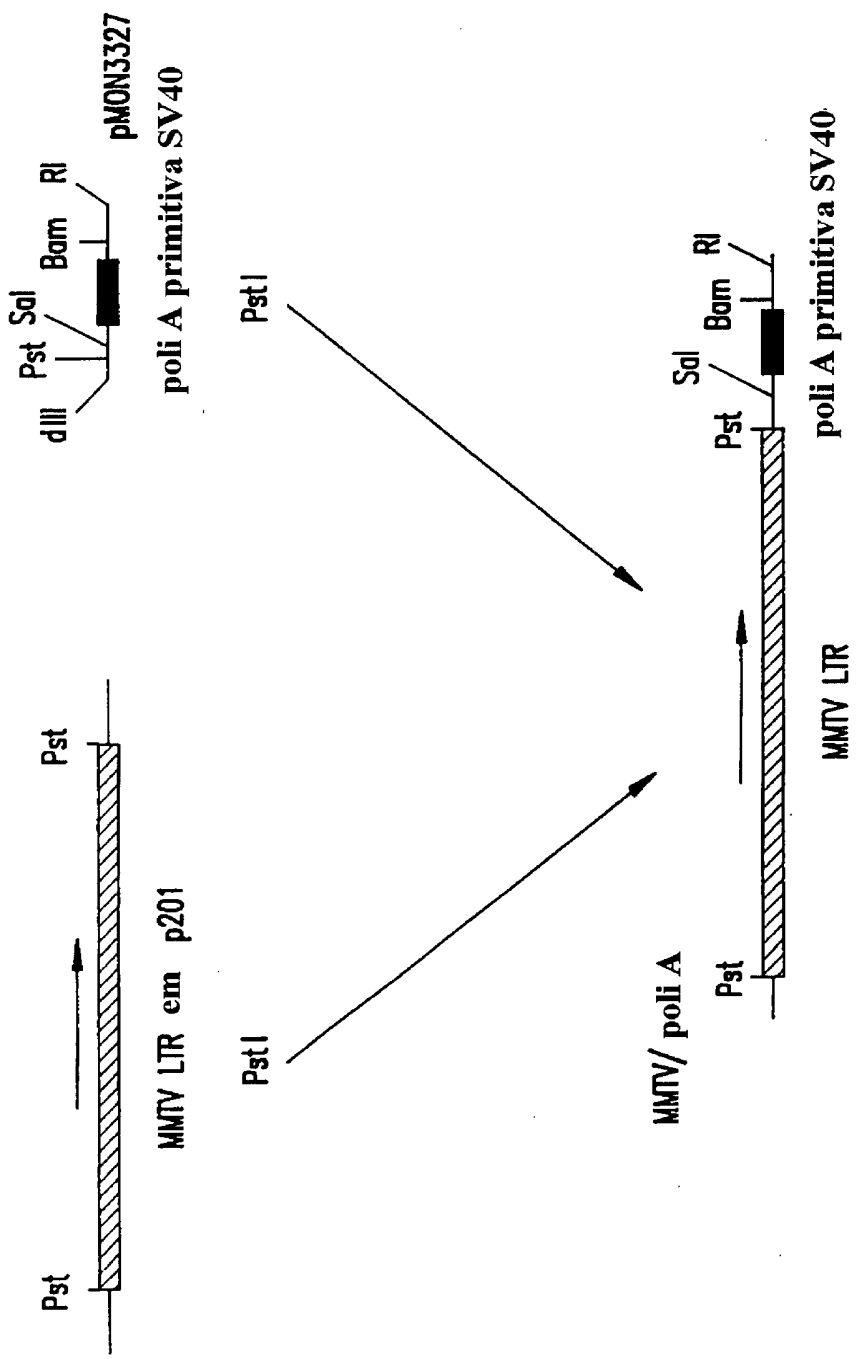


FIG.3

11

4/4

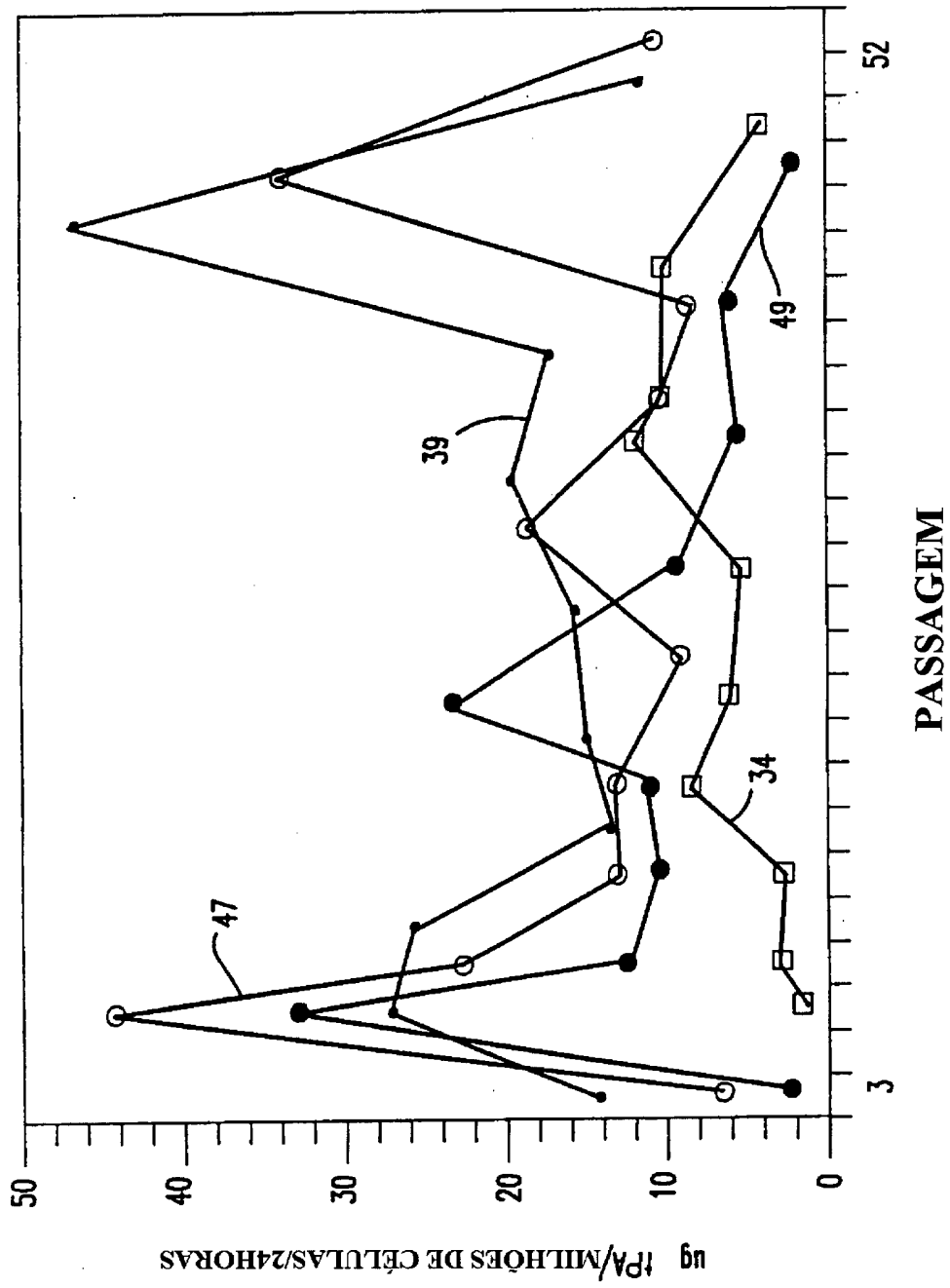


FIG.4



REIVINDICAÇÕES

1. Um método de produção de uma linhagem de células para a expressão de um produto de gene, compreendendo os passos de:

co-transfectar uma célula com uma primeira construção que origina com que a célula expresse a proteína transactivadora VP16 do vírus de herpes simplex e uma segunda construção compreendendo um gene de resistência de selecção a um primeiro agente de selecção;

seleccionar as células que são resistentes ao primeiro agente de selecção;

rastrear as células que são resistentes ao primeiro agente de selecção para células que exprimam VP16;

co-transfectar a célula que expressa a proteína transactivadora VP16 do vírus de herpes simplex com umas terceira e quarta construções, a terceira construção compreendendo o promotor do gene do vírus de herpes simplex operacionalmente ligado a um gene de interesse, a quarta construção compreendendo um gene de resistência de selecção a um segundo agente de selecção;

seleccionar as células que são resistentes ao segundo agente de selecção; e

rastrear as células que são resistentes ao segundo agente de selecção para a expressão do produto do gene do referido gene de interesse.

2. O método da reivindicação 1, em que a referida célula é derivada de células BHK-21 ou mutantes dhfr negativos de CHO.

3. O método da reivindicação 1, em que o referido promotor do gene do vírus de herpes simplex é da região IE175 ou IE110.

4. O método da reivindicação 1, em que o referido primeiro agente de selecção é um antibiótico.



5. O método da reivindicação 1, em que o referido segundo agente de selecção é um antibiótico.

6. O método da reivindicação 1, em que o gene de resistência do agente de selecção é seleccionado a partir do grupo consistindo de genes que codificam as proteínas de ligação higromicina fosfotransferase, aminoglicósido fosfotransferase 3'-H, puromicina acetil transferase e proteína de ligação a bleomicina-fleomicina.

7. O método da reivindicação 1, em que o referido gene de interesse codifica uma proteína segregada.

8. O método da reivindicação 1, em que o referido gene de interesse codifica tPA, ICAM segregado, fucosiltransferase segregada, ou factores de permeabilidade vascular segregados.

9. Uma linhagem de células que expressa um produto de gene, a referida linhagem de células compreendendo: uma primeira construção que origina com que a célula expresse a proteína transactivadora VP16 do vírus de herpes simplex; uma segunda construção compreendendo o promotor do gene do vírus de herpes simplex operacionalmente ligado a um gene de interesse; e umas terceira e quarta construções cada uma compreendendo um gene de resistência de selecção para um agente de selecção.

10. A linhagem de células da reivindicação 9, em que o referido primeiro agente de selecção é um antibiótico.

11. A linhagem de células da reivindicação 9, em que o referido segundo agente de selecção é um antibiótico.



12. A linhagem de células da reivindicação 9, em que a referida célula é derivada das células BHK-21.

13. A linhagem de células da reivindicação 9, em que a referida célula é derivada de mutantes dhfr negativos de células CHO.

14. A linhagem de células da reivindicação 13, em que nenhum dos referidos genes de resistência codifica a dihidrofolato reductase.

15. A linhagem de células da reivindicação 9, em que o referido promotor do gene do vírus de herpes simplex é da região IE175 ou IE110.

16. A linhagem de células da reivindicação 14, em que o gene de resistência do agente de selecção é seleccionado a partir do grupo consistindo de genes que codificam as proteínas de ligação higromicina fosfotransferase, aminoglicósido fosfotransferase 3'-II, puromicina acetil transferase e bleomicina-fleomicina.

17. A linhagem de células da reivindicação 9, em que o referido gene de interesse codifica uma proteína segregada.

18. A linhagem de células da reivindicação 9, em que o referido gene de interesse codifica tPA, ICAM segregada, fucosiltransferase segregada, ou factores de permeabilidade vascular segregados.

19. Um método para descobrir agentes anti virais, compreendendo os passos de:

cotransfectar uma célula com uma primeira construção que origina com



que a célula expresse a proteína transactivadora VP16 do vírus de herpes simplex e uma segunda construção compreendendo um gene de resistência de selecção a um primeiro agente de selecção;

seleccionar as células que são resistentes ao primeiro agente de selecção;

rastrear as células que são resistentes ao primeiro agente de selecção para células que exprimam VP16;

co-transfectar a célula que expressa a proteína transactivadora VP16 do vírus de herpes simplex com umas terceira e quarta construções, a terceira construção compreendendo o promotor do gene do vírus de herpes simplex operacionalmente ligado a um gene de interesse, a quarta construção compreendendo um gene de resistência de selecção a um segundo agente de selecção;

seleccionar as células que são resistentes ao segundo agente de selecção;

rastrear as células que são resistentes ao segundo agente de selecção para a expressão do produto do gene do referido gene de interesse;

incubar as células com substâncias a serem testadas;

determinar da quantidade de produto de gene do gene de interesse produzida pela célula após exposição às substâncias; e

testar substâncias que diminuem a quantidade do produto de gene do gene de interesse para inibição de replicação de um agente de vírus por ensaios de vírus convencionais.

20. O método da reivindicação 19, em que a referida célula é derivada de BHK-21 ou mutantes dhfr negativos de CHO.

21. O método da reivindicação 19, em que o referido promotor do gene do vírus de herpes simplex é da região IE175 ou IE110.

22. O método da reivindicação 19, em que o referido primeiro agente de selecção é um antibiótico.

23. O método da reivindicação 19, em que o referido segundo agente de selecção é um antibiótico.

24. O método da reivindicação 19, em que o gene de resistência do agente de selecção é seleccionado a partir do grupo consistindo de genes que codificam as proteínas de ligação higromicina fosfotransferase, aminoglicósido fosfotransferase 3'-H, puromicina acetil transferase e bleomicina-fleomicina.

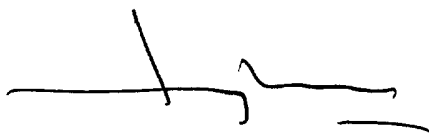
25. O método da reivindicação 19, em que o referido agente viral é o vírus de herpes simplex.

26. O método da reivindicação 19, em que o referido gene de interesse codifica uma proteína segregada.

27. O método da reivindicação 19, em que o referido gene de interesse codifica tPA, ICAM segregado, fucosiltransferase segregada, ou factores de permeabilidade vascular segregados.

28. O método da reivindicação 19, em que as substâncias a serem testadas são compostos sintéticos ou naturais de plantas, animais ou fontes microbianas.

Lisboa, 4 de Julho de 2000



JORGE CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 14
1200 LISBOA