



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0611405-9 A2**

(22) Data de Depósito: 24/05/2006
(43) Data da Publicação: 08/09/2010
(RPI 2070)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/505

(54) Título: **MÉTODO RECOMBINANTE PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA ESTIMULADORA DA ERITROPOESE**

(30) Prioridade Unionista: 24/05/2005 IN 627/CHE/2005

(73) Titular(es): AVESHA GENGRAINE TECHNOLOGIES PVT LTD

(72) Inventor(es): PATELL VILLOO MORAWALA

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT IB2006001353 de 24/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/126066de 30/11/2006

(57) Resumo: MÉTODO RECOMBINANTE PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA ESTIMULADORA DA ERITROPOESE. A presente invenção refere-se ao método recombinante usado para a produção de uma forma altamente glicosilada (no total cinco glicosilações ligadas ao N em vez de três glicosilações ligadas ao N na EPO natural) da eritropoetina. Os sítios acrescentados de glicosilação resultarão em um maior número de cadeias de carboidrato, em um conteúdo mais elevado de ácido siálico do que na EPO humana, o que por sua vez comunicaria à molécula recombinante uma meia-vida mais longa. A invenção também refere-se à construção de cassetes de expressão compreendendo a codificação de seqüências de ácidos nucleicos para uma forma altamente glicosilada da eritropoetina e sua expressão estável nas células hospedeiras. A invenção também se relaciona a um método otimizado de purificação da proteína estimuladora da eritropoese. A EPO recombinante de acordo com a presente invenção, e os sais e os derivados funcionais da mesma, podem compreender o componente ativo das composições farmacêuticas para um aumento na taxa de hematócrito para o tratamento da anemia e para a restauração do bem-estar e da qualidade de vida do paciente.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO RECOMBINANTE PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA ESTIMULADORA DA ERITROPOESE**".

CAMPO DE INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se ao método recombinante usado para a produção de uma forma altamente glicosilada (em total de cinco glicosilações ligadas ao N em vez de três glicosilações ligadas ao N, na EPO natural) de eritropoetina. Os sítios acrescentados de glicosilação resultarão em um maior número de cadeias de carboidrato, e em um mais elevado conteúdo de ácido siálico do que na EPO humana, o que por sua vez comunicaria à molécula recombinante uma meia-vida mais longa.

A invenção também refere-se à construção de cassetes de expressão compreendendo a codificação de seqüências de ácidos nucleicos para as formas altamente glicosiladas da eritropoetina e para uma expressão estável nas células do hospedeiro.

A presente invenção também refere-se ao método otimizado para purificação da proteína estimuladora da eritropoese.

A EPO recombinante de acordo com a presente invenção, e os sais e os derivados funcionais da mesma, podem compreender o componente ativo de composições farmacêuticas visando um aumento na taxa de hematócrito para o tratamento da anemia e para restauração do bem-estar e da qualidade de vida do paciente.

ANTECEDENTES DE ACORDO COM A PRESENTE INVENÇÃO.

25 A eritropoetina (EPO) é um hormônio glicoproteína que é o regulador primário de eritropoese ou da manutenção da massa de células vermelhas do sangue no corpo em um nível ótimo. Em resposta a uma redução na oxigenação dos tecidos, a síntese de EPO aumenta nos rins. O hormônio secretado se liga a receptores específicos na superfície dos precursores das células vermelhas do sangue existentes na medula óssea, levando à sua sobrevivência, proliferação, diferenciação e enfim a um aumento na taxa de hematócrito (proporção entre o volume ocupado pelas células vermelhas do sangue depositadas e o volume ocupado integralmente pelo sangue).

Desde a sua introdução há mais de uma década, a EPO recombinante humana (rHuEPO) se tornou o padrão para os cuidados no tratamento da anemia associada com a falência renal crônica (CRF). Ela é altamente eficaz na correção da anemia, na restauração dos níveis de energia, e na elevação do bem-estar e da qualidade de vida do paciente. Também foi aprovada para o tratamento da anemia associada com câncer, infecção da aids, e nos preparos cirúrgicos para reduzir a necessidade de transfusões sanguíneas alógenas.

A terapia recomendada e habitual com rHuEPO é feita duas para três vezes por semana por injeção subcutânea ou intravenosa. Para pacientes com CRF, a duração da terapia é por toda a vida do paciente, ou até que um transplante de rim bem-sucedido restaure a função renal, incluindo a produção de hormônio. Para pacientes de câncer, a terapia rHuEPO é indicada contanto que a anemia persista, geralmente por toda a duração da quimioterapia. Entretanto, a biodisponibilidade dos tratamentos terapêuticos usando proteínas comercialmente disponíveis, tal como a EPO, é bastante limitada pela sua curta meia-vida plasmática e suscetibilidade para a degradação por protease.

Assim, é um objetivo da presente invenção fornecer o método recombinante usado para a produção de isoformas da eritropoetina separadas e isoladas possuindo um conteúdo definido de ácido siálico, uma meia-vida mais longa e conseqüentemente, uma atividade biológica aumentada.

SUMÁRIO DE ACORDO COM A PRESENTE INVENÇÃO.

A presente invenção refere-se ao método recombinante usado para a produção de uma forma altamente glicosilada (no total cinco Glicosilações ligadas ao N ao em vez de 3 glicosilações ligadas ao N na EPO natural) de eritropoetina. Os sítios acrescentados de glicosilação resultarão em um maior número de cadeias de carboidrato, em um conteúdo mais elevado de ácido siálico do que na EPO humana, o que por sua vez poderia comunicar à molécula recombinante uma meia-vida mais longa.

Também fornecido pela presente invenção são novos biologicamente funcionais vetores de DNA de plasmídeo circulares e vitais que incor-

poram as seqüências de DNA de acordo com a presente invenção e hospedam organismos transformados ou transfectados de maneira estável com ditos vetores.

5 Analogamente são fornecidos pela presente invenção novos métodos para a produção de polipeptídios úteis compreendendo o crescimento cultivado de tais hospedeiros transformados e transfectados sob condições facultativas da expressão em larga escala das seqüências de DNA exógeno carregadas por vetor e o isolamento dos polipeptídios desejados do meio de crescimento, dos lisados celulares ou das frações de membranas celulares.

10 Um aspecto de acordo com a presente invenção pertence à construção de cassetes de expressão que compreendam a seqüências de ácidos nucléicos codificando a forma de eritropoetina altamente glicosilada.

Em comparação com a EPO não modificada e os conjugados convencionais de EPO-PEG, a proteína da presente invenção tem uma
15 meia-vida circulante e um tempo de residência no plasma aumentados, eliminação reduzida e atividade clínica aumentada *in vivo*. A EPO recombinante de acordo com a presente invenção, e os sais e os derivados funcionais da mesma, pode compreender o componente ativo de composições farmacêuticas destinadas ao aumento no valor do hematócrito para o tratamento
20 da anemia e para a restauração do bem-estar e da qualidade de vida do paciente.

Diversos aspectos e vantagens de acordo com a presente invenção serão evidentes para aqueles versados na técnica em consideração a seguinte descrição detalhada, que fornece ilustrações da prática de acordo
25 com a presente invenção em relação as suas modalidades atualmente preferidas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS E SEQUÊNCIAS:

SEQ ID Nº. 1: Seqüência de nucleotídeos que codifica a nova proteína estimuladora da eritropoese.

30 SEQ ID Nº. 2: Versão otimizada do códon da seqüência nucleotídeo que codifica a nova proteína estimuladora da eritropoese.

SEQ ID Nº. 3: Seqüências de aminoácidos da NESP ou darbe-

poietina alfa.

Figura 1: Alinhamento de seqüências pareadas das versões não otimizadas e otimizadas do códon das seqüências de DNA do nucleotídeo que codifica a nova proteína estimuladora da eritropoese.

5 Figura 2: Alinhamento de seqüência da seqüência novamente sintetizada do cDNA da proteína estimuladora da eritropoese (AVCIP-NESP-Opt) com a seqüência estabelecida e também otimizada da proteína estimuladora da eritropoese (sintética-NESP-Opt).

10 Figura 3: Alinhamento de seqüência da seqüência novamente sintetizada do cDNA da proteína estimuladora da eritropoese (AVCIP-NESP) com a seqüência estabelecida da proteína estimuladora da eritropoese (sintética-NESP).

Figura 4: Digestão de restrição do vetor e da inserção.

15 Figura 5: Fragmentos digeridos por restrição purificados em gel da AVCIP-NESP, AVCIP-NESP-Opt e da pcDNA3.1D/V5-His.

Figura 6: Análise da digestão por restrição dos supostos clones da AVCIPpcDNA3.1D/V5-His/NESP e da AVCIPpcDNA3.ID/V5-His/NESP-Opt.

20 Figura 7: Análise da digestão por restrição da AVCIPpcDNA3.1D/V5-His/NESP e dos clones da AVCIPpcDNA3.ID/V5-His/NESP-Opt utilizando enzimas que clivam interiormente os cDNAs das AVCIP-NESP e a AVCIPNesp-Opt.

25 Figura 8: Alinhamento de seqüência do clone nº 4 do cDNA da AVCIP-NESP-Opt (sintético-NESP-Opt) com a seqüência estabelecida do gene NESP-Opt.

Figura 9: Alinhamento de seqüência do clone nº 9 do cDNA da AVCIP-NESP (sintético-NESP) com a seqüência estabelecida do gene NESP.

30 Figura 10: Mapa construtor da AVCIPpcDNA3.1D/V5-His/NESP.

Figura 11: Mapa construtor da AVCIPpcDNA3.ID/V5-His/NESP-Opt.

Figura 12: pcDNA3.1/NESP (natural).

Figura 13: pcDNA3.1/NESP (sequência otimizada).

Figura 14: análise Western blot dos lisados celulares totais da linhagem das células CHO K1 transfectadas com pcDNA3.1/NESP (natural) ou com pcDNA3.1/NESP (sequência otimizada) e Aranesp® utilizando anti-
5 corpo de coelho anti hematopoietina humana (2 ug/ml).

Figura 15: Diagrama de Fluxo para o Desenvolvimento de Linhagem Celular Estável.

Figura 16: Fotos instantâneas das colônias que foram escolhidas para o desenvolvimento das linhagens celulares CHO K1 estáveis que expressam a darbepoietina alfa.
10

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO.

A presente invenção refere-se a um novo método recombinante alternativo para produção de isoformas da eritropoetina. As isoformas específicas da eritropoetina obtidas de acordo com a presente invenção, e as suas propriedades, podem variar dependendo da fonte do material de partida.
15 Em uma modalidade preferida, a invenção refere-se a um novo método recombinante alternativo para produção de isoformas da eritropoetina, que se diferenciam da eritropoetina recombinante humana (rHuEPO) e da EPO natural humana em cinco posições (Ala 30 Asn; His 32 Thr; Pro 87 Val; Trp 88
20 Asn e Pro 90 Thr).

O termo "isoformas da eritropoetina" tal como aqui utilizado refere-se a preparações de eritropoetina possuindo um único ponto isoelétrico (pI), e possuindo a mesma sequência de aminoácidos. O termo "eritropoetina", tal como aqui utilizado, inclui a ocorrência natural da eritropoetina, eritropoetina humana originária do trato urinário bem como os polipeptídeos de
25 ocorrência não natural possuindo uma sequência de aminoácidos e uma glicosilação suficientemente duplicável daquela eritropoetina de ocorrência natural para permitir a posse de propriedades biológicas *in vivo* para fazer com que as células da medula óssea aumentem a produção de reticulócitos e
30 células vermelhas do sangue.

De acordo com a presente invenção, as seqüências de DNA que codificam a forma altamente glicosilada da eritropoetina humana foram sinte-

tizadas por uma nova abordagem. Essa abordagem permitiria uma melhor otimização do códon em relação à determinada célula de mamífero a ser utilizada. Adicionalmente, o DNA sintético foi tornado o objeto da expressão eucariótica/procariótica fornecendo quantidades isoladas dos polipeptídios exibindo propriedades biológicas da eritropoetina (EPO) de ocorrência natural bem como tanto atividades biológicas *in vivo* como *in vitro* da EPO.

Os exemplos seguintes são apresentados como uma forma de ilustração de acordo com a presente invenção e são especificamente direcionados a procedimentos realizados antes da identificação dos clones de cDNA de macaco e dos clones genômicos humanos codificando a EPO, para os procedimentos que resultam de tal identificação, para o seqüenciamento, o desenvolvimento de sistemas de expressão e verificação imunológica da expressão da EPO em tais sistemas.

EXEMPLO 1:

Síntese da proteína recombinante estimuladora da eritropoese (NESP).

As seqüências de DNA que codificam a forma altamente glicosilada da eritropoetina humana foram sintetizadas por uma nova abordagem. Essa abordagem permitiu uma melhor otimização do códon em relação à determinada célula de mamífero a ser utilizada. Adicionalmente, o DNA sintético foi tornado o objeto da expressão eucariótica/procariótica fornecendo quantidades isoladas dos polipeptídios exibindo propriedades biológicas da eritropoetina (EPO) de ocorrência natural bem como tanto atividades biológicas *in vivo* como *in vitro* da EPO.

A seqüência de nucleotídeos que codifica a proteína estimuladora da eritropoese foi representada na SEQ ID Nº. 1. Os resíduos de nucleotídeo que foram alterados para incorporar sítios de glicosilação adicionais na dita proteína estimuladora da eritropoese em comparação com a transcrição que ocorre naturalmente do gene humano que codifica a eritropoetina foram destacados em letras maiúsculas.

Os códons na região de codificação da proteína estimuladora da eritropoese foram alterados como parte do processo de otimização de códon para assegurar a ótima expressão da proteína recombinante nas linhagens

de células de mamíferos tais como CHO K1 e HEK 293. A SEQ ID Nº. 2 representa a sequência nucleotídeo otimizada do códon que codifica a proteína estimuladora da eritropoese.

5 O alinhamento das sequências pareadas não otimizadas de otimizadas da sequência de nucleotídeos do códon que codifica a proteína estimuladora da eritropoese foi representada na figura nº. 1.

A SEQ ID Nº. 3 representa a sequência primária completa dos aminoácidos da proteína estimuladora da eritropoese de acordo com a presente invenção. Foram destacados os resíduos de aminoácidos da NESP
10 que foram alterados em comparação com a EPO humana que ocorre naturalmente.

EXEMPLO 2:

Verificação da autenticidade da sequência original novamente sintetizada do cDNA codificando a proteína estimuladora da eritropoese.

15 A verificação da autenticidade da sequência original (AVCIP-NESP) novamente sintetizada do cDNA e a sequência cDNA otimizada do códon (AVCIP-NESP-Opt) foi feita pelo seqüenciamento automatizado de DNA e os resultados obtidos estão representados nas figuras Nºs. 2 e 3.

EXEMPLO 3:

20 Subclonagem dos cDNAs da AVCIP-NESP e da AVCIP-NESP-Opt no vetor de expressão específico da célula pcDNA3.1D/V5-His de mamíferos.

A sequência original novamente sintetizada do cDNA (AVCIP-NESP) e a sequência do cDNA otimizada do códon (AVCIP-NESP-Opt) foram individualmente subclonadas no vetor de expressão específico de células de mamífero pcDNA3.1D/V5-His para gerar o construtor pronto para
25 transfecção. Os detalhes dos procedimentos utilizados são dados em baixo:

A. Reagentes e enzimas:

1. Kit de extração em gel e kit de purificação de PCR marca QIAGEN.
- 30 2. Vetor de DNA pcDNA3.1D/V5-His (Invitrogen).

Enzimas	U/ μ l	Tampão 10x
1. BamHI	10	Tampão E
2. XhoI	10	Tampão E
3. HindIII	20	Tampão C
4. XbaI	10	Tampão C
5. T4 DNA ligase	40	Tampão ligase

Todas as reações foram realizadas tal como recomendado pelo fabricante. Para cada reação o tampão de reação 10x fornecido foi diluído a uma concentração final de 1x.

5 **B. Digestão de restrição do vetor e da inserção:**

• **Procedimento**

As seguintes amostras de DNA e as enzimas de restrição foram usadas:

Amostras de DNA	Enzimas de Restrição
Rxn nº 1 Vetor (para NESP de clonagem)	BamHI/Xho I
Rxn nº 2 Vetor (para NESP-Opt de clonagem)	HindIII/Xba I
Rxn nº 3 pBSK/NESP (2A)	BamHI/Xho I
Rxn nº 4 pBSK/NESP-Opt (2B)	HindIII/Xba I

10 **Reação de digestão da enzima de restrição:**

Componentes	Conc. Final	Rxn nº1	Rxn nº2	Rxn nº3	Rxn nº4
Água	-	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Tampão 10x	1x	2 μ l	2 μ l	3 μ l	3 μ l
DNA	-	12 μ l	12 μ l	20 μ l	20 μ l
BamHI	0,5 U	1 μ l	-	1 μ l	-
XhoI	0,5 U	1 μ l	-	1 μ l	-
HindIII	1,0 U	-	1 μ l	-	1 μ l
XbaI	0,5 U	-	1 μ l	-	1 μ l
10x BSA	1x	2 μ l	2 μ l	3 μ l	3 μ l
Volume final	20 μ l	20 μ l	20 μ l	30 μ l	30 μ l

A reação foi agitada, centrifugada e incubada por 2 horas a 37°C. Digestão da restrição foi analisada por eletroforese em gel de agarose. O modelo de digestão esperado foi observado apresentando um fragmento de gene caindo em aproximadamente 600 bp (para Rxn nº 3 e 4) e um frag-

mento de cadeia principal do vetor de aproximadamente 5,5 kb para o Vetor (Rxn nº 1 e 2). (figura nº 4).

Os fragmentos de DNA de aproximadamente 600 bp que representam os cDNAs AVCIP-NESP e AVCIP-NESP-Opt foram purificados separadamente pelo método de extração em gel usando o kit de extração em gel
5 QIAGEN. Os fragmentos de aproximadamente 5,5 kb da cadeia principal do vetor digerida do vetor de expressão pcDNA3.1D/V5-His de mamífero também foram purificados usando o mesmo kit.

Posteriormente à digestão de restrição e a extração de gel do
10 cDNA e fragmentos de DNA vetoriais requeridos, uma alíquota (1 a 2 microlitros) de cada amostra de DNA purificada foi analisada usando eletroforese em gel de agarose para verificar a pureza e a integridade tal como mostrado na figura nº 5.

C. Ligação da cadeia principal da pcDNA3.1D/V5-His com os cDNAs da AV-
15 CIP-NESP e da AVCIP-Ovt-NESP:

A concentração de DNA digerido e purificado do vetor e dos fragmentos de inserção foi prevista e a ligação foi ajustada da seguinte maneira:

Componentes	Conc. Final	Rxn nº1 (AVCIP/NESP)	Rxn nº 2 (AVCIP-NESP-Opt)
Água	-	5 µl	5 µl
Tampão 10x Rxn	1x	2 µl	2 µl
Vetor	~50 ng	2 UI	2 UI
Inserção	~17 ng	1 µl	1 µl
T4 DNA ligase	40U	1 µl	1 µl
Volume final	10 µl	10 µl	10 µl

20 As reações foram suavemente agitadas, centrifugadas e incubadas na temperatura ambiente, por 2 a 3 horas. As células competentes JM109 foram transformadas com os conteúdos de misturas da reação de ligação.

D. Análise da digestão da restrição dos clones presumidos da AVCIPpcD-
25 NA3.1D/V5-His/NESP e da AVCIPpcDNA3.1D/V5-His/NESP-Opt.

O DNA do plasmídio foi individualmente purificado a partir das colônias obtidas em placas de ágar LB contendo ampicilina e a presença da

inserção do cDNA desejado foi confirmada pela análise da digestão da restrição do DNA do plasmídio isolado tal como mostrado na figura nº. 6.

De acordo com os resultados obtidos depois da digestão da restrição de vários clones presumidos contendo a AVCIPpcDNA3.1D/V5-His/NESP e AVCIPpcDNA3.1D/V5-His/NESP-Opt, alguns dos clones que mostraram o modelo de restrição desejado foram selecionados para uma análise da digestão da restrição adicional usando enzimas de restrição que clivam os cDNAs da AVCIP-NESP e da AVCIPNesp-Opt interiormente para gerar fragmentos de tamanho variável tal como mostrado abaixo na figura nº. 7.

E. Verificação do seqüenciamento do DNA dos clones selecionados da AVCIPpcDNA3.1D/V5-His/NESP e da AVCIPpcDNA3.1D/V5-His/NESP-Opt.

Os clones selecionados de DNA AVCIPpcDNA3.1D/V5-His/NESP e AVCIPpcDNA3.1D/V5-His/NESP-Opt como resultado da análise de mapeamento foram também verificados através de seqüenciamento automatizado de DNA.

Nomenclatura	Descrição dos iniciadores	Sequência
Iniciador de seqüenciamento T7	Kit iniciador da Invitrogen	5'TAATACGACTCACTATAGGG3'

Os clones AVCIPpcDNA3.1D/V5-His/NESP e AVCIPpcDNA3.1D/V5-His/NESP-Opt mostraram uma identidade de 100% com a sequência do padrão, tal como mostrado nas figuras nº. 8 e nº. 9.

Os mapas dos construtores da expressão recombinante produzidos utilizando os cDNAs das AVCIP-NESP e AVCIP-NESP-Opt novamente sintetizado são figurativamente representados nas figuras nº. 10 e nº. 11.

EXEMPLO 4:

25 Manutenção e propagação dos construtores de fusão do cDNA.

A manutenção e a propagação dos construtores do cDNA codificando a nova proteína estimuladora da eritropoese foi realizada em uma linhagem celular bacteriana padrão classificada como Top 10 (Invitrogen).

EXEMPLO 5:

30 Expressão transiente/estável da proteína recombinante em células CHO-K1.

(a) Expressão transiente da proteína estimuladora da eritropoese em células CHO K1:

O protocolo otimizado para a transfecção do DNA do plasmídio foi usado para transfectar as células CHO com:

- 5 1. pcDNA3.1/NESP (natural).
 2. pcDNA3.1/NESP (sequência otimizada).

Protocolo 1:

Transfecção transiente das células aderentes CHO K1.

- 10 1. No dia anterior à transfecção, semear 1×10^5 células por cavidade em uma placa de 24 cavidades em 1 ml de meio de crescimento (D-MEM/F 1:1). O número de células semeadas deve produzir uma confluência de 80% no dia da transfecção.

2. Incubar as células sob suas condições normais de crescimento (geralmente 37°C e 5% de CO₂).

- 15 3. No dia da transfecção, no Tubo A diluir 2 µg de DNA dissolvidos em tampão TE de pH 7,0 a pH 8,0 (concentração mínima de DNA: 0,1 µg/µl) com Opti-MEM® a um volume total de 100 µl. Agitar e centrifugar a solução durante alguns segundos para retirar as gotas do topo do tubo.

- 20 4. No Tubo B, adicione 6 µl do reagente de transfecção Lipofectamina® 2000 em 100 µl de Opti-MEM® e deixar na temperatura ambiente durante 5 minutos.

5. Misturar os conteúdos do tubo A e do tubo B por pipetagem de cima para baixo por 5 vezes.

- 25 6. Incubar as amostras durante 15 minutos na temperatura ambiente (15°C a 25°C) para permitir a formação do complexo de transfecção.

7. Enquanto ocorre a formação do complexo, aspire suavemente o meio de crescimento da placa, e lave as células uma vez com 2 ml de PBS.

- 30 8. Acrescentar 0,1 ml de células Opti-MEM® ao tubo de reação contendo os complexos de transfecção. Misturar por pipetagem de cima para baixo duas vezes, e imediatamente transferir o volume total para as células de um cavidade da placa de 24 cavidades.

9. Incubar as células com os complexos transfecção durante 6 horas nas suas condições normais de crescimento.

10. Retirar o meio contendo os complexos restantes das células por aspiração suave, e lavar as células uma vez com 4 ml de PBS (salina tamponada por fosfato).

11. Acrescentar o meio de crescimento de células frescas (contendo soro e antibióticos). Realizar o ensaio para expressão do gene transfectado após um tempo adequado de incubação.

Essas células transfectadas foram coradas com anticorpo anti-eritropoietina para avaliar a expressão da proteína. Tal como representado nas figuras nºs. 12 e 13, a expressão específica da proteína acima citada foi detectada em ambos os conjuntos de experimentos de transfecção transientes representando as linhagens das células CHO K1 independentemente transfectadas com a pcDNA3.1/NESP (natural) e a pcDNA3.1/NESP (sequência otimizada).

(b) Detecção da expressão transiente da proteína estimuladora da eritropoese na linhagem das células CHO K1 transfectadas por Western blot.

Os lisados celulares totais foram preparados das linhagens celulares CHO K1 que foram independentemente transfectadas com o pcDNA3.1/NESP (natural) ou com pcDNA3.1/NESP (sequência otimizada). Os ditos lisados celulares foram preparados 48 horas depois do evento de transfecção e duas quantidades diferentes da preparação de proteína total (10 g e 20 g) dos lisados celulares foram submetidos a eletroforese em SDS-PAGE a 12% antes da coloração em uma membrana PVDF. A membrana PVDF então foi testada com 2 g/ml do anticorpo de coelho antieritropoietina humana e o resultado obtido é mostrado na figura nº. 14.

Tal como fica evidente da figura 8, a presença da proteína estimuladora da eritropoese foi especificamente descoberta nos lisados celulares totais da linhagem das células CHO K1 transfectadas com o pcDNA3.1/NESP (natural) ou com pcDNA3.1/NESP (sequência otimizada) nas mais altas concentrações usadas (~20 g) das preparações de proteína. A mobilidade electroforética da dita proteína estimuladora da eritropoese pre-

sente nos lisados celulares das células CHO K1 foi avaliada como combinando com a observada no caso da formulação terapêutica, Aranesp®, indicando assim a natureza hiperglicosilada esperada da proteína recombinante expressada.

5 (c) Desenvolvimento de linhagens celulares CHO K1 estáveis expressando a proteína estimuladora da eritropoese

Conhece-se que a integração do DNA no cromossomo, ou manutenção do epissoma estável, de genes repórteres e outros genes ocorre com uma frequência relativamente baixa. A capacidade de selecionar para
10 essas células somente pode ocorrer pela utilização de genes que codifiquem resistência a um fármaco letal. Um exemplo de tal combinação é o gene marcador para a neomicina fosfotransferase com o fármaco Geneticina®. As células individuais que sobrevivem ao tratamento do fármaco expandem-se em grupos clônicos que podem ser individualmente selecionados, propaga-
15 dos e analisados. Um diagrama de fluxo que representa as etapas implicadas no desenvolvimento da linhagem estável é mostrado na figura nº. 15.

Protocolo 2:

Transfecção estável de células CHO K1 aderentes.

1. No dia anterior à transfecção, semear 1×10^5 células por ca-
20 vidade em uma placa de 24 cavidades em 1 ml de meio de crescimento (DMEM/F 1:1). O número de células semeadas deve produzir uma confluência de 80% no dia da transfecção.

2. Incubar as células sob suas condições normais de crescimento (geralmente 37°C e 5% de CO₂).

25 3. No dia da transfecção, no Tubo A diluir 2 µg de DNA dissolvidos em tampão TE de pH 7,0 a pH 8,0 (concentração mínima de DNA: 0,1 µg/µl) com Opti-MEM® a um volume total de 100 µl. Agitar e centrifugar a solução durante alguns segundos para retirar as gotas do topo do tubo.

4. No Tubo B, adicione 6 µl do reagente de transfecção Lipofectamina® 2000 em 100 µl de Opti-MEM® e deixar na temperatura ambiente
30 durante 5 minutos.

5. Misturar os conteúdos do tubo A e do tubo B por pipetagem

de cima para baixo por 5 vezes.

6. Incubar as amostras durante 15 minutos na temperatura ambiente (15°C a 25°C) para permitir a formação do complexo de transfecção.

7. Enquanto ocorre a formação do complexo, aspire suavemente o meio de crescimento da placa, e lave as células uma vez com 2 ml de PBS.

8. Acrescentar 0,1 ml de células Opti-MEM® ao tubo de reação contendo os complexos de transfecção. Misturar por pipetagem de cima para baixo duas vezes, e imediatamente transferir o volume total para as células de um cavidade da placa de 24 cavidades.

9. Incubar as células com os complexos transfecção durante 6 horas nas suas condições normais de crescimento.

10. Retirar o meio contendo os complexos restantes das células por aspiração suave, e lavar as células uma vez com 4 ml de PBS.

11. Acrescentar o meio de crescimento de células frescas (contendo soro e antibióticos). Realizar o ensaio para expressão do gene transfectado após um tempo adequado de incubação.

12. Passagem das células no meio seletivo apropriado de 1:10 a 1:15. Manter as células no meio seletivo nas suas condições normais de crescimento até que as colônias apareçam.

EXEMPLO 6:

Seleção de linhagem de células CHO K1 estáveis expressando a proteína estimuladora da eritropoese.

Células CHO transientemente expressando transfectadas ou com pcDNA3.1/NESP (natural) ou com pcDNA3.1/NESP (sequência otimizada) foram tripsinizadas e diluídas em um meio de seleção contendo 1 mg/ml de Geneticina®. As células foram incubadas durante 14 dias no meio de seleção até que as colônias pudessem ser isoladas (figuras 2A e 2B abaixo). No total, 89 colônias de pcDNA3.1Nesp (natural) e 91 colônias pcDNA3.1Nesp (Sequência otimizada) foram pescadas em condições estéreis e semeadas em placa em um único cavidade por colônia de uma placa de 96 cavidades.

O Avesthagen selecionou 89 colônias de CHO K1/pcDNA3.1/NESP (natural) e 91 colônias de CHO/pcDNA3.1/os-NESP (Sequência otimizada) para desenvolver linhagens de células de produtoras que sobreexpressem a proteína estimuladora da eritropoese. Todas as colônias de células CHO K1 selecionadas até aqui serão analisadas por imuno-
fluorescência, Western blot, ELISA e ensaios funcionais de base celular de modo a gerar uma única linhagem celular CHO K1 produtora, derivada de células, que expressem de maneira estável a Proteína estimuladora da eritropoese de acordo com a presente invenção.

10 EXEMPLO 7:

Purificação de nova proteína estimuladora da eritropoese.

A qualidade e a biossegurança de um composto biofarmacêutico são dependentes, em grande escala, dos procedimentos de extração usados para produzir o produto purificado. De um lado, o processamento a jusante tem que assegurar um isolamento eficaz e econômico do produto desejado do caldo de cultura ou do material celular obtido durante o processo de cultivo da célula. Entretanto, por outro lado, os componentes que contaminariam o produto final devem ser separados de modo confiável. Os diferentes tipos de componentes que não devem estar presentes na formulação do produto final têm de ser retirados durante essas etapas.

O primeiro grupo compreende as impurezas derivadas do meio ou derivadas do processo que podem ser de natureza protéica ou não protéica (por exemplo, lipídios, agentes antiespumantes, antibióticos). Este grupo também inclui as impurezas derivadas da célula hospedeira tais como proteínas, que poderiam induzir respostas imunes indesejáveis, ou ácidos nucleicos, que são a principal preocupação porque eles poderiam abrigar uma informação genética potencialmente perigosa quando incorporados dentro de células humanas saudáveis. O segundo grupo compõe-se de agentes e contaminantes ocasionais e compreendem vírus, partículas semelhantes a um vírus (VLPs), bactérias, fungos, micoplasmas e assim por diante.

A remoção de componentes do meio e de impurezas protéicas é uma parte integrante do isolamento do produto. Os procedimentos aponta-

dos para a remoção de suplementos do meio, tais como antibióticos ou substâncias citotóxicas (por exemplo, genitcina ou metotrexato) serão incorporados na estratégia de purificação e os testes adequados serão estabelecidos de modo a validar suas eficiências. Algumas impurezas tais como o

5 DNA, podem ser reduzidas através de uma escolha cuidadosa das condições de colheita e de cultivo. Como por razões práticas, não é possível fabricar um produto 100% puro, foram definidos níveis de concentração aceitáveis da presença de impurezas na formulação do produto final. Por exemplo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu a quantidade máxima

10 aceitável de DNA como sendo de 100 pg por dose única de um fármaco protéica biotecnologicamente derivada. O potencial de desativação de agentes ocasionais durante a etapa de purificação pode ser explorado ou podem ser incluídas etapas adicionais de desativação, dentro da estratégia de purificação. Os vírus e as VLPs, por exemplo, podem ser tornados inativos pela a-

15 plicação de produtos químicos desativantes (por exemplo, N-acetiletilenoimina, Tri-N-butilfosfato)¹⁰, solventes orgânicos, sais caotrópicos, valores de pH extremos, irradiação, e assim por diante. O tratamento de temperatura realizado pela aplicação da tecnologia de microondas também foi mostrado como desativador de vírus. Apesar de tudo o que foi acima

20 mencionado, o potencial da tecnologia escolhida para inativação permanece dependendo de validação, e essa validação também tem que comprovar que o método de inativação não prejudica a integridade do produto.

A proteína EPO humana madura é compreendida por uma sequência invariável de 165 aminoácidos, que é derivada de um precursor com

25 193 aminoácidos em duas etapas. O N terminal do aminoácido 27 líder da sequência é clivado antes da secreção do hormônio e o C terminal-Arg é proteoliticamente retirado por uma carboxipeptidase endógena. Posteriormente ao estabelecimento de um sistema de cultivo de célula sem contaminantes de acordo com as linhas guias das agências reguladoras, que sobre

30 expressa a proteína recombinante desejada, a purificação da nova proteína estimuladora da eritropoese da proteína pode ser feita usando uma série de etapas que implicam em filtração por diálise e procedimentos com colunas

de cromatografia que implicam em matrizes de resinas troca-íon aniônicas e resinas de fase reversa. As frações contendo os glicanos mais altamente ramificados e as mais elevadas concentrações de ácido siálico serão recuperadas para maximizar a atividade *in vivo*.

5 **EXEMPLO 8:**

Otimização dos procedimentos de purificação.

Posteriormente ao estabelecimento da bioatividade reprodutível de acordo com os ensaios recomendados de funcionalidade/ligação acima mencionados, serão realizados esforços para otimizar os procedimentos de purificação e maximizar o rendimento da NESP recombinante da linhagem celular estável, de alta expressão. As estratégias de purificação apontarão para a economia do processo, velocidade de comercialização, escalabilidade, reprodutibilidade, e máxima pureza do produto com estabilidade funcional e integridade estrutural sendo os objetivos principais. Para esse efeito, uma abordagem combinatória pelo uso tanto da filtração (filtração de fluxo normal e de fluxo tangencial) como da cromatografia seria explorada. As exigências de qualificação do processo e os estudos dos critérios de aceitação serão conduzidos em 3 bateladas.

A purificação da proteína utilizando o componente glicano da glicoproteína como um alvo de captura é comumente realizada utilizando cromatografia de afinidade. As matrizes mais comuns são o ácido m-aminofenilborônico em agarose e as lecitinas imobilizadas, do tipo Concanavalin A em Sepharose (Com A Sepharose) e a aglutinina do germe de trigo em Sepharose (WGA - Sepharose). Dos tipos acima citados, as matrizes de ácido m-aminofenilborônico em agarose são capazes de formar ligações temporárias com qualquer molécula contendo um grupo 1,2-cis-diol enquanto que as matrizes Com A se ligam especificamente a resíduos manosil e resíduos glicosil contendo grupos hidroxila não modificados nas posições C3, C4 e C6. As matrizes de WGA Sepharose são altamente específicas para os resíduos N-acetil glicosamina (NAG) ou ácido N-acetil neuramínico (NANA ou ácido siálico) da glicoproteína.

Conseqüentemente, o processo de purificação compreende o

seguinte fluxo a jusante:

a. clarificação e concentração inicial utilizando procedimentos de filtração de fluxos normais e tangenciais.

5 b. ultra filtração/filtração de Diálise (baseado em filtração de fluxo tangencial).

c. etapa de cromatografia - I: cromatografia de afinidade usando matrizes a base de lectina/m-amino fenil. O meio de afinidade baseado no ligante m-amino fenil seria mais preferido.

10 d. etapa de cromatografia - II: cromatografia de troca iônica (IEX) usando a Q-Sepharose para troca aniônica.

e. etapa de cromatografia - III: cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) usando butil – Sepharose.

f. remoção de vírus e filtração estéril.

g. remoção de endotoxina.

15 h. formulação.

Observação: a sequência de operações unitárias durante as etapas de cromatografia pode ser alterada para uma mais alta pureza e recuperação máxima de produto. O resultado do processo de purificação em cada etapa será avaliado quanto à integridade estrutural e funcional da proteína pela utilização de métodos físico-químicos e imunológicos.

20 Em outra modalidade preferida, o processo de purificação apontaria para a captura direta da proteína alvo a partir do caldo de cultura bruto pelo uso de resina de troca aniônica pela metodologia de adsorção em leito expandido em contraste com a metodologia convencional de leito empacotado e compreenderia as seguintes etapas:

a. cromatografia de troca aniônica usando Q-Sepharose XL através de uma etapa de eluição em sal como etapa de captura.

b. cromatografia e Interação Hidrofóbica (HIC) usando butil-Sepharose.

30 c. uma segunda cromatografia de troca aniônica utilizando a resina Resource-Q como uma etapa de polimento.

d. remoção de vírus e filtração estéril.

e. remoção de endotoxinas.

f. formulação.

Mais preferivelmente, um processo de purificação em duas etapas usando a cromatografia de troca aniônica e a HIC seria empregado como as etapas principais de cromatografia dependendo da porcentagem de produto recuperado e da pureza. As etapas posteriores então seguiriam como esboçado nas estratégias acima mencionadas.

Observação: uma etapa adicional de lavagem ácida pode ser incorporada depois da etapa de captura aniônica nas estratégias esboçadas acima, dependendo da eficiência de captura para um enriquecimento seletivo das isoformas do ácido pl com altas concentrações de glicosil e sialil e para a remoção de proteínas básicas contaminantes não relacionadas. Adicionalmente, o fluxo através de resinas a base de troca aniônica tal como sulfato de celulose será usado para a ligação seletiva dos contaminantes do processo, dos endógenos ou dos vírus ocasionais e dos extraíveis por coluna.

EXEMPLO 9:

Estabelecimento da identidade da proteína alvo usando métodos bioquímicos, imunológicos e físico-químicos.

O percentual de recuperação da proteína total em cada etapa será quantificada usando o procedimento do método de ligação do ácido bicínico (BCA)/corante de Bradford. A concentração da proteína alvo em cada etapa da purificação será tentada usando imunoenaios baseados em enzimas altamente específicas e confiáveis ou através da reação ELISA na forma de sanduíche direto ou indireto. Mais preferivelmente, uma reação ELISA de sanduíche de duplo anticorpo seria adaptada para avaliar as concentrações da proteína alvo. Como a NESP é uma glicoproteína, uma avaliação qualitativa do grau de glicosilação será examinada usando procedimentos corantes específicos para a detecção de glicoproteína por eletroforese em gel SDS sob condições redutoras. Análises Western blot qualitativas específicas serão realizadas a cada etapa. A cromatografia de fase reversa, de focagem isoeletrica e eletroforese bidimensional em gel será empregada

para avaliar o produto purificado. A análise estrutural secundária seria examinada usando o dicroísmo circular do UV distante. A massa molecular e a situação oligomérica serão investigadas usando os sistemas de exclusão de tamanho e MALDI-TOF. As investigações também se concentrarão na estabilidade da proteína em relação ao pH e a temperatura. Como a NESP é uma proteína hiperglicosilada, os padrões de glicosilação da proteína purificada seriam documentados usando a análise de cromatografia a gás (CG).

EXEMPLO 10:

Ensaio para avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade da nova proteína estimuladora da eritropoese.

Os bioensaios para detectarem a ligação do receptor da EPO *in vitro* para a nova proteína estimuladora da eritropoese serão realizados usando:

(a) a ligação competitiva usando a nova proteína estimuladora da eritropoese marcada com I^{125} .

(b) a absorção da timidina- $^3[H]$ usando uma linhagem celular humana recomendada tal como a Ut7/EPO.

A bioatividade pré-clínica *in vivo* (capacidade de restauração ao hematócrito normal) da nova proteína estimuladora da eritropoese será testada em linhagens recomendadas de rato tal como a BDF1.

Listagem de Sequência

<110> Avestha Gengraine Technologies Pvt Ltd
Morawala Patell, Vilho

<120> MÉTODO RECOMBINANTE PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA ESTIMULADORA DA ERITROPOESE

<130> 1

<150> 627/CHE/2005

<151> 2005-05-24

<160> 3

<170> versão 3.3 da patente

<210> 1

<211> 582

<212> DNA

<213> humano

<400> 1

```

atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct    60
ctgggectcc cagtcctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag    120
aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatattcaga cgggctgtaa tgaacgtgc    180
agcttgaatg agaatatcac tgtcccagac accaaagtta atttctatgc ctggaagagg    240
atggaggctc ggcagcaggc cgtagaagtc tggcagggcc tggccctgct gtcggaagct    300
gtcctgcggg gccaggccct gttggctcaac tcttccagg tgaatgagac cctgcagctg    360
catgtggata aagccgtcag tggccttcgc agcctcacca ctctgcttcg ggctctggga    420
gccagaagg aagccatctc cctccagat gcggcctcag ctgctccact ccgaacaatc    480
actgctgaca ctttccgcaa actcttccga gtctactcca atttctccg gggaaagctg    540
aagctgtaca caggggaggc ctgcaggaca ggggacagat ga                    582

```

<210> 2

<211> 582

<212> DNA

<213> humano

<400> 2

```

atgggctgtc acgagtgtcc cgcttggttc tggctgtgtc tgtccctctt gtccttacc    60
ctcgggtctc cgtgtgtggg cgcgccccca cgcctgatct gtgactcccg agtgtctgag    120
cgtacctgc tggaggcgaa ggaggccgag aacatcacca cgggctgtaa cgagacctgt    180
tctctgaacg agaacatcac cgtgcccagc accaagggtga acttctacgc ctggaagaga    240
atggaggtag gccagcaggc cgtcgagggt tggcagggtc tggcgttgct gtccgaagcc    300
gtgtctccgc gccaggccct gctggtgaac tccagtcagg tgaacgaaac actccagctc    360
catgtggaca aggcggtgtc cggcttgagg tcgctgacaa ccttctgag cgccttggga    420

```

gcgcagaagg aggccattag tccccggac gccgcctcgg ctgccccctt gcgaaccatc 480
 accgcggaca ccttcggaa gctgttcgc gtctactcga actttctccg cgggaagctg 540
 aaattataca cgggggaggc ctgccgcacc ggcgatcgct ga 582

<210> 3
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> humano

<400> 3

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Asn Glu Thr Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Val Asn Glu Thr Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

~~Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu~~
~~130 135 140~~

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para preparação de uma proteína estimuladora da eritropoese biologicamente ativa *in vivo*, compreendendo as etapas de:

(a) crescimento, em condições nutritivas adequadas, das células hospedeiras transformadas ou transfectadas com uma sequência de DNA isolada selecionada do grupo consistindo em (i) as seqüências de DNA estabelecidas nas SEQ ID Nº.1 e SEQ ID Nº. 2, (ii) a proteína codificando a sequência representada na SEQ ID Nº. 3, e (iii) as seqüências de DNA que hibridizam sob condições estridentes com as seqüências de DNA definidas em (i) e (ii) ou com as suas fitas complementares; e

(b) isolamento da dita eritropoetina produzida a partir das mesmas.

2. Processo para a preparação de um produto biologicamente ativo *in vivo* da eritropoetina compreendendo as etapas de transformar uma célula hospedeira com uma sequência sintetizada de DNA codificando a sequência de aminoácidos da eritropoetina de acordo com a SEQ ID Nº. 3 e o isolamento da dita eritropoetina produzida a partir da dita célula hospedeira ou do seu meio de crescimento.

3. Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2 em que as ditas células hospedeiras são células de mamíferos.

4. Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2 em que as ditas células hospedeiras são preferivelmente células CHO K1.

5. Processo para produção de um polipeptídio glicosilado da eritropoetina possuindo propriedades biológicas *in vivo* de fazer as células de medula óssea aumentarem a produção de reticulócitos e células vermelhas do sangue compreendendo as etapas de:

a) crescimento, sob condições nutritivas adequadas, das células de mamíferos compreendendo o DNA promotor, outro DNA promotor da eritropoetina diferente do ser humano, operacionalmente ligado ao DNA codificando a sequência de aminoácidos da eritropoetina madura da SEQ ID Nº. 3; e

b) isolamento do dito polipeptídio glicosilado da eritropoetina ex-

pressado pelas ditas células.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5, em que o dito DNA promotor é um DNA promotor viral.

5 7. Processo para a preparação de um produto biologicamente ativo *in vivo* da eritropoetina compreendendo as etapas de transformar uma célula hospedeira com um vetor de construção das figuras nº. 10 ou nº. 11 e o isolamento da dita eritropoetina produzida a partir da dita célula hospedeira ou do seu meio de crescimento.

10 8. Processo de acordo com a reivindicação 7, em que o dito vetor é um vetor de expressão específico de células de mamíferos e mais preferivelmente um vetor tal como representado nas figuras nº. 10 e nº. 11.

15 9. Composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz da eritropoetina humana e um diluente, adjuvante ou veículo, farmacêuticamente aceitáveis em que a dita eritropoetina é purificada de células de mamíferos cultivadas em meio de cultura.

20 10. Método de elevação e manutenção do nível de hematócrito em um mamífero compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo hiperglicosilado de eritropoetina em uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 9, em que o análogo é administrado menos freqüentemente do que uma quantidade equivalente molar da eritropoetina humana recombinante para obter um nível objetivo comparável de hematócrito.

Figura 1:
Alinhamento da sequência pareada das versões não otimizada e otimizada do códon da sequência de nucleotídeos do DNA que codificam a mova proteína estimuladora de eritropoiese

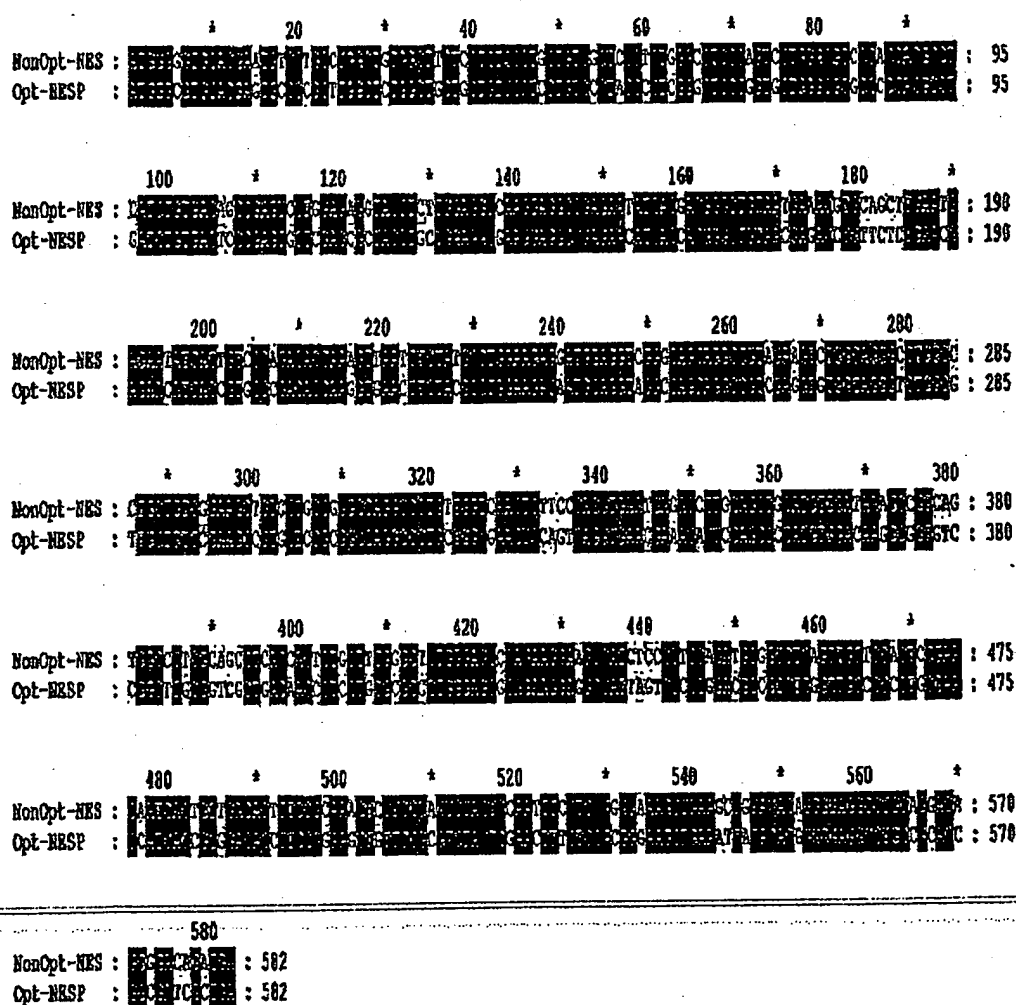


Figura 2:
Sequência de alinhamento do cDNA da AVCIP-Nesp-Opt (Nesp-Opt – sintético) novamente sintetizado com a sequência estabelecida do gene Nesp-Opt.

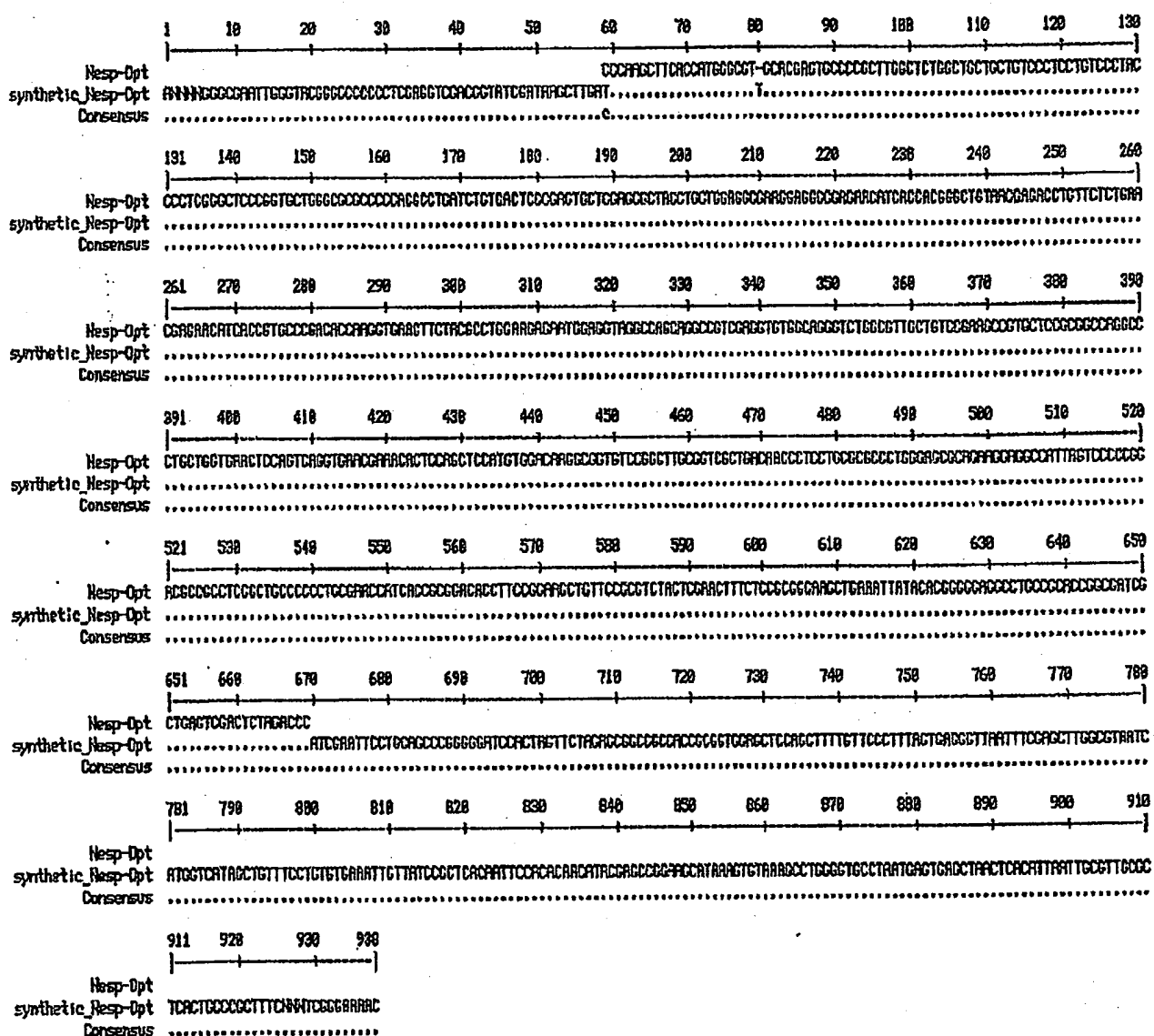


Figura 3:

Sequência de alinhamento do cDNA da AVCIP-Nesp (Nesp– sintético) novamente sintetizado com a sequência estabelecida do gene Nesp.

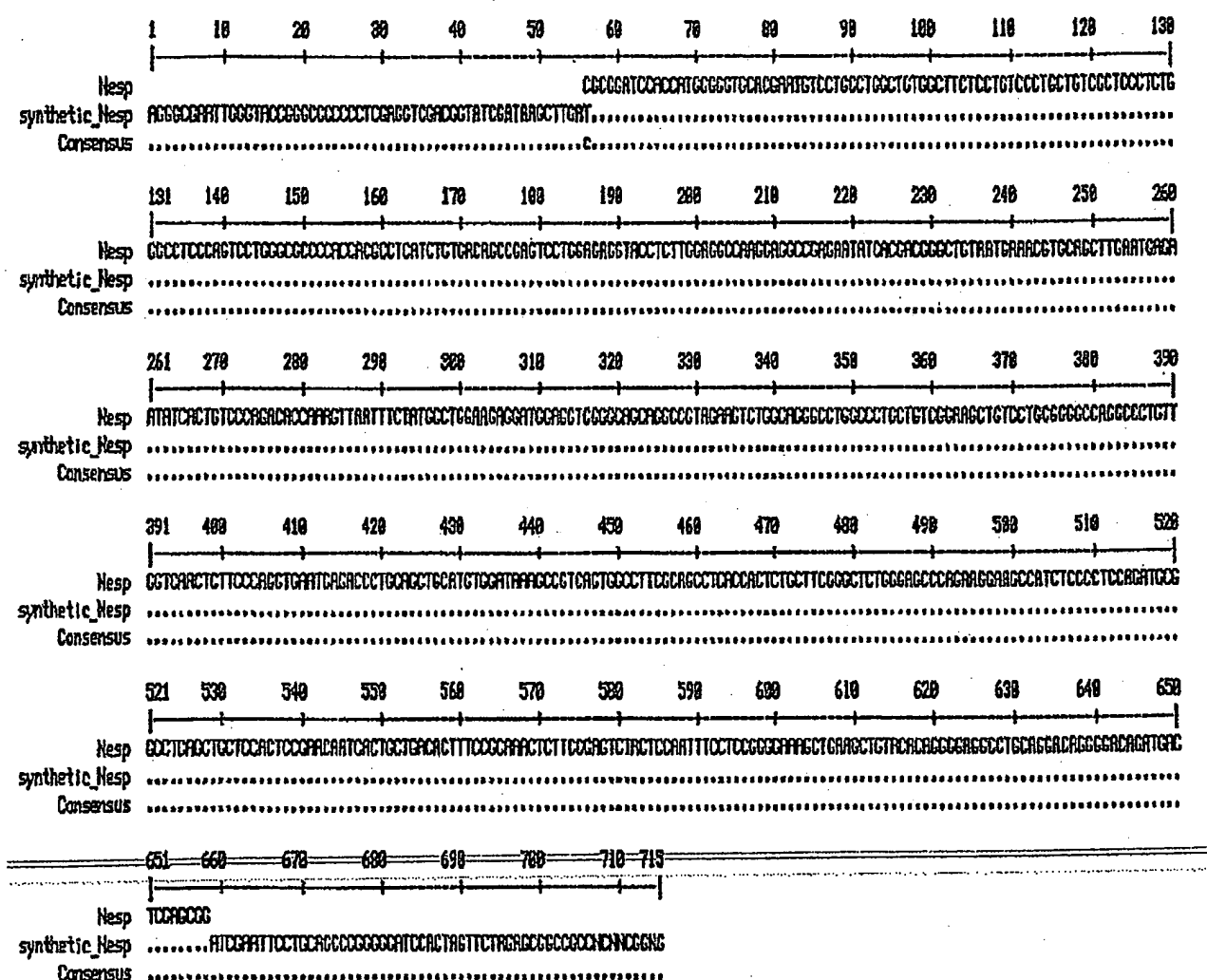
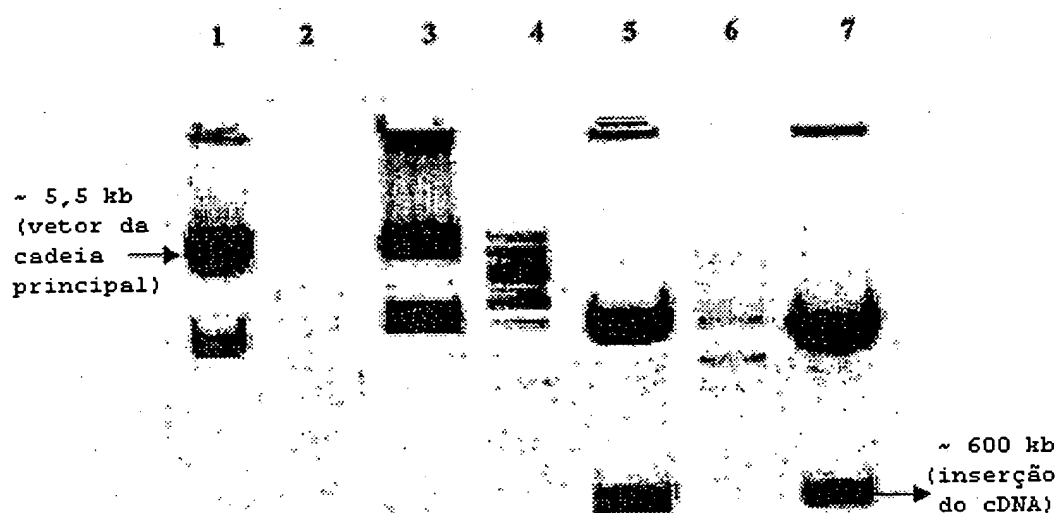
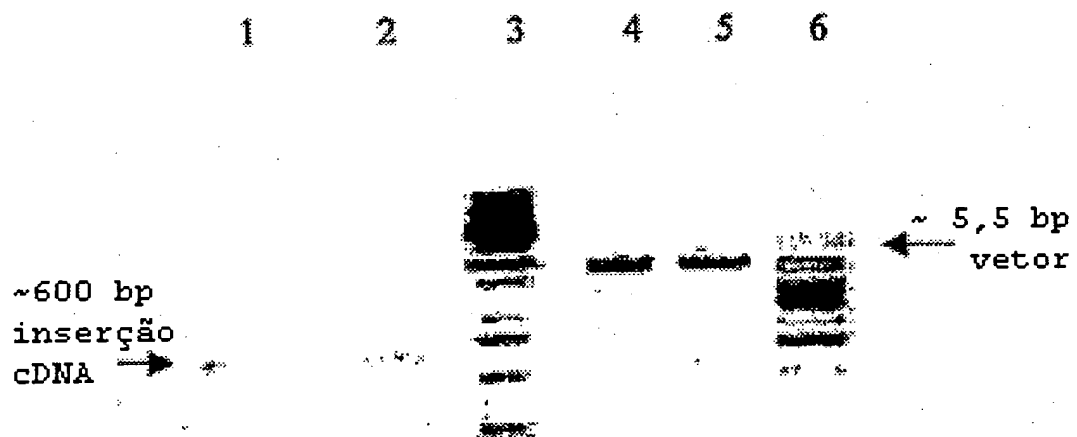


Figura 4:
Digestão da restrição do vetor e da inserção.



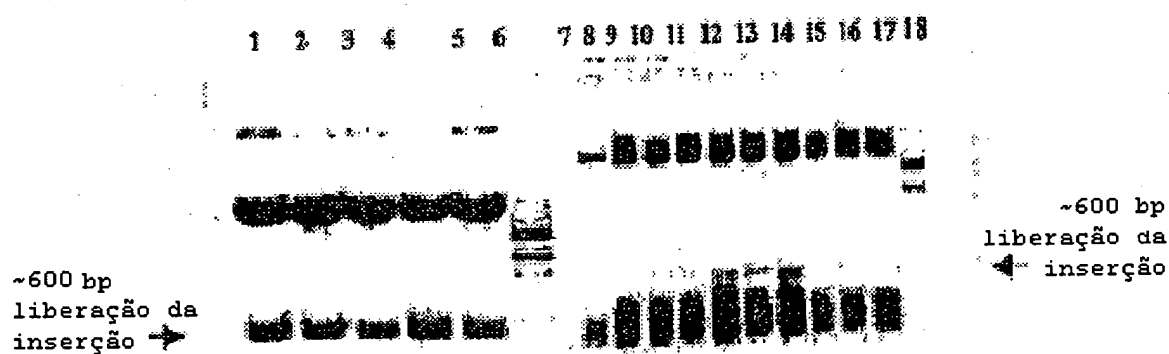
Faixa 1: pcDNA3.1D / V5-His-HindIII / XbaI.
 Faixa 2: cadeia de 1 kb (marcador de DNA).
 Faixa 3: pcDNA3.1D / V5-His-BamHI / XhoI.
 Faixa 4: cadeia de 1 kb (marcador de DNA).
 Faixa 5: pBSK / Nesp-BamHI / XhoI.
 Faixa 6: cadeia de 1 kb (marcador de DNA).
 Faixa 7: pBSK / Nesp-Opt-HindIII / XbaI.

Figura 5:
Fragmentos digeridos das restrições de AVCIP-Nesp,
AVCIP-Nesp-Opt e pcDNA3.1D/V5-His.



- Faixa 1: AVCIP-Nesp / BamHI/XhoI - purificado em gel.
 Faixa 2: AVCIP-Nesp-Opt/ HindIII/XbaI – purif. em gel.
 Faixa 3: cadeia de 1 kb (marcador de DNA).
 Faixa 4: pcDNA3.1D/V5-His /BamHI/XhoI – purif. em gel.
 Faixa 5: pcDNA3.1D/V5-His /HindIII/XbaI – purif. gel.
 Faixa 6: cadeia de 1 kb (marcador de DNA).

Figura 6:
Análise da digestão da restrição dos clones presumidos
da AVCIPpcDNA3. 1D/V5-His/Nesp e da AVCIPpcDNA3.
1D/V5-His/Nesp-Opt.



Faixas 1 a 5: clones AVCIPpcDNA3.1D / V5-His / Nesp-Opt - HindIII/XbaI digeridos.

Faixa 6: cadeia de 1 kb (marcador de DNA).

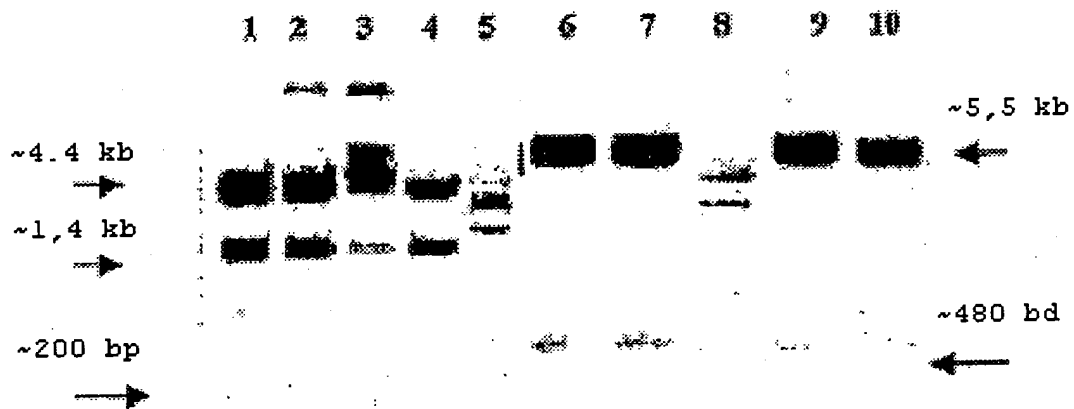
Faixas 7 a 16: clones AVCIPpcDNA3.1D / V5-His / Nesp - BamHI/XhoI digeridos.

Faixa 17: cadeia de 1 kb (marcador de DNA).

Faixa 18: controle +ve (inserção).

Figura 7:

Análise da digestão da restrição dos clones da AVCIPpcDNA3.1D/V5-His/Nesp e da AVCIPpcDNA3.1D/V5-His/Nesp-Opt usando enzimas de clivagem internamente o cDNA das AVCIP-Nesp e AVCIP-Nesp-Opt.



Faixas de 1 a 4: clones AVCIPpcDNA3.1D / V5-His / Nesp - digestão PstI.

Faixa 5: cadeia de 1 kb (marcador de DNA).

Faixas 6, 7, 9 e 10: clones AVCIPpcDNA3.1D / V5-His / Nesp-Opt - digestão ApaI/XhoI.

Faixa 8: cadeia de 1 kb (marcador de DNA)

Figura 8:

Sequência de alinhamento do clone nº 4 do cDNA (Nesp-Opt sintético) da AVCIP-Nesp-Opt com a sequência estabelecida do gene Nesp-Opt.

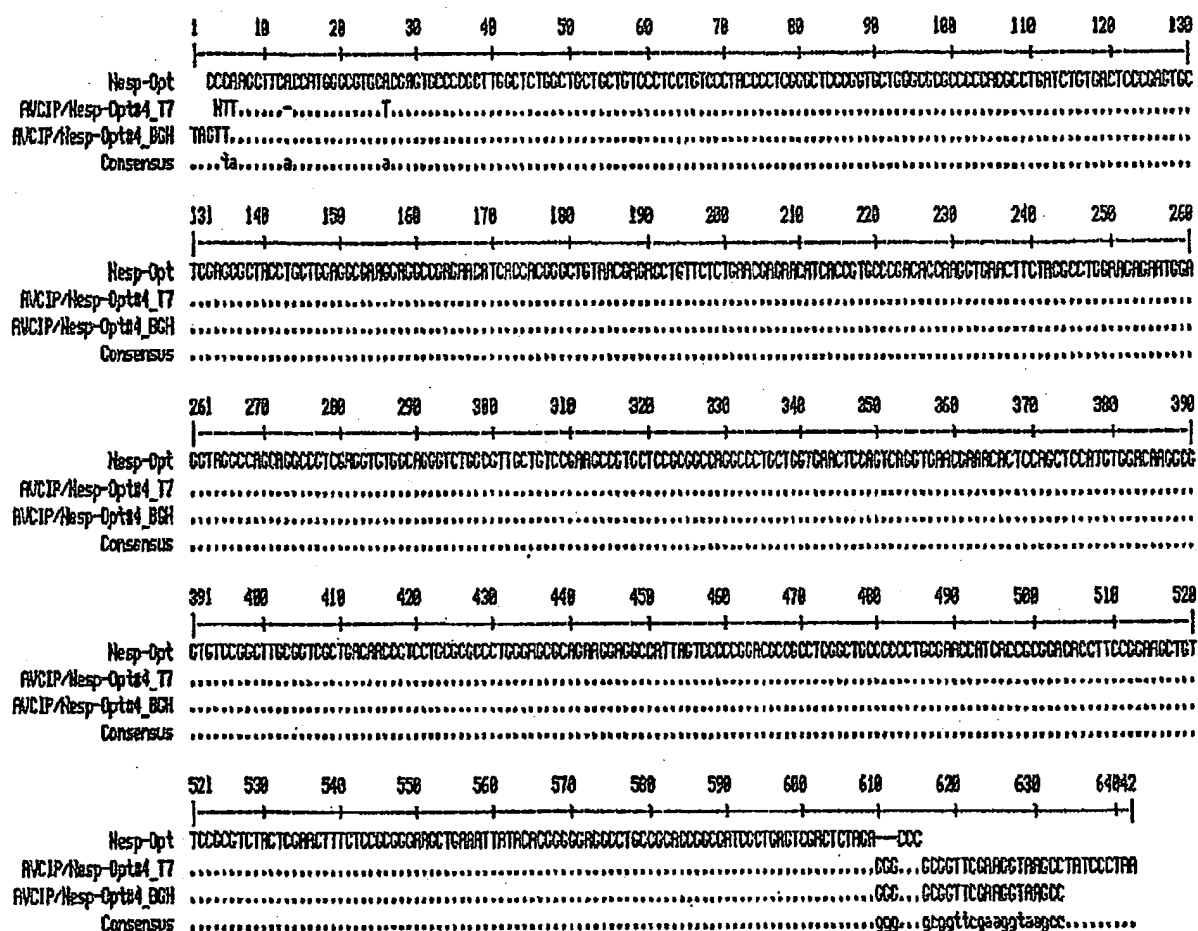


Figura 9:
Sequência de alinhamento do clone nº 9 do cDNA (Nesp sintético) da AVCIP-Nesp com a sequência estabelecida do gene Nesp.

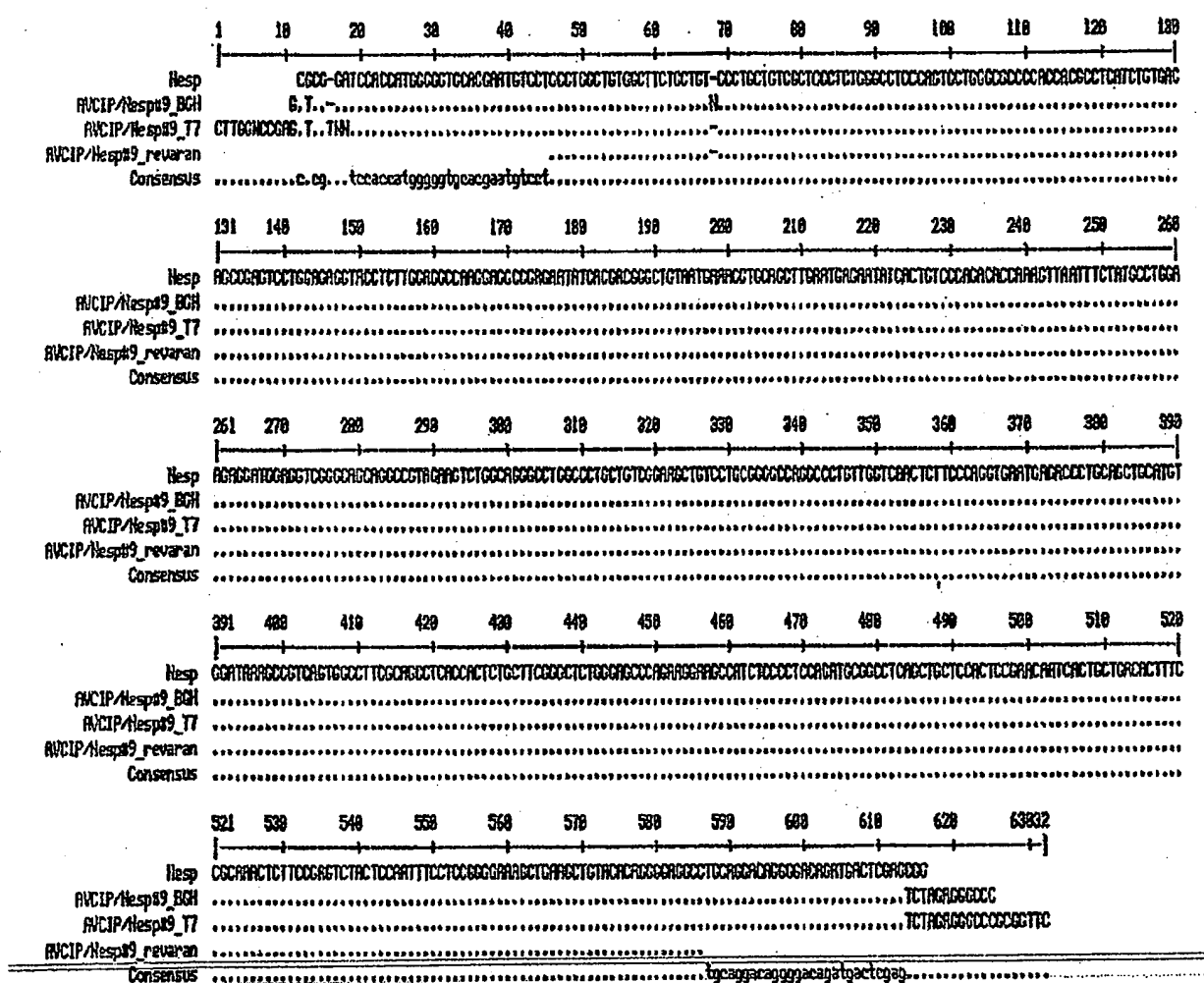


Figura 10:
Mapa construtor: AVCIPpcDNA3.1D/V5-His/Nesp.

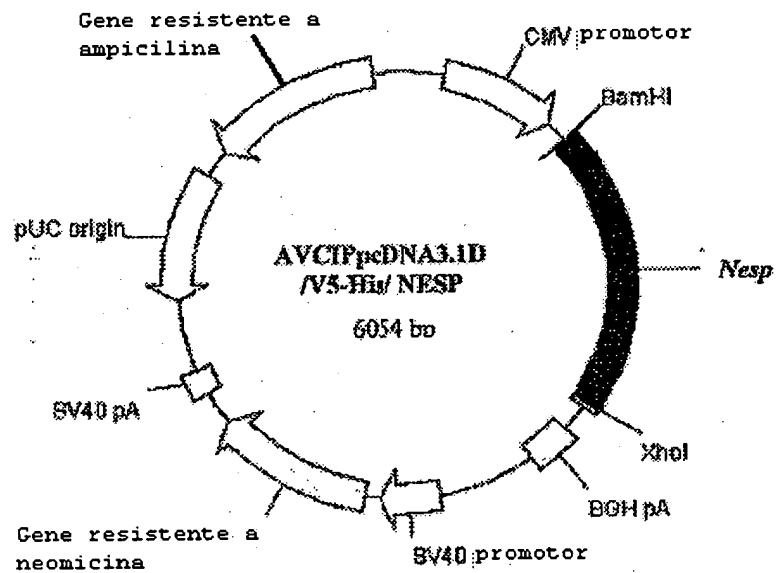
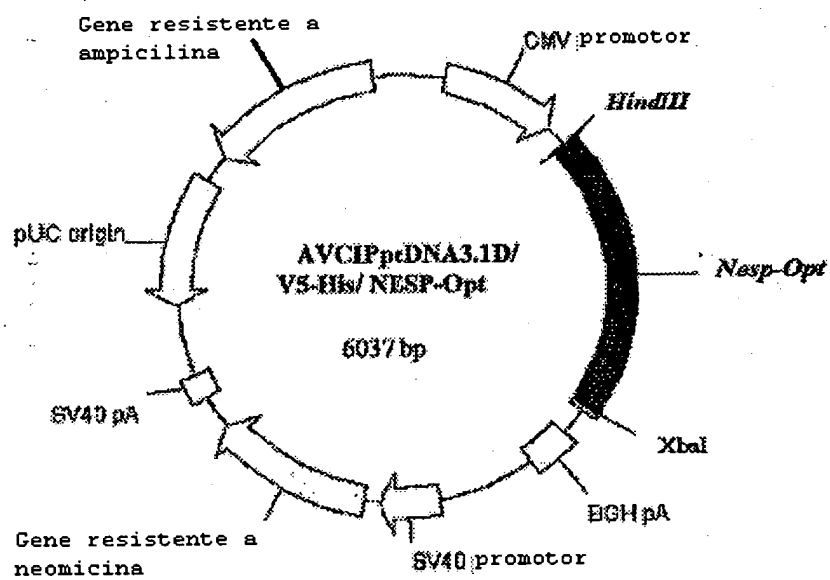


Figura 11:
Mapa construtor: AVCIPpcDNA3.1D/V5-His/Nesp-Opt



12/17

Figura 12:
pcDNA3.1/Nesp (natural).

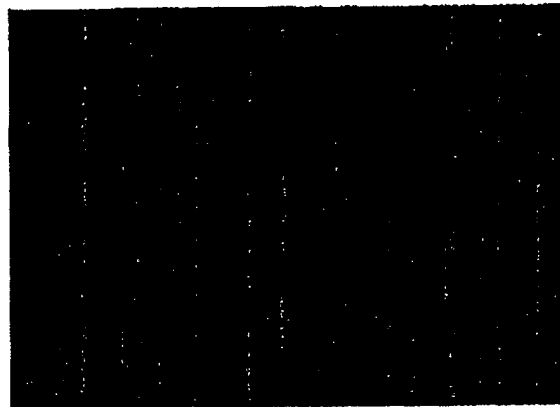


Figura 13:
pcDNA3.1/Nesp (OptSeq).

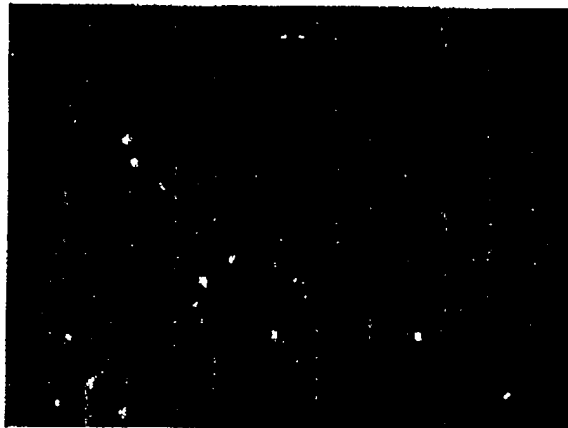


Figura 14:

Análise Western blot dos lisados totais das linhagens de células CHO K1 transfectadas ou por pcDNA3.1/Nesp (natural) ou por pcDNA3.1/Nesp (OptSeq) e Aranesp® usando anticorpo de coelho anti-eritropoietina humana (2 µg/ml).

Faixa 1: marcador de peso molecular.

Faixa 2: Aranesp® 50 ng.

Faixa 3: Aranesp® 100 ng.

Faixa 4: lisado celular da CHO K1 – pcDNA3.1 / Nesp(OptSeq) 20 µg.

Faixa 5: lisado celular da CHO K1 – pcDNA3.1 / Nesp(OptSeq) 10 µg.

Faixa 6: lisado celular da CHO K1 – pcDNA3.1 / Nesp(natural) 20 µg.

Faixa 7: lisado celular da CHO K1 – pcDNA3.1 / Nesp(natural) 10 µg.

Faixa 8: lisado celular da CHO K1 de controle não transfectada 20 µg.

Faixa 9: lisado celular da CHO K1 de controle não transfectada 10 µg.

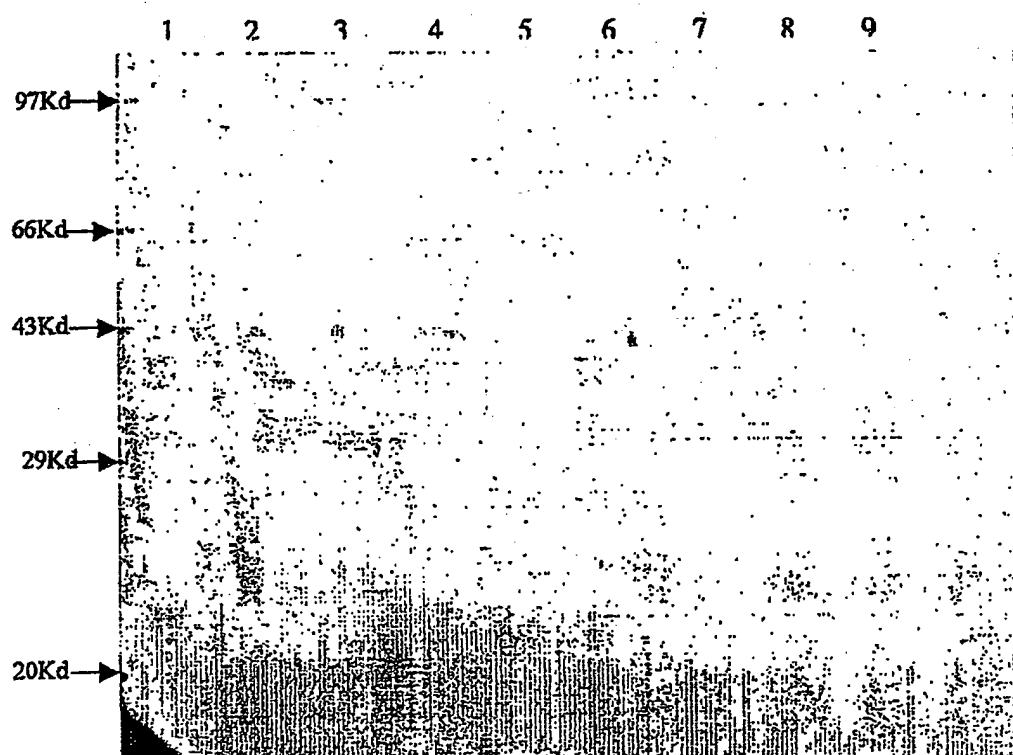


Figura 15:
Diagrama de fluxo para o desenvolvimento
da linhagem de célula estável.

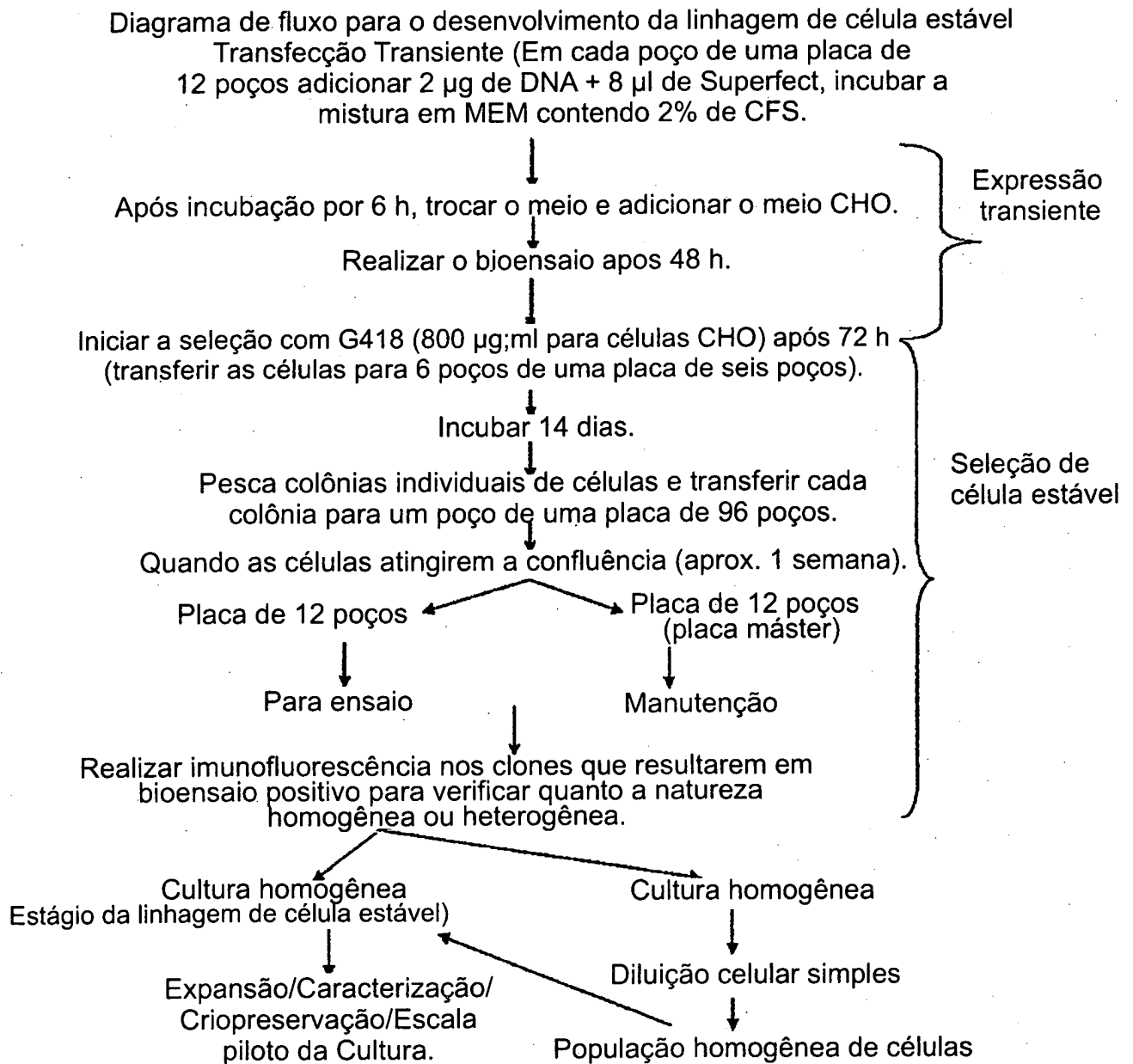


Figura 16:
Fotos instantâneas das colônias que foram pescadas para
o desenvolvimento das linhagens de células CHO K1
estáveis expressando a darbepoietina alfa.

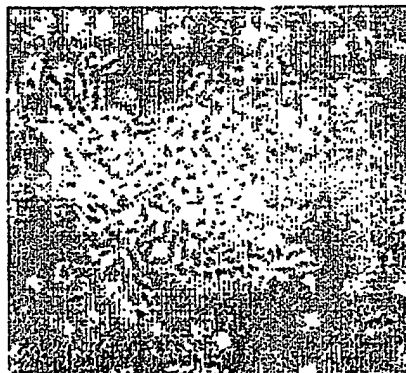
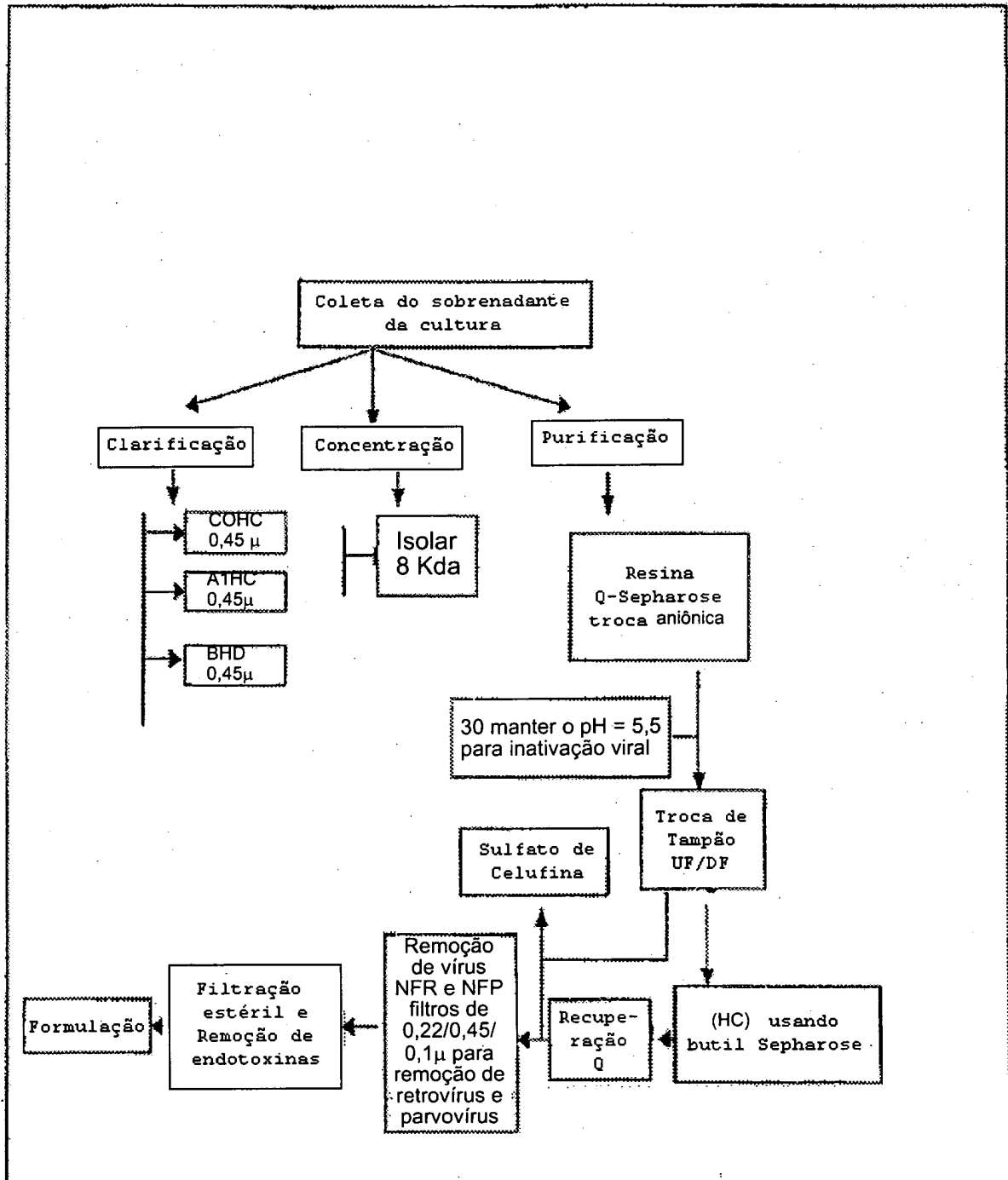


Figura 17:
Representação esquemática da dsp para a nesp.



RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODO RECOMBINANTE PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA ESTIMULADORA DA ERITROPOESE".**

5 A presente invenção refere-se ao método recombinante usado para a produção de uma forma altamente glicosilada (no total cinco glicosilações ligadas ao N em vez de três glicosilações ligadas ao N na EPO natural) da eritropoetina. Os sítios acrescentados de glicosilação resultarão em um maior número de cadeias de carboidrato, em um conteúdo mais elevado de ácido siálico do que na EPO humana, o que por sua vez comunicaria à mo-
10 lécula recombinante uma meia-vida mais longa. A invenção também refere-se à construção de cassetes de expressão compreendendo a codificação de seqüências de ácidos nucleicos para uma forma altamente glicosilada da eritropoetina e sua expressão estável nas células hospedeiras. A invenção também se relaciona a um método otimizado de purificação da proteína es-
15 timuladora da eritropoese. A EPO recombinante de acordo com a presente invenção, e os sais e os derivados funcionais da mesma, podem compreender o componente ativo das composições farmacêuticas para um aumento na taxa de hematócrito para o tratamento da anemia e para a restauração do bem-estar e da qualidade de vida do paciente.