

67 678

14385

PATENTE Nº. 87 424

"Método de produção de tPA e de expressão de genes estranhos em células de Drosophila"

para que

SMITHKLINE BECKMAN CORPORATION, pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao método de produção de tPA (activador de plasminogénio de tecido) em células de Drosophila, caracterizado por compreender a cultura de células de Drosophila transfectadas com uma unidade de expressão do gene de tPA, de tal forma que o tPA seja expresso e segregado, e a recolha do tPA segregado.

O presente invento refere-se ainda a um método de expressão de um produto de gene heterólogo em Drosophila.

MEMÓRIA DESCRITIVA

Âmbito do invento

Este invento refere-se a um método para a expressão de genes estranhos em células de Drosophila. Mais especificamente, o invento refere-se a um sistema para a expressão de níveis elevados do activador do plasminogénio tissular (tPA) em células de Drosophila e à purificação do produto de gene expresso.

Antecedentes do invento

O tPA humano é uma glicoproteína de cerca de 70 000 dalton e 527 aminoácidos. É segregado por vários tecidos humanos e encontra-se naturalmente presente no soro. O tPA actua na lise de coágulos, convertendo o plasminogénio em plasmina. O tPA possui afinidade por fibrina e é mais activo na sua presença. Assim, o tPA é útil para o tratamento de perturbações associadas à formação de trombos como trombose das veias profundas, enfarte agudo do miocárdio e embolia pulmonar.

Veja-se, na generalidade, Rijken et al., Biochem. Biophys. Acta 580:140 (1979), Vetterlein e col., J. Biol. Chem. 254:575 (1979), Rijken e col., J. Biol. Chem. 256:7035 (1981) e Matsuo e col., Nature 291:590 (1981).

O tPA é sobre-produzido por certas linhas de células, incluindo a linha de células do melanoma de Bowes. Veja-se, por exemplo, Wilson e col., Canc. Res. 40:933 (1980). Collen e col., Patente Europeia (EP-A)-41, 766, referem a purificação do tPA derivado do melanoma de Bowes. Wilson, na EP-A-113, 319, refere a produção e a purificação de tPA usando uma linha de células do melanoma de Bowes independente de soro. Brouty-Boye, Bio'Technology, Dezembro de 1984, pág. 1058, refere a produção de tPA por células pulmonares de embrião humano. Schleuning e col., Resumo da Sexta Conferência Inter

nacional de Fibrinólise, Lausanne, Suíça, 22-23 de Julho, 1982 referem a produção de tPA por células HeLa.

O tPA pode também ser preparado por técnicas de ADN recombinante. O isolamento do ARNm para o tPA é descrito, por exemplo, por Opdenakker e col., Eur. J. Biochem. 121:269 (1982). O isolamento do ADNc para parte do tPA é descrito por Edlund e col., Proc. Natl. Acad. Sci USA 80:349 (1983). A clonação do ADNc para tPA, em E. coli é referida por Pennica e col., Nature 301:214 (1983). A clonação de ADNc para tPA em E. coli e em células de ovário de criceto Chinês por aplicação de procedimentos de ADN recombinante rotineiros, é descrita por Goeddel e col., EP-A-93, 619 e por Levinson e col., EP-A-117, 059. Goldberg e col., no pedido de patente PCT W085-03949, descrevem a expressão de tPA em E. coli. Meyhack e col., EP-A-143, 081, descrevem a expressão de tPA em levedura. Robinson, W084-01786, descreve um tPA modificado no qual faltam todos, ou uma porção, de grupos hidrato de carbono presentes no tPA nativo.

O desenvolvimento das culturas de células de Drosophila que são estáveis e que podem crescer em condições laboratoriais tem já sido referido. Veja-se Schneider, J. Embryol. Exp. Morphol. 27:353 (1972). Vários sistemas de vectores contendo sequências de codificação específicas foram inseridos em Drosophila sob o controlo do promotor de choque térmico em Drosophila ou de promotores COPIA. DiNocera e col. Proc. Natl. Acad. Sci USA 80:7095 (1983). Mais recentemente o ARNm codificando os promotores de choque térmico foi traduzido em células de Drosophila a velocidades elevadas, McGarry e col., Cell 42:903 (1985).

Sumário do Invento

Uma das concretizações do invento, refere-se ao desenvolvimento de um sistema de selecção para co-introduzir e expressar genes estranhos em células de Drosophila. Pela utilização deste método, o tPA pode ser produzido em células de

-4-

Drosophila, pela cultura de células de Drosophila transfectadas com uma unidade de expressão do gene de tPA de tal forma que o tPA é expresso e segregado; e pela recolha do tPA segregado. O sistema de selecção desenvolvido pode ser utilizado para co-introduzir e sobre-expressar outros genes de interesse.

Outra concretização do invento refere-se ao tPA produzido por uma célula de Drosophila recombinante. Descreve-se uma unidade de expressão do gene do tPA, compreendendo uma sequência de codificação de ADN para tPA, ou uma sua variante activa, e um elemento regulador, necessário para a transcrição da sequência de codificação de tPA e subsequente tradução na célula de Drosophila. O produto do gene de tPA é então segregado nos meios celulares e recolhido.

Numa outra concretização, o invento refere-se a um método para a expressão de um produto de gene heterólogo em Drosophila que compreende a co-transfecção de células de Drosophila com um vector contendo a unidade de expressão do gene para o produto do gene e um vector contendo a 5'LTR de um elemento COPIA integrado e uma higromicina B fosfo-transferase ou marcador de selecção de resistência a metotrexato; a cultura das células transfectadas sob condições tais que o produto de gene seja expresso; e a recolha do produto do gene.

Descrição detalhada do invento

Foi agora verificado que a produção de tPA em níveis elevados pode ser obtida numa cultura de células de Drosophila. As células de Drosophila são transfectadas usando técnicas padrão de clonação que permitem a introdução de ADN estranho numa célula hospedeira sem afectar adversamente o ADN estranho ou a célula hospedeira. As células de Drosophila recombinantes assim construídas segregam tPA em níveis elevados.



Podem utilizar-se quaisquer células de Drosophila na prática do invento. Uma linha de células preferida é a linha S_2 . A introdução da sequência de codificação do ADN para tPA nas células S_2 de Drosophila por técnicas de transfecção de ADN produz quantidades inesperadamente elevadas de tPA. As células S_2 (Schneider, J. Embryol. Exp. Morph., 27:353 (1972)) são de culturas de células estáveis de células de Drosophila embrionárias poliplóides. O uso da célula S_2 de Drosophila tem muitas vantagens incluindo, mas não se limitando, à sua capacidade para crescer até uma densidade elevada à temperatura ambiente. A integração estável do sistema de selecção produziu até 1000 cópias da unidade de expressão do gene transfectado nos cromossomas da célula. Outras linhas de células de Drosophila disponíveis são a S_1 , S_3 , KC-0 e hydei.

As células de Drosophila podem ser cultivadas em diversos meios nutrientes, incluindo por exemplo o meio M_3 . O meio M_3 consiste numa formulação de sais equilibrados e aminoácidos essenciais, a um pH de 6,6. A preparação do meio efectua-se de forma substancialmente equivalente à descrita por Lindquist, DIS, 58:163 (1982).

Uma unidade de expressão do gene de tPA, que é uma molécula de ADN recombinante e que pode ser utilizada para preparar as células de Drosophila recombinantes do invento, compreende uma sequência de codificação de ADN para tPA, ou para uma sua variante activa e regiões de regulação necessárias ou desejáveis para a transcrição da sequência de codificação de tPA e subsequente tradução.

A sequência de codificação para tPA encontra-se disponível em diversas fontes ou pode ser obtida a partir de células humanas ou linhas de células como a linha de células do melanoma de Bowes ou a linha de células HeLa. Utilizam-se técnicas padrão de engenharia genética para derivar uma sequência de codificação para tPA a partir do ADN genómico de uma

célula humana. As variantes dessa sequência de codificação podem também ser preparadas por técnicas padrão de ADN recombinante. Essas variantes compreendem moléculas de tPA nas quais um ou alguns aminoácidos foram substituídos, adicionados ou deleccionados sem afectar significativamente de forma adversa a actividade trombolítica. Veja-se, por exemplo Robinson, W084-01786; Rosa e col., W086-01538; Heyneker e col., GB2,173,804A.

A região reguladora compreende tipicamente uma região promotora que actua na ligação da ARN polimerase e na iniciação da transcrição do ARN. A região promotora é tipicamente encontrada a montante da sequência de codificação para tPA. Os promotores que se empregam geralmente nos vectores de expressão de células de mamíferos incluindo, por exemplo, o vírus do sarcoma de Rous de aves, LTR e o vírus de Símio (promotor anterior de SV40) exibem função e expressão pobres no sistema de Drosophila. Os promotores preferidos são de origem Drosophila. Verificou-se que o promotor anterior SV40 origina níveis de expressão inferiores aos do promotor metalotioneína de Drosophila. Exemplos de outros promotores de Drosophila incluem por exemplo promotores de choque térmico (Msp70) e promotores COPIA LTR.

A sequência de codificação para tPA é seguida por uma região de poliadenilação (poli A) no seio da unidade de expressão do gene de tPA, como uma região poli A anterior de SV40. A região poli A, que actua na poliadenilação dos transcritos de ARN, parece ter um papel na estabilização da transcrição. A região poli A pode ser derivada de uma larga variedade de genes nos quais se encontra naturalmente presente. Outras regiões poli A disponíveis incluem por exemplo os derivados da hormona do crescimento e dos genes da metalotioneína. Essa região pode também ser modificada para alterar a sua sequência, desde que as funções de poliadenilação e estabilização da transcrição não sejam significativamente afectadas de forma adversa.

A utilização do promotor metalotioneína de Drosophila resulta na retenção da regulação total pelo sistema de vectores de metalotioneína, mesmo para números de cópia muito elevados. Este resultado contrasta directamente com os resultados obtidos em células de mamíferos usando o promotor metalotioneína de mamíferos nos quais o efeito regulador do metal diminui com o aumento do número de cópias. O resultado da retenção deste efeito indutor é o aumento da expressão do produto de gene na célula de Drosophila a números de cópia elevados.

Uma vez construído o vector contendo a unidade de expressão do gene de tPA, este pode ser transfectado para a célula de Drosophila usando técnicas padrão de transfecção. Essas técnicas incluem, por exemplo, co-precipitação com fosfato de cálcio, fusão celular, electroporação, micro-injecção e transfecção viral.

Tipicamente, na clonação de genes, incorpora-se o gene escolhido numa molécula maior de ADN recombinante antes de se efectuar a transfecção. Essa molécula de ADN maior compreende pelo menos um marcador de selecção genético em adição às funções do tPA. O marcador de selecção pode ser qualquer gene ou genes que provoquem uma variação fenotípica facilmente detectável numa célula hospedeira transfectada. Essa variação fenotípica pode ser, por exemplo, resistência a drogas como o gene para resistência a higromicina B.

Pode utilizar-se um sistema de selecção que use as drogas metotrexato e di-hidrofolato reductase procariótica (DHFR), com células de Drosophila. O DHFR eucariótico endógeno das células é inibido pelo metotrexato. Assim, transfectando as células com um plasmídeo contendo DHFR procariótico que é insensível ao metotrexato e efectuando a selecção com metotrexato, apenas sobreviverão as células transfectadas com o DHFR procariótico e que o expressam.

Contrariamente à selecção com metotrexato de células

-8-

de mamíferos e bacterianas transformadas, no sistema de Drosophila, o metotrexato pode ser utilizado para seleccionar inicialmente transfectantes com número de cópias elevados. Sobreviverão apenas as células que possuam incorporado o gene DHFR procariótico protector. Concomitantemente, estas células possuem a unidade de expressão do gene de interesse.

Pode utilizar-se no presente invento um sistema de dois vectores para co-transfectar na célula de Drosophila uma unidade de expressão de gene para um produto de gene de interesse e a região de codificação para o sistema de selecção a ser utilizado. Por exemplo, o sistema de expressão pDM100, constituído pelos vectores pDM100 e pHGCO, pode ser utilizado para preparar células S_2 recombinantes contendo a sequência de codificação de ADN para tPA. O vector, pDM100 compreende uma unidade de expressão do gene tPA em que o promotor é o promotor de choque térmico Hsp70 de Drosophila. O Hsp70 é um promotor de choque térmico de Drosophila que se verificou ser vantajoso para a expressão de genes em células de Drosophila (Ingolia, e col., Cell, 21:669 (1980)). O vector pHGCO compreende uma unidade de expressão do gene DHFR e é co-transfectado com o vector pDM100 proporcionando assim o gene DHFR necessário para a selecção. Uma descrição mais detalhada desta concretização do invento pode ser encontrada no Exemplo 1.

Uma segunda concretização ilustrativa do presente invento é a produção de tPA usando um método com dois vectores mas com uma unidade de expressão do gene tPA que emprega o sistema vectorial pCOHYGRO constituído pelos vectores pCOHYGRO e pDMtPA.

O vector pCOHYGRO compreende uma unidade de expressão do gene da higromicina B. O vector pDMtPA contém a unidade de expressão do gene de tPA usando o promotor metalotioneína. Uma unidade de expressão do gene de tPA que utilize o sistema de vectores pCOHYGRO produzirá tPA em células de Drosophila por maximização da vantagem da resistência à higromicina B pa

ra a selecção. Com este sistema o antibiótico higromicina B pode ser utilizado para seleccionar as células contendo os vectores transfectados.

Os dois vectores são co-transfectados na célula S_2 de Drosophila utilizando o método descrito por Wigler e col., Cell, 16:777 (1979). Os vectores são co-transfectados em diversas proporções, dependendo do número de cópias particular desejado. As células transfectadas são então seleccionadas, por exemplo em meio M_3 contendo soro e o agente de selecção apropriado, por exemplo higromicina B ou metotrexato.

Outros sistemas de cultura de células de Drosophila conhecidos que podem ser utilizados são, por exemplo, a linha celular KC-O de Drosophila melanogaster que é uma linha de células isenta de soro, Schulz, e col., Proc. Natl. Acad. Sci USA 83:9428 (1986). Estudos preliminares usando a linha KC-O sugeriram que a transfecção é mais difícil que com as células S_2 . Outra linha celular que tem sido utilizada é uma linha de células de Drosophila hydei. A expressão da proteína pode ser obtida usando a linha de células hydei, mas, no entanto, a transfecção para esta linha de células pode resultar numa muito baixa eficiência da expressão do ADN transfectado, Sinclair, e col., Mol. Cell. Biol. 5:3208 (1985).

Uma vez que o sistema de vectores apropriado tenha sido construído e transfectado na linha de células S_2 , a expressão de tPA é induzida pela adição de um agente indutor apropriado, como o cádmio no caso do promotor metalotioneína, ou calor no caso do promotor Hsp70. A transcrição da sequência de codificação de tPA após indução, pode ser controlada.

A análise de manchas Southern (Maniatis, e col., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 1982) pode ser utilizada para determinar o número de cópias do gene de tPA. A análise de manchas Northern (Maniatis, Supra, p. 202) proporciona informação em relação ao tamanho da sequência genética transcrita. O nível de transcrição pode também ser quantificado. Pode ser determinado um

-10-

ARNm de tPA com aproximadamente 2,4 Kb. A expressão de tPA nas células recombinantes pode ser adicionalmente verificada por análise das manchas Western e testes de actividade sobre a proteína resultante.

As células S_2 do presente invento são particularmente adequadas para a produção de proteína com rendimento elevado. As células podem ser mantidas em culturas de suspensão à temperatura ambiente ($24 \pm 1^\circ\text{C}$). O meio de cultura é M_3 suplementado com cerca de 5 a 10% (v/v) de soro bovino fetal inativado pelo calor. Na concretização preferida do invento o meio de cultura contém 5% de soro bovino fetal. Após indução, as células são cultivadas em meio isento de soro. Quando se utiliza o sistema de vectores pCOHYGRO o meio é também suplementado com 300 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina B. Neste meio as células S_2 podem crescer em culturas de suspensão, por exemplo em balões, sob rotação, de 250 ml a 2000 ml, com agitação a 50-60 rpm. As densidades das células são tipicamente mantidas entre 10^6 e 10^7 células por ml. Numa concretização do presente invento efectua-se o cultivo das células antes da indução em balões, sob rotação, de 1500 ml em meio contendo 5% de soro.

Após a cultura das células, o tPA pode ser isolado dos meios consumidos por exemplo pelo uso de uma coluna de afinidade para anticorpos monoclonais. Outros passos de purificação de proteínas conhecidos, por exemplo, quelatos metálicos, vários passos de cromatografia de afinidade ou cromatografia de absorção, podem ser utilizados para purificar o tPA a partir dos meios de cultura. A utilização da linha de células S_2 que segrega o produto de gene directamente nos meios é uma característica importante do presente invento. A secreção directa nos meios permite a utilização de um sistema de purificação eficiente num só passo.

Utilizando uma coluna de anticorpos monoclonais dirigida contra tPA, os meios de cultura consumidos podem ser adicionados directamente à coluna e o tPA eluído usando KSCN 1,5 M em solução salina tamponada com fosfato.

-11-

O sistema de células de Drosophila tem sido utilizado para produzir apenas tPA de cadeia simples. A proporção de formas longas e curtas no terminal amino, verificou-se ser totalmente oposta à encontrada em sistemas de mamíferos. Estudos preliminares de mobilidade em gel indicam que o tPA de Drosophila difere também na glicosilação. Dado que o tPA humano está a ser produzido num sistema de insecto, o tPA encontra-se totalmente livre de materiais contaminantes de humanos, ericeto ou ratinho. Em adição, o tPA humano produzido em Drosophila está isento de retrovírus de mamíferos.

Após os métodos adicionais de purificação de forma a obter tPA de grau farmacêutico, o tPA é formulado numa composição farmacêutica (Pedido de Patente Europeia 0,211,592) de forma que cada unidade de dosagem compreenda uma quantidade de tPA que seja não tóxica, isto é, isenta de efeitos secundários adversos significativos, e que seja, eficaz para provocar trombólise após administração a um animal, particularmente ao homem. Esta composição farmacêutica para tratamento do enfarte do miocárdio encontra-se tipicamente numa forma adequada para injeção ou infusão intravenosa e compreende 0,1 a 10 mg/ml de tPA num diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável. Os diluentes e veículos adequados são bem conhecidos para um químico farmacêutico bem como o são as técnicas de preparação da composição farmacêutica.

Apesar da descrição precedente e dos exemplos que se seguem versarem principalmente sobre a expressão de tPA em Drosophila, os vectores de expressão e os sistemas de dois vectores de expressão aqui descritos podem ser utilizados para clonar e expressar outros genes e sequências de codificação em Drosophila. Por exemplo, uma sequência de codificação para uma hormona de crescimento, uma linfoquina uroquinase, em antígeno ou outro produto de gene de interesse, podem ser inseridos numa unidade de expressão de um gene, num vector como pDML00 ou pDMtPA e co-transfectados com um vector como pHGCO ou pCOHYGRO. As células transfectadas podem então ser seleccionadas como descrito anteriormente.

-12-

Exemplos

Os exemplos que se seguem são ilustrativos e não limitam o invento.

Exemplo 1

Expressão de tPA usando o vector Hsp70 e um sistema de selecção DHFR.

Construção de VectorespDMKΔH

Como vector básico para expressão de gene em Drosophila utilizou-se pML₂, que é um vector pBR322 pequeno contendo o gene β-galactamase (Mellon e col., Cell 27:297 (1982)). Este vector foi digerido com SalI que faz um único corte no plasmídeo. Neste sítio inseriu-se uma "cassete" SalI contendo o promotor anterior SV40, seguido pelo gene de galactoquinase e pelo sítio de poliadenilação anterior de SV40.

A "cassete" SalI foi obtida a partir de pDSPI (Pfarr e col., DNA 4:461 (1985)). A orientação da inserção foi determinada por análise de restrição fina usando HindIII e BamHI. A nova construção pDMK possui a unidade de transcrição para os genes da galactoquinase e da β-lactamase que decorre na direcção oposta. O pDMKΔH foi criado pela deleção de um sítio HindIII na sequência de pBR322, 5' em relação ao promotor anterior SV40. O pDMK foi digerido com HindIII e o sítio foi preenchido nas extremidades (Maniatis, Supra p-113) e o vector foi re-ligado. O pDMKΔH possui agora um único sítio HindIII posicionado entre o promotor anterior SV40 e o gene da galactoquinase.

pDMKHSP

O pDMKΔH foi digerido com SmaI e HindIII que libertam

o promotor anterior SV40. O sítio HindIII foi preenchido nas extremidades e o fragmento do promotor HSP70 de Drosophila foi inserido neste vector.

O fragmento usado foi um fragmento com 460 pb obtido pela digestão de pDM301 com XbaI e XmnI (McGarry, e col., Cell 42:903 (1985)). Este fragmento contém aquilo que se julga serem as sequências de regulação para a indução por calor. O fragmento foi preenchido nas extremidades e ligado ao vector cortado SmaI, HindIII.

O ADN ligado foi transformado em E. coli e as colónias contendo o plasmídeo desejado foram identificadas por restrição fina de minipreparações de ADN com HindIII e XhoI.

pDM100

O pDMKHSP foi cortado com XbaI, a seguir preenchido nas extremidades e finalmente cortado com HindIII, liberta-se assim o gene da galactoquinase. A sequência de codificação para tPA foi isolada de um clone de ADNc obtido de Schlenning, e col., supra, num fragmento HindIII-BalI que inclui o pre-pro-peptídeo e a sequência de codificação total para tPA. Este fragmento foi inserido no vector pDMKHSP cortado. O ADN ligado foi transformado em E. coli e o plasmídeo correcto foi identificado por restrição com as enzimas HindIII, BamHI e XbaI. As condições utilizadas para todas as restrições foram as recomendadas pelo fabricante (New England Biolabs).

Transfecção em células S₂ de Drosophila

O pDM100 foi co-transfectado em células S₂ de Drosophila juntamente com pHGCO o qual é um plasmídeo contendo o gene procariótico DHFR derivado de E. coli, conduzido por COPIA 5'LTR. (Bouronis e col., EMBO 2:1104 (1983)). O procedimento de transfecção seguido foi substancialmente o descrito por Wigler e col., Cell 16:777 (1979). Co-transfectaram-se 20 µg

-14-

do plasmídeo de ADN pDML00 + pHGCO em diversas proporções, dependendo do número de cópias desejado, em 3×10^6 células, e o precipitado foi deixado nas células durante 18 horas. As células foram então lavadas e permitiu-se o seu crescimento durante 48 horas para se dar a expressão de DHFR. As células foram centrifugadas e ressuspensas em meio contendo metotrexato 2×10^{-7} M para seleccionar os transformantes que expressam o gene DHFR. Os transformantes estáveis foram obtidos após 6 semanas de selecção.

Análise do produto do gene

As células resistentes foram semeadas a uma densidade de 5×10^6 células/ml, em meio M_3 isento de soro. Permitiu-se às células expressarem tPA durante 3 dias antes de se efectuar a recolha e ensaio do meio para análise da presença da proteína tPA. A análise Western, substancialmente de acordo com a descrita por Bittner e col., Ann Biochem. 102:549 (1980) revelou a presença de quantidades elevadas da proteína tPA, isto é, a proteína possui o peso molecular esperado (aprox: 70 Kd) por cadeia simples de tPA. A confirmação de que a proteína tPA tinha sido expressa e se encontrava activa foi realizada usando a análise de actividade S2251. Rauby e col., Thromb. Res. 27:743 (1982).

A análise Southern das células policlonais produtoras de tPA revelou que estas continham até 1000 cópias da unidade de expressão do gene de tPA por cada célula e que a unidade de expressão do gene de tPA é amplificada e integrada nos cromossomas hospedeiros segundo um modelo cabeça-à-cauda.

Exemplo 2

Expressão de tPA usando o sistema de selecção com higromicina B.

Construção de Vetores

pUCOPIA

Como vector básico de clonação para a expressão do gene em Drosophila, usou-se pUC18 contendo um sítio BamHI e SmaI. O 5'LTR de um elemento COPIA integrado (357 pares de bases) foi clonado no sítio BamHI do vector pUC18 resultando o vector designado por pUCOPIA. COPIA ^é um elemento representativo das sequências de repetição ^{médias}/dispersas encontradas difundidas no genoma de Drosophila (Rubin, e col., em Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45:619 (1980)).

pCOHYGRO

O vector pUCOPIA foi cortado no sítio SmaI e o gene de E. coli codificando a higromicina B fosfotransferase ("cassete" de higromicina B) foi clonado em pUCOPIA, usando técnicas padrão de clonação. A "cassete" de higromicina B foi isolada num fragmento HindIII-BamHI de 1481 pares de bases a partir do vector DSP-hygro (Gertz, e col., Gene 25:179 (1983)). A "cassete" de higromicina B contém a sequência de codificação para o gene de higromicina B fosfotransferase e a região poli A anterior de SV40. Os sítios HindIII e BamHI foram preenchidos usando ADN polimerase de T₄ e a "cassete" de higromicina B foi ligada no sítio SmaI do vector pUCOPIA.

pDMtPA

O plasmídeo pBR322 contendo o gene da β -galactamase foi utilizado como vector básico. O promotor metalotioneína, Lastowski-Perry, e col., J. Biol. Chem. 260:1527 (1985) foi isolado num fragmento EcoRI-StuI e foi inserido em pBR322 em frente do gene de tPA completo contendo o pré-peptídeo. Um sítio poli A anterior de SV40 está a seguir ao gene de tPA.

Transfecção em células S₂ de Drosophila

O pCOHYGRO/^{foi}co-transfectado em células de S₂ de Drosophila juntamente com pDMtPA que transporta o gene de tPA, sob o controlo do promotor metalotioneína de Drosophila. As células transfectadas foram seleccionadas em meio M₃ com soro, contendo 300 µg/ml de higromicina B. Após 2 a 3 dias sob condições idênticas as células não transfectadas, deixam de se dividir e começam a morrer. O tempo de selecção de forma a obter células em crescimento, resistentes à higromicina B estáveis nas culturas transfectadas, é de aproximadamente duas a três semanas.

Para obter culturas que possuam integrados nos seus cromossomas, diferentes números de cópias do gene de tPA, as proporções dos dois vectores variam na transfecção de acordo com o indicado na Tabela 1.

Tabela 1

<u>pDMtPA</u>	<u>pCOHYGRO</u>	Cultura policlo- nal isolada	Número de cópias aproximado	
			<u>Gene de higromicina B</u>	<u>Gene de tPA</u>
10mg	10mg	A	50-100	30-40
18mg	2mg	B	50-100	150
20mg	0,2mg	C	50-100	2000

A expressão de tPA foi verificada após indução do promotor metalotioneína com cádmio 10 µM. Detectou-se um ARNm de tPA específico com aproximadamente 2,4 Kb, por análise de manchas Northern, concomitantemente, a análise de manchas Western do sobrenadante consumido das culturas celulares induzidas revelou uma banda de tPA simples a aproximadamente 70 Kd.

O nível de tPA nos sobrenadantes das células foi medido usando o Teste de Actividade S2251. Semearam-se 5x10⁶ células em 1 ml de meio M₃ isento de soro e induziu-se durante 3 a 4 dias. O nível de tPA medido no sobrenadante é indicado

na tabela 2.

Tabela 2

<u>Cultura policlonal</u>	<u>Células não induzi- das (ng/ml)</u>	<u>Células induzidas (ng/ml)</u>
A	160	500
B	99	1500
C	85	1300
controle pCOHYGRO	0	0

O escalonamento da cultura policlonal B com culturas de dois clones simples derivados da cultura policlonal B, usando técnicas de clonação padrão em ágar mole, resultou num aumento significativo da produção de tPA, como se mostra na Tabela 3.

Tabela 3

<u>Cultura Celular</u>	<u>Número de Cópias</u>	<u>g/ml (após 3 dias)</u>
Cultura policlonal B	100-150	14-20
Clone simples T	30	3-12
Clone simples I	150	22-37

As células foram mantidas como culturas em suspensão em balões, sob rotação, de 250 ml a 2000 ml. O meio de cultura utilizado foi o meio M₃ suplementado com 300 µg/ml de higromicina B. As culturas foram incubadas a 24[±]1°C e agitadas a 50-60 rpm. As densidades celulares foram mantidas tipicamente entre 10⁶ e 10⁷ células por ml.

Para a indução, as células foram recolhidas por centrifugação a baixa velocidade e ressuspensas a uma densidade de 5x10⁶ células por ml em meio M₃ suplementado com higromicina B. Adicionou-se cloreto de cádmio até uma concentração final de 10 µM e as culturas foram deixadas em crescimento durante 3 a 4 dias em meio isento de soro, antes de se reco-

lher o tPA.

Exemplo 3

Purificação do tPA a partir de meios de cultura celulares condicionados

PAM-2 Sepharose^R (American Diagnostica, Greenwich, Ct.) é o anticorpo monoclonal de tPA acoplado a Sepharose 4B. Transferiram-se 5 ml de PAM-2 Sepharose (aproximadamente 10 mg de anticorpo monoclonal de tPA por volume de coluna) para uma coluna de 1x6 cm e efectuou-se a lavagem com KSCN 2 M a 5 ml/h, durante a noite para remover os anticorpos monoclonais fracamente ligados. Após a lavagem, fizeram-se passar através da coluna 50 ml de solução salina tampoadada com fosfato (PBS) de forma a equilibrar o gel.

O meio condicionado filtrado e estéril das células de Drosophila induzidas (1 litro) foi passado lentamente através da coluna a 0,8 ml/min. A coluna foi então lavada com 30 ml de PBS seguidos de 30 ml de KSCN 0,5 M em PBS, a 0,8 ml/min. O tPA foi eluído usando 30 ml de KSCN 1,5 M, seguido de KSCN 2,0 M a um caudal de 0,8 ml/min. Mais de 90% do tPA foi eluído num único pico com KSCN 1,5 M. Após a eluição com KSCN 2,0 M, para eluir qualquer tPA residual fortemente ligado, a coluna foi lavada com 30 ml de PBS e então guardada em 0,01% de azeto de sódio em PBS.

Uma análise do tPA produzido nas células de Drosophila revelou uma correlação directa entre a densidade celular na altura da indução e a quantidade de tPA produzido. Verificou-se que a indução das células a uma densidade de 5×10^6 aumenta significativamente a concentração de tPA a ser segregado para o meio.

Análises

A concentração de tPA foi determinada usando várias

análises padrão incluindo HPLC, a análise S2251, imunoensaio de fluorescência de partículas (PCFIA) efectuado de acordo com o protocolo proporcionado pelo fabricante (Pandex Laboratories, Inc. Mundelein, Ill.), e o imunoensaio enzimático (EIA) efectuado substancialmente de acordo com o protocolo proporcionado pelo fabricante (American Diagnostica).

Usando a análise S2251, verificou-se que a actividade do tPA purificado era pelo menos igual à maior referida para a expressão em células de mamíferos.

A descrição e exemplos acima descrevem totalmente o invento, incluindo as suas concretizações preferidas. As modificações aos métodos descritos, que são óbvias para os entendidos em genética molecular e ciências relacionadas, encontram-se também no âmbito das reivindicações que se seguem.

-20-

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1 - Método de produção de tPA (activador de plasminogénio de tecido) em células de Drosophila, caracterizado por compreender a cultura de células de Drosophila transfectadas com uma unidade de expressão do gene de tPA, de tal forma que o tPA seja expresso e segregado, e a recolha do tPA segregado.

2 - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a unidade de expressão do gene de tPA estar integrada e se encontrar nas células de Drosophila em 10-1000 cópias por célula .

3 - Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por se utilizar um sistema de dois vectores em que um dos vectores tem inserida a sequência de codificação para DHFR (di-hidrofolato redutase) procariótico e o outro vector tem inserida a sequência de codificação para uma unidade de expressão do gene de tPA.

4 - Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por a célula de Drosophila ser co-transfectada com os vectores pDM100, contendo a unidade de expressão do gene de tPA, e pHGCO.

5 - Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por se utilizar um sistema de dois vectores em que um dos vectores tem inserida a sequência de codificação para higromicina B fosfotransferase e o outro vector tem inserida a sequência de codificação para uma unidade de expressão do gene de tPA.

6 - Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a célula de Drosophila ser co-transfectada com os vectores pDMtPA, contendo a unidade de expressão do gene de

tpA, e pCOHYGRO.

7 - Método de acordo com a reivindicação 1, 4 ou 6, caracterizado por as células de Drosophila serem células S₂.

8 - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o tPA ser segregado para o meio celular consumido, numa concentração de pelo menos 6 µg/ml.

9 - Método de expressão de um produto de gene heterólogo em Drosophila, caracterizado por compreender a co-transfecção de células de Drosophila com um vector contendo uma unidade de expressão do gene para o produto do gene, e um vector contendo o 5'LTR dum elemento COPIA integrado e um marcador de selecção de resistência a higromicina B fosfotransferase ou a metotrexato; a cultura das células transfectadas em condições que conduzam à expressão do produto do gene; e a recolha do produto do gene.

10 - Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por os vectores serem construídos com uma região reguladora da metalotioneína na unidade de expressão do gene e com uma sequência de codificação para DHFR.

11 - Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por os vectores serem construídos com uma região reguladora da metalotioneína na unidade de expressão do gene e com uma sequência de codificação para a higromicina B fosfotransferase.

12 - Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por um sistema de selecção usando resistência à higromicina B fosfotransferase permitir a co-selecção de células que expressam o produto do gene.

-22-

13 - Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por os vectores co-transfectados na célula de Drosophila conterem uma unidade de expressão do gene de tPA.

14 - Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por os vectores serem pCOHYGRO e pDMtPA.

15 - Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por um sistema de selecção para DHFR usando resistência a metotrexato permitir a co-selecção de células que expres_sam o produto do gene.

16 - Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por os vectores co-transfectados nas células de Drosophila conterem uma unidade de expressão do gene tPA.

17 - Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por os vectores serem pDM100 e pHGCO.

-5. MAI 1988
Lisboa,

Por SMITHKLINE BECKMAN CORPORATION

RD - O AGENTE OFICIAL -

O. B. S. D.

António Pissarra