

MEMORIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento está relacionado com um processo para a preparação de activadores do plasminogénio glicosilados derivados da urocinase de cadeia simples (scu PA) alterada no domínio tipo Factor de Crescimento (aqui referidos também como GASGA_s).

=====

GRUPPO LEPETIT SpA.

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ACTIVADORES DO PLASMINOGENIO MODIFICADOS"



Os compostos do invento são de preferência preparados por engenharia genética do DNA codificador do uPA e possuem propriedades farmacológicas melhoradas, nomeadamente no tratamento de doenças trombóticas.

O processo de preparação consiste, essencialmente em se proceder a) à modificação química de um scu-PA ou uPA nativo, ou b) à alteração da região uPA codificadora da GFD (domínio tipo factor de Crescimento), por deleção, inserção ou mutação.



Activador do plasminogénio modificados

Este invento está relacionado com um método para a produção de activadores do plasminogénio glicosilados, derivados da urocinase de cadeia simples (scu-PA) com o domínio do Factor de Crescimento (GFD) alterado (aqui referidos também por GASGAs). Mais particularmente, ele relaciona-se com um método para a produção de GASGAs que se caracteriza pela recuperação do gene do uPA a partir de uma biblioteca genómica, sua inserção num vector de expressão, modificação do plasmídeo e alteração do GFD do gene uPA, introdução dos vectores tipo plasmídeo assim obtidos numa célula animal para produzir com eles, transformantes e recuperação dos activadores do plasminogénio glicosilados, derivados de scu-PA e com GFD alterado, a partir das células animais transformadas.

Um outro objectivo do invento é representado por derivados do activador do plasminogénio de urina humana tendo o domínio tipo Factor de Crescimento (GFD) alterado. Mais particularmente, o presente invento engloba derivados do activador do plasminogénio de urina humana de cadeia simples ou dupla tendo alterada a região entre o aminoácido 9 e o aminoácido 50 da sequência do scu-PA humano (c.f. por exemplo a sequência do u-PA publicada em EP-A-92182), de preferência entre o aminoácido 9 e o aminoácido 45 e ainda mais preferido entre o aminoácido 19 e o aminoácido 32.

A uroquinase (uPA) é um activador do plasminogénio, obtido a partir de urinas humanas, que é usado no tratamento de várias formas de trombose ou doenças derivadas a embolias. A produção de urocinase tem sido baseada na purificação da enzima essencialmente a partir de urina humana. Com o desenvolvimento da tecnologia de cultura de células e a disponibilidade de anticorpos específicos anti-urocinase (anticorpos monoclonais assim como anticorpos policlonais), mostrou-se que o uPA é um produto da activação do pro-

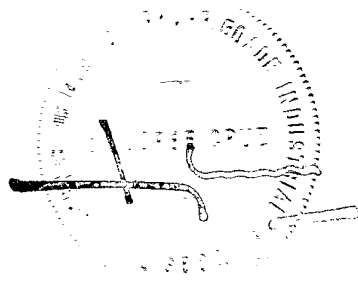


-uPA produzido pelas células (Wun et al., 1982, J. Biol. Chem. 257, 7262-7268; Nielsen et al., 1982, Biochemistry 21, 6410-6415). Pro-uPA é uma proteína de cadeia simples, enquanto que o uPA é uma proteína de duas cadeias. A conversão de pro-uPA em uPA depende da clivagem de uma única ligação peptídica do pro-uPA (Verde et al., 1984; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81; 4727-4731; (1984); Günzler et al; Hoppe S. Zschrp. Physiol. Chem. 363, 1155-1165, 1982). Esta clivagem específica do pro-uPA de cadeia simples resulta num aumento de cerca de 50 vezes da actividade específica e é obtida com enzimas proteolíticas tais como tripsina ou plasmina. Em particular, a plasmina parece ser responsável por esta conversão também in vivo.

Uma forma inactiva do activador do plasminogénio foi identificada em culturas celulares de rim embrionário humano por C. Nolon já em 1977 et al., (Biochim Biophys Acta 1977; 496:384-400). Esta substância, que os autores consideraram como sendo uma forma de pro-activador da urocinase, foi activada pela tripsina sem alteração do peso molecular e, uma vez activada, foi inibida por anticorpos de coelho contra urocinase humana. O "pro-activador" inactivo foi separado da forma activa por meio de uma cromatografia de afinidade em benzamidina-Sepharose. Stoppelli M.P. et al. descreveram o isolamento e caracterização de um fragmento amino terminal do uPA (ATF) indo do aminoácido na posição 1 até ao da posição 135 em Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 4939-4943.

Na patente Europeia 40238 está descrito um activador do plasminogénio de cadeia simples tendo peso molecular de cerca de 56.000, uma actividade específica de 40.000-50.000 unidades CTA/mg numa placa de fibrina e com uma afinidade elevada para fibrina.

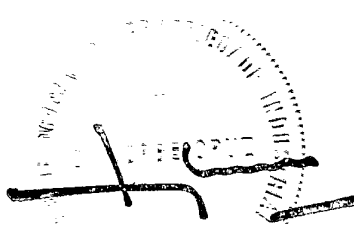
O Pedido de Patente Europeia Publ. Nº 92182 relaciona-se com a preparação de derivados da urocinase



via tecnologia de DNA recombinante. Em particular, descreve a purificação e caracterização de urocinase de baixo peso molecular (cerca de 30.000 daltons) obtida por técnicas de DNA recombinante num hospedeiro procariótico (E. coli).

No Pedido de Patente Europeia publicação Nº 154272 está divulgado um método para a produção de urocinase de cadeia simples glicosilada em células animais por tecnologia de cDNA recombinante usando um cDNA obtido a partir do mRNA de uma linha celular estabelecida derivada de rim humano. A clonagem do gene do uPA humano foi descrita por Riccio et al. (Nucl. Acid. Res., 1985, 13, 2759-2771). A região codificadora está subdividida em onze exões separados por dez intrões. Eles divulgaram que os domínios funcionais na proteína podem ser reconduzidos para diferentes exões ou grupos de exões. Em particular, encontrou-se um certo grau de homologia entre a sequência de aminoácidos de 10 a 50, que é na sua maior parte sintetizada pelo exão IV, e o factor de crescimento epidérmico (EGF) e o factor transformante tipo alfa. Este domínio tipo factor de crescimento parece estar envolvido no reconhecimento e ligação da proteína (uPA/scu-PA) pelos receptores específicos da membrana celular (Stoppeli et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1985, 82, 4939-4943 e Appella et al., J. Biol. Chem., 1987, 262, 4437-4440).

Os derivados tipo urocinase com o GFD alterado do invento (GASGAs) são derivados do scu-PA/uPA em que a proteína GFD foi alterada por um dos meios conhecidos para obter novos derivados com uma duração prolongada da acção quando comparado com uPA. Esta acção prolongada pode ser mostrado em testes in vitro e em experiências in vivo (em particular, em modelos animais convencionais que se sabe preverem a actividade no homem). Considerando a semi-vida curta do uPA in vivo é evidente a necessidade de compostos tendo as propriedades dos compostos do invento. Um outro grupo de compostos do invento é representado pelos compostos em que uma ou mais cópias da sequência GFD estão inseridas, de preferên-



cia imediatamente a jusante ou a montante do GFD "natural".

Os métodos até agora conhecidos para modificar uma proteína numa determinada sequência específica incluem modificação "directa" da proteína, e.g. por meios químicos, e modificação "indirecta" da proteína, e.g. por manipulação de engenharia genética da região codificadora da proteína. As modificações químicas incluem reacção selectiva de scu-PA ou uPA "nativos" com reagentes de derivatização de uma ou mais das funções dos aminoácidos na região entre o aminoácido 9 e o aminoácido 50, de preferência entre o aminoácido 9 e o aminoácido 45 e mais preferível entre o aminoácido 19 e o aminoácido 32. Os agentes de derivatização são conhecidos per se. Por exemplo, para aminoácidos básicos, tais como lisina ou arginina, pode-se usar um reagente capaz de formar ligações amida ou outras ligações orgânicas com uma função amino como sejam anidrido acético, 1,2-ciclo-hexadiona e fenilgloxal, enquanto que para aminoácidos ácidos, como seja o ácido aspártico a esterificação poderá ser a derivatização mais conveniente. Caso seja necessário, as condições de reacção selectiva podem ser acopladas à protecção de outras funções susceptíveis na proteína por meio de agentes protectores conhecidos per se.

Um método de modificação preferido é no entanto representado pela engenharia genética da região codificadora da proteína e em particular das regiões do DNA e/ou mRNA codificadoras do domínio GF da proteína, i.e. as regiões codificando os aminoácidos entre 9 e 50, de preferência entre 9 e 45 e ainda mais preferencialmente entre 19 e 32, de modo a introduzir modificações na proteína final para que não se ligue ao seu receptor específico nos monócitos U937 (cf. Stoppelli M.P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4939-4943, 1985).

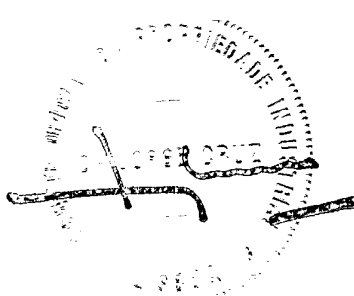
Uma modificação preferida é uma modificação de engenharia genética do DNA genómico codificador do




uPA entre 1027 pb e 1784 pb (assumindo o sítio de iniciação da transcrição do mRNA como sendo pb 1).

As modificações genéticas da região genética codificadora da região de ligação da proteína "nativa" podem ser efectuadas em DNA genómico ou cDNA. Elas incluem deleções, mutações e inserções dirigidas na sequência do ácido nucleico. O principal resultado destas modificações é impedir a capacidade de ligação de scu-PA ou uPA a receptores, mantendo ao mesmo tempo a sua capacidade enzimática inalterada. Ocasionalmente, e de facto frequentemente, pode ocorrer um novo aminoácido na sequência da proteína modificada como resultado das referidas modificações. Por exemplo, quando se faz uma deleção entre o sítio PstI no intrão C (i.e. no intrão entre os exões III e IV do gene do uPA) e o sítio BglII no intrão D (i.e. o intrão entre os exões IV e V), obtém-se um GASGA em que a deleção da sequência de aminoácidos entre Ser_q e Asp₄₅ é acompanhada pela introdução no seu lugar de um novo aminoácido, particularmente tirosina, codificada pelo tripleto originando pelo processo de ligação após a deleção.

Uma execução preferida do invento é representada por um processo de modificação que inclui a deleção da região correspondente ao exão IV num DNA genómico ou cDNA do uPA ou num híbrido de DNA genómico do uPA-cDNA. Quando se faz isto numa sequência genómica, é também possível e por vezes mesmo conveniente cortar a sequência de DNA nas regiões dos intrões relativamente próximas do exão IV. Isto pode ser feito por vários processos conhecidos per se. Um processo preferido é representado pela introdução de sítios de restrição únicos nos intrões à volta do exão IV num vector contendo toda a ORF do uPA a jusante de um promotor, obtendo-se assim dois derivados de vector diferido apenas na presença de um novo sítio no intrão C ou no intrão D. A digestão com enzimas de restrição destes novos sítios assim como no terceiro nesta região que é comum nos dois plasmídeos e religação dos fragmentos de plasmídeo resultantes produz, entre



outros, um novo plasmídeo em que a região a montante do novo sítio no intrão C foi fundida com a região a jusante do novo sítio no intrão D, i.e. uma sequência sem virtualmente toda a região correspondente ao GFD do uPA. Um outro processo de modificação preferido compreende a transformação, por técnicas conhecidas per se, do sítio PstI no intrão C da região codificadora do uPA num sítio SalI e transformação do sítio BglIII no intrão D num XhoI, deleção da região entre estes dois sítios com as enzimas de restrição adequadas, e ligação dos dois fragmentos um ao outro para se obter uma nova sequência codificadora de uPA que codifica um derivado GASGA em que a sequência de aminoácidos entre Ser₉ e Asp₄₅ é substituída por uma unidade Tir. Mais particularmente, o plasmídeo resultante não tem a sequência de aminoácidos entre Ser₉ e Lis₂₃ e entre Fen₂₅ e Asp₄₅ enquanto Tir₂₄ que é originalmente codificada por um codão TAC foi substituída por um resíduo Tir codificado pelo codão TAT originado pela fusão da ORF do exão III com a do exão V. De preferência, o processo acima é efectuado num vector que contém a ORF (grelha de leitura aberta) do uPA de modo a obter-se directamente um vector de expressão para GASGA. Como alternativa, também se pode obter um mutante de deleção a partir de um plasmídeo codificador de uPA tendo um sítio único introduzido a jusante do exão IV como descrito atrás, (e.g. um sítio XhoI) por deleção de porções de DNA maiores a montante e a jusante do exão IV e substituindo estas sequências com um fragmento que reintroduz uma parte da sequência eliminada que não inclui o exão IV. Mais particularmente, um vector contendo a ORF do uPA e sítios de restrição únicos como descrito acima é tratada com a enzima que é específica para o sítio único introduzido a jusante do exão IV, (e.g. XhoI) e com uma outra enzima que é específica para um outro sítio único a montante do exão IV (e.g. HindIII que já está presente no intrão B, i.e. o intrão que precede o exão IV). O fragmento de plasmídeo resultante a que falta o exão III e IV é ligado através de extremos coesivos e cegos adequados a um fragmento contendo apenas o exão III (mas não o exão IV) na orientação correcta de modo a man-



ter a grelha de leitura correcta. O vector obtido é um vector de expressão de GASGA codificador de uma proteína que é um derivado de GASGA do invento. Numa execução preferida deste método, um vector de expressão do uPA contendo a ORF derivada do gene uPA é modificada por inserção de um sítio XhoI no lugar do sítio BglII presente no intrão D (Fig. 3) seguido de digestão com XhoI e HindIII. Obteve-se e isolou-se um fragmento de DNA contendo a maior parte do plasmídeo original mas essencialmente sem a sequência correspondente aos exões III e IV. Este fragmento é ligado a um fragmento HindIII-SalI que se estende do intrão B ao intrão C, contendo assim o exão III, para se obter um vector de expressão de GASGA do invento em que existe uma sequência codificadora de uPA essencialmente sem a sequência de DNA correspondente ao exão IV, na própria grelha de orientação e portanto capaz de codificar uma proteína GASGA do invento. O fragmento HindIII-SalI, atrás mencionado, é obtido por digestão do HindIII, seguindo-se uma ligação SalI às extremidades de um fragmento PstI contendo essencialmente exão III que é obtido por tratamento PstI de um vector contendo a sequência codificadora de uPA de origem genómica. O vector de expressão obtido codifica um GASGA a que falta os aminoácidos desde Ser₉ até Lis₂₃ e desde Fen₂₅ até Asp₄₅ e em que Tir₂₄ codificador por um codão TAC, foi substituído por uma Tir codificador pelo codão TAT originado na fusão da ORF do exão III com a do exão V.

Como foi referido atrás, um derivado do uPA do invento (GASGA) pode ser obtido também com inserções no GFD do uPA "natural" de modo a que a sua capacidade de ligação ao receptor do uPA seja substancialmente reduzida ou completamente inibida. Um método preferido inclui modificação de um gene ou cDNA codificador do uPA ou um híbrido gene do uPA/cDNA por engenharia genética. Sabe-se de facto que a mutagenese de genes pode ser obtida com uma série de agentes físicos e químicos tais como radiações ionizantes, U.V. ou análogos precursores do DNA. De qualquer modo, a via preferida é modificar directamente a sequência codificadora por



engenharia genética e.g. usando mutagênese específica de sítio em vectores derivados de M13 (P. Carter, Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, Nucl. Acid. Research 1985, 13, 4431) ou "Polymerase Chain Reaction" (PCR). A sequência codificadora pode ser modificada no mesmo vector usando na transfecção ou num vector diferente e subsequentemente um fragmento adequado transferido para o vector de transfecção. A ordem destas operações depende da especificidade dos substratos envolvidos e é determinada pelos técnicos da especialidade com base na prática corrente.

Um sítio de restrição (ScaI) está presente na sequência de DNA codificadora da porção do uPA implicada na ligação ao receptor do uPA. É possível abri-lo e inserir um segmento de DNA que não pare a tradução da proteína nem altere a grelha de leitura. De preferência e referido segmento de DNA conterá um novo sítio de restrição para facilitar a identificação dos mutantes obtidos. O número de pares de bases adicionado pode ser três ou um múltiplo de três. Isto pode ser obtido directamente com um segmento de DNA do tamanho pretendido ou por passos múltiplos tais como por inserção de um segmento maior que é então reduzido ao tamanho pretendido por restrições adequadas.

A sequência codificadora obtida pode codificar uma proteína com uma região de ligação ao receptor do uPA alterado e.g. devido a uma alteração nas folhas-beta, hélices alfa da estrutura secundária do uPA "original", como seja introdução de voltas, espaçamento dos resíduos de aminoácidos implicados na ligação, modificação do perfil de hidropaticidade ou uma combinação destes efeitos.

Brevemente, efectuam-se as operações que se seguem:

- abertura de um vector de expressão contendo o gene do uPA humano por digestão total ou parcial com ScaI:
- inserção de um novo sítio de restrição através de um DNA adap-



tador de sequência conhecida:

- modificação do referido sítio de restrição para se obter uma inserção de três pares de bases ou um múltiplo de três;
- transfecção de células de mamífero com este vector na presença de um plasmídeo portador da resistência a um agente de selecção;
- selecção dos clones resistentes e, entre eles, aqueles que produzem GASGAs no meio;
- colheita do meio e purificação da proteína a partir dele.

De acordo com o processo do invento também é possível inserir um múltiplo do domínio GF num scu-PA ou uPA "nativo" através da inserção de uma, duas ou mais réplicas da região de DNA do uPA entre 1027 pb e 1784 pb na sequência codificadora do uPA, de preferência sequencialmente com a região codificadora de GFD original entre 1027 e 1784 pb (i.e. essencialmente exão IV). Estes derivados de GASGAs com domínio poli-GF é de esperar que possuam uma capacidade de ligação melhorada e mais selectiva ao receptor do uPA quando comparado com a molécula nativa.

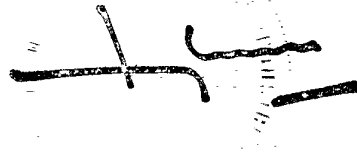
Um vector codificador de GASGAs tendo o domínio GF alterado (e portanto incapaz de se ligar ao receptor de uPA) pertencerá à serie identificada abaixo como "EO" enquanto que os vectores que expressam GASGAs e contendo GFD serão identificados como pertencentes às séries "E2", "E3", "E4", etc. dependendo do número de unidades GFD incluídas. Os derivados de GASGAs serão identificados de acordo com isto.

O presente invento inclui os derivados de GASGAs assim como suas formas alélicas tendo características de destruição ou redução substancial da actividade de ligação ao receptor do uPA. As formas alélicas podem ser obtidas através da modificação de scu-PA e/ou PA "nativos" de preferência através da modificação da região codificadora do uPA e expressão desta sequência modificada em células de mamífero. Mais, o presente invento inclui activadores do plasminogénio



alterados com domínio GF tendo outras regiões modificadas, de preferência a região que é exposta à clivagem pela plasmina.

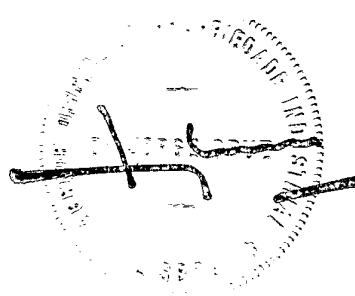
São exemplos de activadores do plasminogénio derivados de scu-PA, tendo uma região modificada de modo a torná-los mais resistentes à sua conversão em uPA, os derivados modificados Lis₁₃₅, Lis₁₃₆ e Arg₁₅₆ Lis₁₅₈ descritos em EP-A200451 ou os derivados modificados Lis₁₃₇, Fen₁₅₇ descritos em EP-A-216279. Estes compostos são modificados na região entre o aminoácido 9 e o aminoácido 50, de preferência entre o aminoácido 9 e 45, e ainda mais preferível entre o aminoácido 19 e o aminoácido 32 através de mutações dirigidas específicas de sítio na sequência de cDNA ou na sequência do DNA correspondente. A sequência codificadora resultante inserida num vector de expressão é usada para transformar células animais adequadas para produzir os derivados do plasminogénio pretendidos alterados em GFD. Estes activadores do plasminogénio derivados de scu-PA com GFD alterado, tendo também a região geralmente exposta à clivagem tipo plasmina modificada para conferir uma certa resistência à clivagem proteolítica, devem possuir uma maior duração de acção quando comparado com os compostos de partida tendo GFD inalterado e/ou podem ser administrados em doses menores para se obter o efeito pretendido. A ordem e metodologia destas alterações pode não ser crítica, desde que seja mantida a característica de não ligação ao receptor de uPA. Em particular, a mutação de GFD pode ser introduzida após a mutação na região sensível à plasmina ou vice-versa, a mutação de GFD pode ser introduzida antes da mutação na região sensível à plasmina. O fragmento de DNA de origem genómica humana contendo a região codificadora de uPA, que é usado numa execução do presente invento é obtido através de uma biblioteca genómica humana num vector adequado, como seja uma biblioteca preparada no bacteriófago lambda ou em cosmídeos de acordo com técnicas conhecidas per se, após despiste da biblioteca com a sonda de DNA adequada representada por uma porção do próprio gene ou um fragmento de DNA sintético de um tamanho adequado prepara-



do com base na sequência codificadora conhecida ou numa sonda derivada de cDNA ou mRNA. Convenientemente este fragmento codificador de uPA é o fragmento de 7,3 kb obtido por digestão parcial com SmaI do DNA clonado. Um segmento de DNA como este será referido na descrição e reivindicações como "grelha de leitura aberta" (ORF), para significar uma sequência de DNA genómico incluindo a unidade de transcrição-tradução do mRNA de uPA, possivelmente interrompida por intrões e de preferência incluindo regiões não traduzidas 5' e 3' ou uma parte delas que confere eficácia de tradução ou estabilidade ao mRNA. Um exemplo preferido de ORF é uma sequência definida como atrás que é interrompida por 10 intrões. Os vectores de expressão que podem ser usados no método do invento são quaisquer vectores conhecidos usados para transfectar células eucarióticas e em particular células de mamífero. Essencialmente eles incluem uma sequência que regula a tradução do mRNA, como seja um promotor e um sítio de poliadenilação. Por vezes eles incluem uma origem de replicação eucariótica. Em particular, a região do promotor pode ser qualquer uma das conhecidas que podem ser usadas em engenharia genética de células animais. Os promotores heterólogos podem ser obtidos a partir de vírus de mamíferos tais como retrovirus (e.g. RSV) SV40 (precoce ou tardio) e adenovirus (precoce ou tardio). Como alternativa podem ser usados promotores reguláveis de origem animal ou humana que sejam induzidos para transcreverem acima dos níveis normais utilizando indutores físicos, químicos ou biológicos. São exemplos destes promotores reguláveis ou das metalotioneínas I e II de ratinho ou humanos, das proteínas de choque térmico, etc. que são encontrados em publicações de referência tais como Hames et al Eukaryotic Viral Vectors, Y. Gluzman ed., 1983, 7-12, Mayo et al., Cell, 29: 99-108 (1982) e Korin et al., Nature 308 513-519 (1984). Além destes promotores reguláveis encontrou-se também que a região do promotor do uPA ou um seu derivado pode ser adequadamente usado como promotor eficaz para a expressão de um gene colocado sob o seu controle em células de mamífero. A região do promotor do uPA humano é obtida a partir de uma biblio-

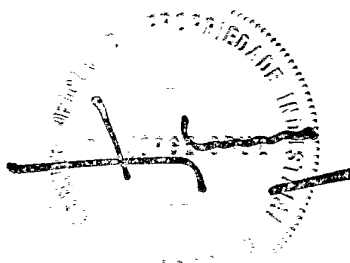


teca genómica humana (ver acima) por digestão com SmaI e contém cerca de 2,38 kb, entre cerca de -2353 pb e cerca de +29 pb no gene do uPA humano. Não só este promotor do uPA humano nativo poder ser usado para expressar um gene num sistema de células de mamífero adequado mas também qualquer um dos seus derivados obtidos por deleção, inserção, substituição ou mistura delas que mantêm ou mesmo possuem uma melhor função reguladora podem adequadamente ser usados no método do invento. Em particular, podem ser preferidos, pelo menos nalguns casos, derivados obtidos por deleção da região do promotor de uPA. São exemplos representativos de derivados de deleção os obtidos por tratamento do promotor de uPA com OxaNI ou EcoRV e subsequente ligação dos fragmentos obtidos. Em particular, por digestão com OXaNI obtem-se um derivado de deleção a que falta um fragmento de 0,6 kb entre aproximadamente -1827 pb e -1202 pb, onde +1 é a primeira base transcrita no mRNA do uPA, enquanto que por digestão com OxaNI e EcoRV obtem-se um derivado de deleção a que falta um fragmento de 1,29 kb entre aproximadamente -1827 e -537 pb. Encontrou-se também que estes derivados obtidos por deleção de promotor do uPA são capazes de conduzir a expressão do gene regulado com rendimentos comparáveis e mesmo superiores aos dos promotores virais normalmente usados, como seja RSV, que são normalmente considerados sistemas promotores muito eficazes. Como sítio de poliadenilação pode servir qualquer um dos conhecidos, como seja o associado ao promotor nativo do gene uPA ou derivado de um gene eucariótico ou viral. Uma vez preparada uma casete de expressão contendo uma região de promotor; um iniciador de transcrição e convenientemente um poliadaptador, a sequência de gene escolhido pode ser inserida nela para transformação de uma célula animal. Em geral, não é crítica a ordem em que as partes são misturadas, de modo que as regiões delimitantes sejam primeiro ligadas a um sistema de replicação incluindo uma marca selectiva ou outras regiões, tais como potenciadores, regiões reguladoras da transcrição ou similares, antes da inserção do gene. O modo como os vários fragmentos são juntos dependerá de uma série de fac-



tores relacionados com a facilidade da construção, escolha dos sitios de restrição, disponibilidade de fragmentos particulares e similares, que em último caso estão dentro da capacidade de escolha do técnico especializado. A escolha do sistema de replicação depende, até certo ponto de se pretender uma expressão transitória ou estável. Para expressão transitória usam-se elementos episomais baseados na sequência viral, como seja SV40, contendo uma origem de replicação. A expressão estável pode ser conseguida usando elementos episomais (e.g. vectores baseados no virus de papiloma bovino) ou sequências integradas no genoma. Uma série destas sequências virais têm sido ligadas a marcas selectivas, tais como genes gpt, neo e dhfr. Estas marcas permitem a selecção de células contendo o vector e algumas delas a amplificação das sequências estranhas integradas.

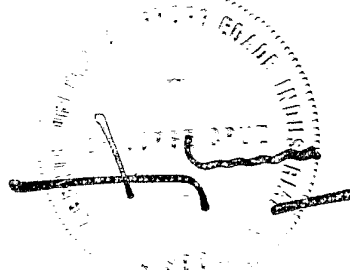
Finalmente para aumentar a produção da substância pretendida pode ser conveniente co-transformar as células com uma primeira construção contendo a cassete de expressão de GASGA e uma segunda construção independente contendo a marca selectiva. Como alternativa, o gene pode ser amplificado preparando uma construção em tandem onde a cassete GASGA está em tandem com uma cassete de expressão de um gene tal como dhfr ou metalotioneína. As células hospedeiras podem ser qualquer célula animal, de preferência uma célula de mamífero ou aviária, que pode produzir um GASGA numa quantidade recuperável quando da transformação com um vector de expressão de GASGA. Exemplos destas células que incluem expressamente células de origem humana, englobam linhas celulares estabelecidas conhecidas que podem ou não produzir pro-uPA em quantidades recuperáveis antes da transformação, como seja LB6, uma linha de células fibroblastóides de murganho derivada de células L parenterais (Corsaro C.M. e Pearson L.M. Enhancing the efficiency of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells, Somatic cell genetics 7, 603-616, 1981); CHO, ovário de hamster chinês (Kao F.T., Puck F., Proc. Natl. Acad. Sci., 60, 1275-1281, 1968) e A 431, uma linha celular de car-



cinoma epidermóide humano (Fabricant R.N., De Larco J.E., e Todaro G.F., Nerve growth factor receptors on human melanoma cells in culture, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 565-569, 1977). As primeiras duas linhas celulares referidas atrás (LB6 e CHO) não produzem pro-uPA enquanto que a última mencionada (A431) produz. Em geral, no entanto, no processo do invento é adequada a utilização de linhas celulares estabelecidas tais como CHO, COS, LTK, Hela e CN-1.

Quando da recloneagem repetida de uma linha celular CHO em monocamada, produtora de GASGA, podem ser isoladas linhas celulares derivadas a partir do meio, as quais retêm a capacidade de produção de uPA e que também são capazes de auto-replicação em suspensão. As vantagens de tais linhas celulares em termos de facilidade de cultura e produções mais elevadas por unidade de massa de fermentação são evidentes para os técnicos especializados. Estas linhas celulares CHO produtoras de GASGA capazes de crescer em suspensão num meio de cultura representam uma execução preferida do presente invento. O vector de expressão pode ser introduzido no hospedeiro através de quaisquer meios convenientes tais como microinjecção, transfecção mediada por DEAE-dextran, transfecção de DNA precipitado com fosfato de cálcio e electroporação (ver Bonerji J. et al., Cell 33, 729-740 (1983); Graham F.L. e Vander Eb A.J., Virology, 52, 456-467 (1983) e Potter H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7161-7165 (1984). Após transfecção as células são cultivadas num meio adequado, como seja o meio de Eagle modificação de Dulbecco (DMEM) contendo 10% a 20% de soro fetal de vitela inactivada, em que estas células são estávelmente mantidas e depois introduzido o agente selectivo adequado, e.g. um antibiótico. As células seleccionadas são clonadas repetidamente e a sua produção de GASGA_s é avaliada pelos métodos habituais como sejam ensaio fibrinolítico ou ensaio imunoamidolítico (IAA).

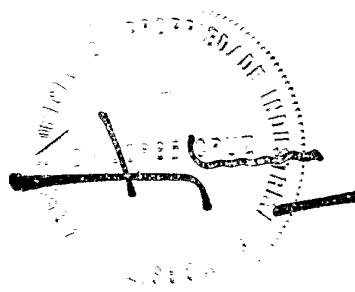
Este ensaio deve ser efectuado usando um anticorpo monoclonal específico para scu-PA e/ou uPA que não



reconheça ou se ligue especificamente à proteína GFD. São adequados os anticorpos monoclonais que reconhecem a cadeia B do uPA sem reconhecerem a cadeia A como sejam os descritos por Herion P. et al em Bioscience Reports 1, 885-892 (1981), Salermo M.G. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81, 110-114 ou Kaltroft et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79-, 3720-3723 ou MAB 5B4 que foi descrito por Nolli et al em Tromb: Haemostas 1980, 56, 214-218 e que se liga à região em "ansas múltiplas" do uPA, sem ligação à região GFD. Os clones isolados produtores de GASGA são então cultivados em massa para produzir quantidades substanciais de GASGAs. Na cultura em massa, uma execução preferida é representada pela adição de aprotinina. O resultado da adição desta substância no meio original ou durante a cultura é que o pro-uPA é recuperado em maiores quantidades. Tipicamente adiciona-se aprotinina numa concentração de 10-50 UI/ml e de preferência a 20-25 UI/ml.

Dependendo da sequência condutora ter sido retida ou não, e do produto ser capaz de secreção, o meio pode ser continua ou repetidamente mudado e os GASGAs isolados a partir do meio. Se o condutor não tiver sido retido e o produto for mantido intracelularmente pode-se colher as células, matá-las e lisá-las, e isolar o produto. Para isolamento e purificação podem ser aplicadas as técnicas convencionais como seja cromatografia de permuta iônica ou de afinidade, HPLC e HPLC de fase reversa. Uma purificação adequada por cromatografia de afinidade envolve a utilização de um anticorpo monoclonal anti-scu-PA ou uPA que não reconhece ou liga a proteína GFD, como sejam os que se ligam a cadeia B do uPA sem ligar a cadeia A ou que se ligam à cadeia A apenas na região de "ansas múltiplas" (ver atrás). Convenientemente, pode ser usado o imunoadsorvente descrito por Herion P. e Bollen A. em Bioscience 1983, 3, 373-379 assim como MAB5B4 (Nolli et al, ver atrás).

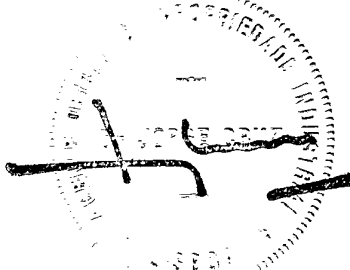
Um processo adequado para garantir que os



compostos não se ligam de facto a GFD de uPA é representado por um ensaio imunoamidolítico (c.f. Corti *et al.*, Tromb. Haemostas 1986, 56, 407-410; ver também 1.6.2 abaixo) que utiliza um anticorpo monoclonal que não reconhece ou liga a região proteica incluindo o GFD (ver atrás para alguns exemplos específicos destes anticorpos) em paralelo ou seriadamente com um ensaio imunoamidolítico usando um anticorpo monoclonal que não reconhece ou liga a região proteica (como seja MAB CD₆ ou DC₁, ver abaixo para mais detalhes).

Os anticorpos monoclonais com esta especificidade podem ser preparados de acordo com técnicas conhecidas para fusão de células através da aplicação de um método de selecção correcto. O agente de imunização pode ser scuPA, tcu-PA, ATF ou uma mistura deles e podem ser seguidos os protocolos de imunização convencionais. Os animais imunizados com antigénio poderão ser quaisquer animais de laboratório usados nesta técnica e de preferência roedores tais como ratos, murganhos ou coelhos. A linha celular estabelecida a ser fundida com as células do baço de animais tratados é qualquer uma das linhas celulares conhecidas e normalmente disponíveis, como sejam de preferência linhas de células tumorais, e.g. NSO de mieloma de murganho (sublinha de P3/NS₁/1Ag-4.1), ATCC TIB 18): A sonda preferida para a selecção dos MABs com as características necessárias é um fragmento peptídico (designado F₆) tendo um peso molecular aparente de cerca de 6000, uma sequência de aminoácidos correspondendo à sequência do uPA indo aproximadamente desde o resíduo leucina na posição 4 até ao resíduo de ácido glutâmico na posição 43, e correspondendo ou sendo uma porção importante ou ainda incluindo, o chamado GFD do uPA.

Este fragmento é obtido por tratamento controlado do ATF com uma enzima capaz de cortar uma sequência proteica perto de um resíduo de ácido glutâmico, como seja protease V8 derivado de Staphylococcus aureus. Como testemunha positiva neste sistema de selecção é por vezes conveniente



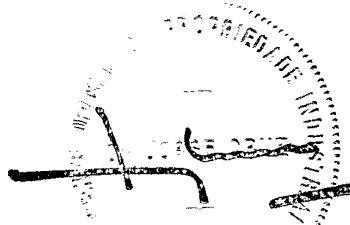
introduzir um outro fragmento obtido a partir de ATF com tratamento por V8; i.e. um fragmento designado B₁₁ tendo um peso molecular aparente de cerca de 11000 e uma sequência correspondendo essencialmente à região de "ansas múltiplas" do uPA e facultativamente um terceiro fragmento designado F₁₂ obtido pelo mesmo processo tendo uma sequência que corresponde essencialmente à região de "ansas múltiplas" do uPA exceptuando um segmento entre o aminoácido 52 e 53.

Os MABs que se ligam ao fragmento F₆ assim como ao uPA (scuPA e/ou tcuPA) sem ligação à região de "ansas múltiplas" (fragmento B₁₁) ou região catalítica (cadeia B), e.g. numa experiência de iminoafinidade ou imunotransferência, são ainda purificados, e.g. por cromatografia de afinidade ou de permuta iónica e isolados. Eles possuem a característica pretendida de reconhecerem ou ligarem selectivamente a região GFD do uPA.

Para demonstrar que os derivados GASGAs do invento não se ligam ao receptor do uPA, como seja o existente nos monócitos U 937 descrito por Stoppelli MP *et al.*, em Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 4939-4943, pode-se fazer um ensaio consistindo na repetição da experiência descrita neste artigo mas usando o derivado GASGA do invento em vez de uPA, o qual pode ser introduzido na experiência apenas como controle positivo. Neste ensaio, a capacidade de ligação dos derivados de GASGA da série EO é bastante baixa. Em geral, é inferior a 10% da capacidade de ligação do uPA.

Além de se usar os monócitos U 937 ou em vez deles, a experiência atrás pode ser efectuada usando células endoteliais da veia umbilical humana descrito por Ajjar KA *et al* em J. Biol. Chem. 1986, 261, 11656-11662.

A actividade in vivo dos compostos do invento pode ser confirmada por experiências em modelos tais como lise de coágulos em coelhos anestesiados como descrito por

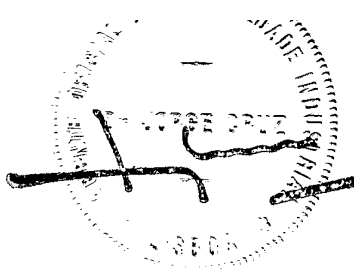


Collen D. et al. em J. Clin. Invest. 1983, 73, 368-376.

Os derivados GASGAs do invento podem portanto ser usados como possíveis substituintes do scu-PA ou uPA nas aplicações terapêuticas até agora sugeridas para estas substâncias, e.g. como trombolíticos. Com esta finalidade, os compostos do invento podem ser usados como tal ou de preferência formulados de acordo com técnicas conhecidas por se as quais estão descritas em livros de referência como seja Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª Edição, 1985, Mack Publishing Co.. Em particular, eles podem ser formulados de modo semelhante à formulação corrente do uPA ou scu-PA.

Uma indicação terapêutica preferida é portanto, como trombolíticos, possivelmente nas fases precoces de enfarte ou embolismo, como seja enfarte cardíaco, embolia pulmonar ou embolia arterial periférica. A via de administração é de preferência i.v. e o modo de administração pode ser em bolus ou por perfusão. De preferência uma administração i.v. de um bolus de uma quantidade tromboliticamente eficaz de um composto do invento é seguido, se necessário, de uma perfusão i.v. de uma dose mais baixa durante um período de tempo relativamente curto. A dose diária varia grandemente com a idade, tamanho, e estado do paciente e como indicação na gama de 2-30 mg/dia de preferência 2-20 mg/dia e mais preferível 2-10 mg/dia. Como é do conhecimento, neste campo particular da terapêutica a dose e esquema de administração adequados podem ser decididos pelo médico com base em casos individuais.

A unidade de dosagem, que contem os agentes estabilizadores habituais como descrito para uPA, scuPA ou t-PA, pode conter GASGAs na gama de 0,5-2 mg por unidade, correspondendo a cerca de 50000-200000 UI de uPA por unidade. Um exemplo de uma formulação farmacêutica liofilizada para reconstituição em 2 ml de soro fisiológico estéril para injeção e.v. é a seguinte:



GASGA-EO (liofilizado)	1 mg
manitol	20 mg
edetato de sódio	2 mg
tampão de fosfatos q.s.	

Os compostos do invento podem ser administrados sózinhos ou em terapia combinada com agentes anti-coagulantes tais como heparina ou aspirina ou com qualquer um dos outros PA, tais como scu-PA, uPA, t-PA ou suas formas modificadas, tais como as descritas em EP-A 231883 e EP-A 236040, estreptoquinase ou suas misturas.

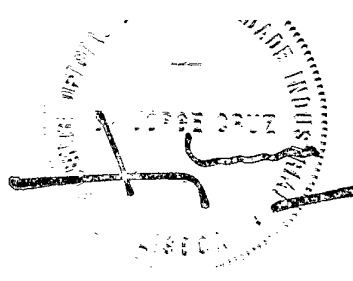
Breve descrição dos desenhos

Os desenhos juntos são destinados a ilustrar o invento e a referência aos desenhos na descrição e reivindicações tem fins ilustrativos e não pretende ser uma limitação do âmbito do presente invento. A breve descrição dos desenhos que se segue destina-se à compreensão dos desenhos e do invento como um todo.

Fig. 1 Estrutura do gene, mRNA e proteína uPA

De cima para baixo:

- mapa de restrição da inserção do gene uPA no fago lambda-uPA2;
- mapa de restrição da inserção do gene uPA no fago lambda-uPA1;
- mapa de restrição da grelha de leitura aberta do uPA (Ba: BamHI; EI: EcoRI; S: SmaI; HIII: HindIII);
- estrutura de exão/intrão do gene uPA humano: caixas pretas: regiões 5' e 3' não traduzidas; caixas sombreadas: exões traduzidos; linhas: intrões;
- estrutura exão/intrão do clone de cDNA parcialmente "unspliced" pHUK1;
- correspondência entre exões e aminoácidos no mRNA de pro-uPA;



- correspondência entre domínios proteicos e aminoácidos no pro-uPA.

Fig. 2 Construção de RSV-uPA

Um fragmento de DNA SmaI contendo toda a ORF do mRNA de uPA obtido a partir de lambda-uPA1 (ver a parte de cima desta figura) é inserido na grelha obtida a partir do plasmídeo RSV-Neo por digestão com HindIII e HpaI portadora das funções do plasmídeo bacteriano e a LTR do RSV (ver a parte esquerda desta Figura). RSV-uPA tem a ORF de uPA sob o control do promotor contido na LTR de RSV e pode expressar a proteína quando inserido num hospedeiro eucariótico adequado (ver a parte de baixo desta Figura).

Fig. 3 Construção de vectores de expressão de GASGAs

Mapa de restrição detalhado e estrutura Exão/Intrão de:

- A) ORF de uPA humano (caixas: exões; linhas: intrões);
- B) ampliação da região à volta do Exão IV no plasmídeo RSVuPA mostrando também os nucleotídeos em codões que são divididos em dois codões adjacentes assim como os correspondentes aminoácidos,
- C) a mesma região descrita atrás (Fig. 3) B, em RSVuPA_{P>S} (esquerda) e RSVuPA_{B>X} (direita);
- D) estrutura da região GFD na ORF de RSVuPA-EO (esquerda) e RSVuPA-E2 (direita); os novos codões e aminoácidos criados nos plasmídeos quiméricos estão apresentados por baixo dos mapas; os exões derivados de RSVuPA_{P>S} estão identificados como "1", enquanto os derivados de RSVuPA_{B>X} estão identificados como "2".

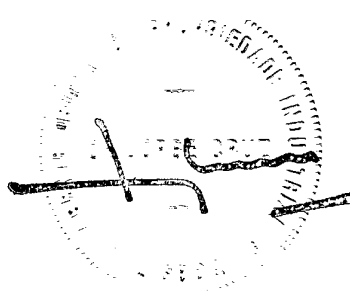


Fig. 4 Mapa de restrição de pBPV-230.8

pML2dx, derivado do pBR322 é inserido no sítio único, BamHI do genoma de BPV-1 (Saver et al. Mol. Biol. 5, 3507; 1985) e o sítio BamHI adjacente ao extremo 3' da região transformante é modificado para Sall.

Fig. 5 Construção de uma cassette de expressão do uPA humano

O plasmídeo RSVuPA tem dois sítios de restrição únicos, NdeI e ApaI que estão modificados com adaptadores XhoI obtendo-se o plasmídeo p71. A partir deste último pode-se obter uma cassette de expressão do uPA (ver o fundo desta figura) por digestão com XhoI. Este fragmento, que é adequado à inserção entre dois sítios XhoI e/ou Sall, pode conduzir a transcrição do gene do uPA humano.

Fig. 6 Inserção da construção RSV-uPA em vectores episomais

O plasmídeo pBPV230.8 é modificado por substituição de um dos três sítios virais BamHI, HindIII e Sall obtendo respectivamente pBB, pBH e pBS. O novo sítio XhoI está numa caixa em cada vector derivado. Os novos sítios BamHI e Sall resultantes da inserção do adaptador XhoI e ladeando o sítio XhoI em pBB e pBS estão sombreados.

Nos três plasmídeos a construção RSV/uPA (ver Fig. 3) é inserida no sítio XhoI em ambas as orientações obtendo-se os seguintes plasmídeos:

- pBBuPAa, pBHuPA e pBSuPAa em que os mRNAs de uPA e BPV são transcritos no mesmo sentido:
- pBBuPAb, pBHuPAb e pBSuPAb, em que o mRNA de uPA e os mRNAs de BPV são transcritos no direcção oposta.

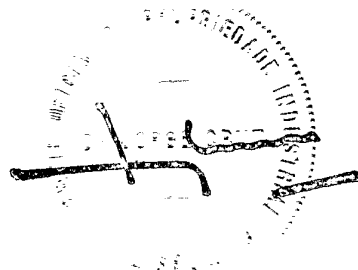


Fig. 7 Modificação da ORF do uPA em vectores derivados de BPV

Carta da construção dos vectores derivados do BPV expressando uPA (A), GASGA-EO (B) e GASGA-E2 (C). No topo estão indicados os derivados XhoI de pBPV230.8, à esquerda os vectores de expressão derivados de RSV-Neo que dão origem à cassete RSU/uPA (vectores de expressão de uPA) (Fig. 7A) ou o fragmento BssHI/SacI (vectores de expressão de GASGAs, Fig. 7B e C) que derivam respectivamente de RSVuPA-EO e RSVuPA-E2.

Fig. 8 Construção de puPA2

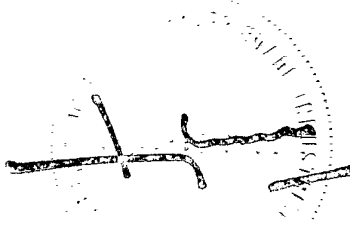
O plasmídeo pEMBL8-CAT deriva de pEMBL8 através da substituição do fragmento entre ClaI e HindIII com um fragmento portador do gene bacteriano CAT (Dente et al., Nucl. Acid. Res., 1645-1655, 1983). Um fragmento SmaI contendo o promotor de uPA é inserido a montante do gene CAT dando origem ao plasmídeo puPA2 (esta figura, à direita) que tem o promotor na grelha com orientação correcta.

Fig. 9 Sequência do promotor uPA humano

Está apresentado a sequência de um fragmento SmaI de 2,38 kb de DNA do fago lambda-uPA1, contendo o ponto de iniciação do mRNA, a caixa TATA e as regiões reguladoras a montante do promotor uPA. O nucleotídeo +1 no mapa corresponde ao primeiro nucleotídeo no mRNA de uPA descrito por Riccio et al usando a análise por extensão de iniciador.

Fig. 10 Mapa de restrição do promotor uPA e seus derivados

Está representado o mapa de restrição dos plasmídeos puPA2 modificados indicando as regiões onde o promotor de uPA foi modificado; em particular:
- puPA2/41, em que o sítio SmaI no extremo 5' do promotor é convertido em XhoI;



-puPA2/17, em que a região entre os dois sítios OxaNI foi eliminada;

- puPA2/254, em que a região entre o sítio OxaNI e o sítio EcoRV foi eliminado.

Fig. 11 vetores derivados do promotor uPA

Fig. 11A descreve o mapa de restrição dos plasmídeos puPA2/41, puPA2/17 e puPA2/254

Fig. 11B pPP17 e pPP254 que são obtidos a partir de puPA2/41, puPA2/17 e puPA/254 respectivamente, por excisão do gene CAT por digestão com SalI/XbaI e ligação de adaptadores SalI. Estes vetores contêm o promotor uPA (ou um seu derivado), a caixa TATA e o ponto de iniciação do mRNA e podem ser usados para expressar genes ou cDNAs inserindo-os, por exemplo, no extremo 3' com sítio SmaI ou com Sítio BamHI com fragmentos tendo extremos MboI, XhoII, BglIII, BclI e BamHI. Estas construções podem ser retiradas por dupla digestão com XhoI e SalI. A mesma dupla digestão pode ser usada para remover a construção do promotor para inseri-lo como "cassete de expressão" num plasmídeo diferente 5' relativamente ao gene ou cDNA a ser expresso. O círculo a cheio indica a origem de replicação do plasmídeo.

Fig. 11C descreve os plasmídeos pPP41XS, pPP17XS e pPP254XS, os quais derivam de pPP41, pPP17 e pPP254, respectivamente, através da inserção de um fragmento SmaI de 7,3 kb contendo a ORF do uPA no sítio SmaI do plasmídeo.

Fig. 12 Construção de minigenes derivados de vetores de expressão de GASGs.

Os vetores que expressam uPA (pPP::XS,

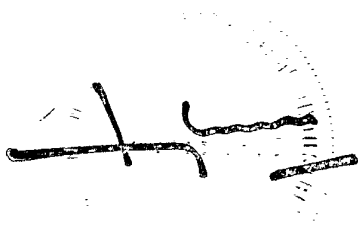


Fig. 12A) são modificados na ORF do uPA para eliminar o ExãoIV (pPP::Xs-EO, Fig. 12B) ou para o duplicar (pPP::XS-E2, Fig. 12C).

Fig. 13 Ensaio de ligação ao receptor do uPA

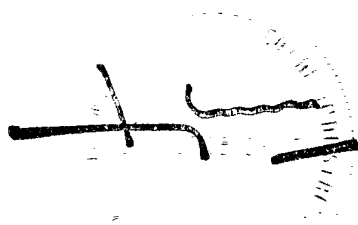
A figura mostra a inibição da ligação de ^{125}I -DFP-UK ao receptor de uPA em células U937 quando se adiciona sobrenadantes de cultura de células CHO transformadas com o vector GASGA-EO. uPA não marcado está presente como controle positivo.

Fig. 14 Construção de RSVuPA-EO-49

RSV-uPA-EO-49 é um vector de expressão contendo a ORF do uPA com uma deleção correspondendo substancialmente ao exão IV (i.e. a região codificadora de GDF) (cf. esta figura parte direita inferior). Obtem-se através de ligação de um fragmento RSV-uPA_{B > X} contendo a maior parte do plasmídeo mas sem os exões III e IV (esta figura, parte superior direita) com um fragmento de plasmídeo HindIII-SalI isto da parte 3' do intrão B até à parte 5' do intrão C (ver a parte inferior desta figura, no meio). O fragmento RSV-uPA_{B > X} atrás mencionado é obtido por digestão de RSV-uPA_{B > X} com HindIII-SalI (fig. 2), enquanto o fragmento HindIII-SalI (que corresponde substancialmente apenas ao exão III) é obtido por digestão com HindIII de um fragmento de plasmídeo derivado de p71 por digestão com PstI (ver fig. 5) cujos extremos foram modificados com o adaptador SalI.

Fig. 15 Construção de RSV-G-Asp

O plasmídeo RSV-G-Asp (ver a parte inferior desta figura) é construído por digestão parcial de RSV-uPA (ver a parte inferior desta figura) com ScaI, modificação dos extremos com um adaptador Asp718 e selecção do padrão de restrição adequado. Este vector tem a ORF de uPA a jusante



da inserção que não está na mesma grelha de leitura.

Fig. 16 Construção de RSVuPA-Tet

O plasmídeo pBR13Tet está representado na parte inferior desta figura (d). É construído eliminando a maior parte do gene de resistência à ampicilina em pBR322 através da digestão com PstI e HindIII e recircularização do plasmídeo após terem sido tornado cegos os extremos protuberantes.

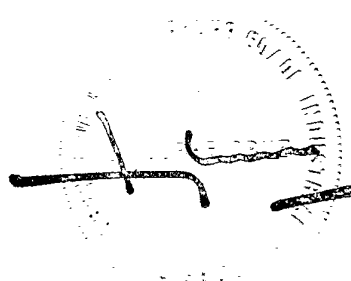
A partir deste plasmídeo (pBR1Tet ver b) um fragmento NdeI/PvuII contendo o gene de resistência à tetraciclina e a origem de replicação foi ligada ao fragmento NdeI/HpaI de RSVuPA (ver C) contendo o promotor RSV e o gene uPA humano em adição ao seu próprio sítio de poliadenilação (PAS).

Fig. 17 Construção de RSVuPA-Tet modificados com adaptadores

O plasmídeo RSVuPA-Tet (ver a parte de cima desta figura), contendo um único sítio ScaI no exão IV do uPA, é linearizado com ScaI e modificado adicionando um adaptador Asp718 obtendo-se o plasmídeo RSVuPA-Tet-Asp (inferior esquerdo), um adaptador ClaI obtendo-se um plasmídeo designado RSVuPA-Tet-Cla (inferior centro) ou um adaptador XhoI obtendo-se um plasmídeo designado RSVuPA-Tet-XhoI (inferior direito). Estes plasmídeos têm a região codificadora do uPA a jusante da inserção que já não fica na mesma grelha de leitura.

Fig. 18 Sequências de DNA e aminoácidos de GASGAs interrompidos

Os plasmídeos RSV-uPA-Tet-Asp, RSV-uPA-Tet-Cla, RSV-uPA-Tet-XhoI que possuem a região codificadora do uPA a jusante da inserção e fora da grelha de leitura são



modificados separadamente por digestão com a enzima específica para o sítio derivado do poliadaptador e preenchimento parcial ou total dos extremos protuberantes para restaurar a grelha de leitura correcta. As sequências de DNA e de aminoácidos perto da modificação estão apresentados nesta figura. A coluna encimada por "sítio modificado" refere-se ao sítio modificado do plasmídeo de partida (e.g. Asp718 indica o sítio único de RSV-uPA-Tet-Asp que é usado como material de partida para se obter o plasmídeo modificado divulgado nesta figura, nomeadamente RSV-SAD no caso do preenchimento parcial ou RSV-SVRTD no caso de preenchimento completo). Esta figura mostra também os sítios de restrição introduzidos com o preenchimento.

EXEMPLOS

Os exemplos que se seguem têm como finalidade apenas a ilustração do invento e do modo como pode ser explorado, não podendo ser considerados como limitação do seu âmbito. Para tornar mais fácil a compreensão dos exemplos que se seguem, referimos nos parágrafos anteriores aos exemplos (de 1.1 a 1.6.5) as técnicas e métodos (como sejam modificação enzimática de DNA, precipitação de DNA, purificação de proteínas, etc.) que são aplicadas, essencialmente do mesmo modo, em diferentes exemplos. De facto, nos exemplos, em vez da repetição de todo o processo, é muitas vezes referido o parágrafo onde está descrito.

1.1 As células usadas podem ser adquiridas comercialmente ou conseguidas através da comunidade científica ou depositário autorizado.

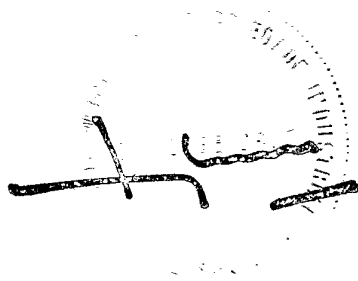
1.2 As células são cultivadas num meio adequado como seja meio de Eagle modificação de Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro fetal de vitela inactivado pelo calor.

1.3 - Meios, tampões e soluções para biologia molecular

Quando disponíveis os reagentes são "grau DNA/RNA" e "grau analítico" em todos os outros casos. A não ser que seja indicado, os meios líquidos e sólidos para crescimento de bactérias e fagos, tampões e soluções são preparados, guardados e usados como indicado em Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J., Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1982), aqui designado "Maniatis et al". A não ser que de outro modo seja indicado, o material de vidro, material de plástico e aparelhagem de laboratório são preparados, guardados e usados como indicado na mesma referência. Usa-se água desionizada/destilada e autoclava-se quando usada em tampões de enzimas.

1.4 - Enzimas para biologia molecular

Endonucleases de restrição, enzimas para modificação de DNA e RNase são as disponíveis no mercado. Usamos as adquiridas à Boehringer, Bethesda Research Laboratories (BRL), Pharmacia; lisozima e albumina do soro bovina (BSA) são adquiridas comercialmente. Compramos a lisozima à Sigma e a BSA à Boehringer. Para cada reação enzimática são usadas soluções tampão convencionais. A sua composição e preparação são de um modo geral conhecidas e por conveniência são preparadas de acordo com a informação que acompanha cada uma das enzimas, as preparações são esterilizadas por filtração e guardadas em pequenas quantidades a -20°C . Muitos tampões de uso corrente pode ser adquiridos no mercado como concentrados. Pode-se adquirir facilmente adaptadores de DNA sintético assim como t-RNA e DNA de esperma de arenque. Compramos os adaptadores de DNA sintético à P-L Pharmacia ou New England Biolabs, enquanto que o tRNA e DNA de esperma de arenque são da Boehringer.



1.5 - Técnicas de rDNA

A menos que de outro modo seja indicado nos exemplos que se seguem, as técnicas de rDNA são efectuadas como descrito em Maniatis et al., e nas referências originais ali encontradas.

1.5.1 - Digestões de restrição e modificação enzimática do DNA

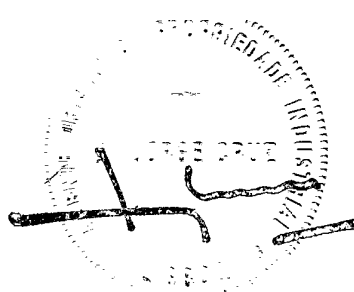
As digestões de restrição múltiplas e simples e modificações enzimáticas do DNA são efectuadas como é do conhecimento geral e também como descrito nos livretes dos fabricantes normalmente distribuídos e em Maniatis et al, cap. 4. "Inactivação pelo calor" significa inactivação da enzima a 70°C durante 10-15 min., depois deixar a mistura entre (0 a 15 min. à temperatura ambiente e centrifugação durante 2 min. numa centrifuga Eppendorf. De preferência, as digestões de restrição e os resultados da modificação enzimática do DNA são testados em géis de agarose contendo 0,5 microg/ml de brometo de etídio e migração a 100 U durante 1-2 h (ver também Maniatis et al., cap. 5).

1.5.2 - Extracções em fenol/clorofórmio

De preferência, as extracções com fenol/clorofórmio de proteínas e ácidos nucleicos em soluções aquosas são efectuadas como descrito em Maniatis et al., pág. 458; O DNA é novamente extraído quando o volume de reacção é inferior a 200 microl.

1.5.3 - Precipitação de DNA

De preferência, as precipitações de DNA são efectuadas adicionando 0,1 volumes de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 3 volumes de etanol (a -20°C). Adiciona-se 20 a 40 microg de tRNA apenas quando indicado nos exemplos que se seguem. A mistura é deixada num banho de neve carbónica/etanol



durante 15 a 30 minutos ou a -20° durante a noite e depois centrifugada a 4°C durante 15 min. a 10 000 xg numa microcentrifuga Eppendorf ou numa centrífuga Sorvall. O sedimento de DNA é lavado uma vez com etanol a 70% e depois uma vez com etanol a 100% e finalmente seco numa centrifuga de vácuo Savant.

1.5.4 - Desfosforilação 5'

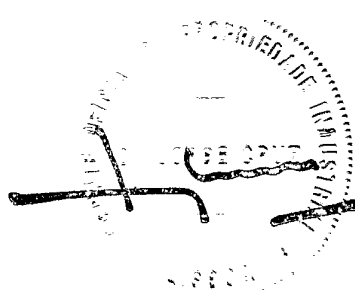
De preferência, os extremos 5' do DNA são desfosforilados com fosfatase de intestino de vitela comercial (CIP), (da Boehringer) a 37°C durante 1 h. CIP é removido por extracção com fenol: clorofórmio ou pela adição de EGTA, ácido etileno bis (oxietilenonitrilo)-tetracético para uma concentração final de cerca de 50 mM e aquecimento a 68°C durante 45 min.

1.5.5 - Ligação do DNA

As ligações do DNA são efectuadas como é do conhecimento geral. Por conveniência, seguem-se as intruções dos produtos de DNA-ligase de T4. Por conveniência as reacções de ligase são efectuadas a 8°C quando se usam adaptadores sintéticos, entre 14 e 16°C em todos os outros casos. Quando se liga DNA com extremos cerses adiciona-se PEG1500 ou PEG4000 para uma concentração final de 10%. Convenientemente usa-se tampão de ligação 10x com a seguinte composição: 0,66 M Tris-HCl pH 7,6, 50 mM MgCl_2 , 50 mM ditiotreitól e 5 mM ATP.

1.5.6 - Adaptadores de DNA

De preferência, usam-se DNAs adaptadores fosforilados e testados como indicado em Maniatis et al., páginas 125-126, e usam-se como indicado na página 392 e seguintes. As reacções de fosforilação, ligação e restrição do adaptador sózinho e dos fragmentos de DNA providos de adaptadores são testadas por electroforese do adaptador num gel de 2% de



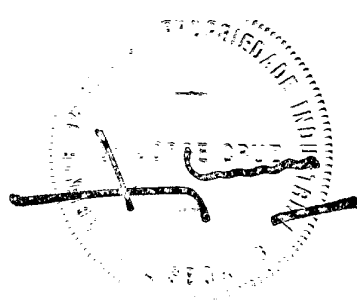
agarose durante 10 a 20 min. e durante 1 a 2 horas no caso de fragmentos com adaptadores e depois visualizado o DNA por autorradiografia como indicado em Maniatis et al., pág. 172.

1.5.7 - Electroforese em gel preparativo

De preferência a electroforese em gel preparativo é efectuada num gel de 0,7% a 0,8% de agarose contendo 0,5 microg/ml de brometo de etídio em tampão TBE 1x (0,089M Tris, 0,089M ácido bórico e 0,002M EDTA, Maniatis et al., pág. 156). O DNA migra a 25V durante as primeiras 2 h e depois a 50V durante 16 a 20 h. Os fragmentos de DNA são visualizados num transiluminador de UV a 305 nm e as bandas de DNA são retiradas e electroeluidas num sistema de electroeluição (ISCO) em TBE 0,1X (ver atrás), a 400V durante 10 a 15 min. O DNA é então purificado numa coluna Elutip-D (Schleicher & Schuell) preparado e lavado com um tampão de baixa concentração salina e eluido com um tampão de alta concentração salina. Tipicamente a coluna é preparada num tampão contendo 0,2M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,3-7,5 (Tris é 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol) e 1,0 mM EDTA. Este tampão é também usado na lavagem enquanto o tampão de eluição contem 1,0M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,3-7,5 e 1,0 mM EDTA. Finalmente o DNA é precipitado como indicado em 1.5.3.

1.5.8 - Transformação de E. coli

De preferência a transformação de E. coli (c.f. Hanahan D., Studies on transformation of E. coli with plasmíds., J. Mol. Biol. (1983) 155 557-580) é efectuada usando células competentes comerciais, ou de outra fonte, como sejam as estirpes DH1, DH5 ou HB101 da BRL (Bethesda Research Labs) de acordo com técnicas conhecidas per se que também estão resumidas na literatura do fornecedor. Por conveniência, usa-se o protocolo de 100 microl (BRL) quando se insere um fragmento de DNA num plasmídeo diferente enquanto que se usa o protocolo de pequena escala, 20 microl (BRL) quando da con-



versão de sítios de restrição por adaptadores de DNA. Após incubação sem antibiótico, as células são semeadas em placas de agar LB (Maniatis et al. p. 440-444) e incubadas durante a noite a 37°C na presença do antibiótico adequado.

1.5.9 - Despiste das células transformadas (análise miniprep)

De preferência, as colónias resistentes das células de E. coli competentes transformadas com DNA são despistadas através do crescimento de colónias isoladas durante a noite a 37°C em 5 ml de LB e o antibiótico adequado (Maniatis et al., p. 440) e análise de amostras (1,5 ml) da cultura líquida com o método da fervura conforme descrito em Maniatis et al., p. 366-367. Convenientemente podem ser as variações seguintes:

- volumes de reacção aumentados até 1,5 vezes;
- E. coli estirpes DH1 e DH5 são fervidas durante 60 seg.;
- precipitação de DNA efectuada sem adição de sal mas com adição de 1 vol de isopropanol e deixando os tubos a -20°C durante 20 a 25 minutos;
- o DNA precipitado é lavado uma vez com 1 ml de etanol a 70% e uma vez com 1 ml de etanol a 100%;
- adiciona-se RNase sem DNase até 10 microg/ml e o DNA é incubado 20 min. a 70°C.

1.5.10 - Preparação de plasmídeos em larga escala

De preferência, as preparações de plasmídeo em larga escala são efectuadas como descrito em Maniatis et al., cap. 3. De preferência usa-se o método de lise alcalina para recuperar o DNA de plasmídeo (c.f. Maniatis et al, p. 90-91), o DNA de plasmídeo é purificado duas vezes em gradiente de CsCl contendo brometo de etídio, em seguida a mistura é extraída com álcool isoamilico e a fase aquosa contendo DNA é separada e dialisada contra TE pH 8 (Maniatis et al.) e guardados a 4°C.


1.6 - Purificação e caracterização dos GASGAs obtidos

1.6.1 - Produtos químicos:

Todos os reagentes usados são comerciais ou facilmente preparados a partir de produtos comerciais. Por exemplo, a lista que se segue inclui alguns reagentes usados nos exemplos que se seguem e as suas fontes: Affi-Gel 10 (agrose activada), acrilamida, bisacrilamida, dodecilsulfato de sódio e Coomassie Brilliant Blue foram da Bio Red, Richmond, USA; Sepharose activada com CnBr, Kit de calibração para electroforese de proteínas de baixo peso molecular foram da Pharmacia, Uppsala, Sweden. As anfolinas foram da LKB AB, Bromma, Sweden; albumina do soro bovina (BSA), fracção Chon V, tripsina de porco, plasmina de porco, fracção I de fibrinogénio tipo IV, benzamidina, foram da Sigma Chemical Co. St. Louis, MO 63178, USA; aprotinina foi da Bayer, Leverkusen, GFR, glicopeptidase F da Boehringer Mannheim GmbH, FRG; S-2444 da Kabi AB, Stokolm, Sweden. Urocinase de alto peso molecular (HMW-uPA) e o chamado fragmento amino-terminal (ATF) foram produzidos por Lepetit Research Laboratories SpA Milano, Itália. Scu-PA (pro-uPA) pode ser preparado substancialmente seguindo o processo descrito por Stump D.C., Thiebpoint M., Collen D., J. Biol. Chem. 261, 1267-1273, 1986. A431 scu-uPA é obtido de acordo com o método descrito por Corti A., Nolli M.L., Soffientini A., Cassani G., em Tromb. Haemostas 1986; 56, 219-224. Todos os outros reagentes foram produtos comerciais grau analítico adquiridos à Merck Darmstad, GFR ou Carlo Erba, Itália.

1.6.2 - Ensaio imunológicos e de actividade

O ensaio fibrinolítico é efectuado pelo método das placas de fibrina (Astrup T., Mullertz S., The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity, Arch. Biochem. Biophys 1952, 40: 346-351). O padrão de referência urocinase é usado para calibrar cada ensaio. A actividade é medida em Unidades Internacionais (U.I.) relativa à Interna-

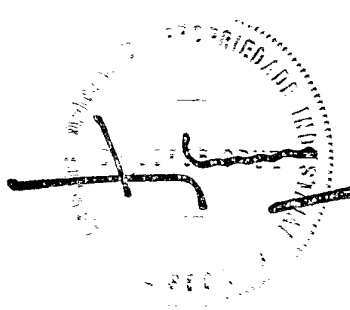


tional Reference Preparation como padrão primário. A actividade fibrinolítica latente de sc-uPA (urocinase de cadeia simples produzida por células) é determinada após activação como se segue: plasmina (10 mg) é acoplada com Sepharose (agarose interligada) activada com CNBr (2,5 ml) usando tampão de carbonato de sódio 0,5M como agente de acoplagem. Uma suspensão a 1:10 de plasmina-agarose (0,9 ml) em cloreto de sódio 0,15M, tampão de fosfato de sódio 0,05M pH 7,4 é misturado com amostras de sc-uPA (0,1 ml) e agitado suavemente durante 1 h a 20°C. A plasmina-agarose é removida por centrifugação 2 min a 1000xg e o sobrenadante testado pelo ensaio de placas de fibrina. As concentrações de proteínas foram medidas de acordo com o método de Lowry (Lowry O., Rosebrough. H., Parr A., Randall R., Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-275). Os ensaios amidolíticos são efectuados medindo a velocidade de hidrólise do substrato sintético piro-Glu-Gli-Arg-pNA, S-2444. (Claeson G., Friberger P., Knos M., Eriksson E., Methods for determination of pre-Kallikrein in plasma, glandular Kallikrein and urokinase, Haemostasis 1978; 7:76-78).

O ensaio imunoabsorvente-amidolítico (IAA) é efectuado como descrito, por Corti A., Nolli M.L., Cassani G., Differential detection of single-chain and two chain urokinase type plasminogen activator by a new immunoadsorbent amidolytic assay (IAA), Tromb. Haemostas 1980, 56: 407-410. O ensaio combina a selectividade dos imunoenaios com a especificidade dos ensaios de actividade enzimática explorando as propriedades antigénicas e enzimáticas das duas proteínas.

Em ensaios separados são usados dois tipos de anticorpos monoclonais:

- a) um anticorpo monoclonal que reconhece a região da proteína que inclui o domínio GFD sem reconhecer a parte catalítica da proteína ou o domínio de ansas múltiplas (como se-



ja MAB CD₆ ou DC₁).

- b) um anticorpo monoclonal que reconhece o domínio catalítico da proteína sem interferir com a actividade enzimática e sem reconhecer a região que inclui o domínio GF (como sejam os citados atrás na descrição).

GASGAs ligam-se aos anticorpos monoclonais do ponto a) atrás, mas não se ligam aos MABs do ponto b), enquanto ao contrário, scuPA/tcuPA ligam ambas as séries de MABs. GASGAs, ATF e scuPA/tcuPA ligam-se aos MABs que reconhecem o domínio de ansas múltiplas como seja MAB 5B4.

1.6.3 - FPLC de fase reversa

A cromatografia de fase reversa é efectuada com um sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) (Pharmacia Fine Chemicals) usando uma coluna de cromatografia de fase reversa pro-RPC HR5/10 (silica macroporosa de micropartículas com grupos C₁/C₈ ligados), tampões de eluição: tampão A, ácido trifluoroacético a 0,1% em água e tampão B, ácido trifluoroacético a 0,1% em acetonitrilo; modo de eluição: 100% de A durante 20 min, gradiente linear de 0 a 60% de B em A em 65 min, 100% de B durante 25 min; caudal 0,3ml/h.

1.6.4 - Processos electroforéticos:

A electroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) foi efectuada de acordo com Laemmli UK (Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 1970, 227: 680-685) em gel vertical (normalmente 1,5 x 120 x 150 mm). Os géis de concentração e separação continham 3% e 12,5% de acrilamida respectivamente. Em cada gel migraram também proteínas marcadoras do "Kit" comercial de calibração de electroforese para determinação dos pesos moleculares (Pharmacia). Usou-se 2-mercaptoetanol como agente redutor e Coomassie Brilliant Blue R250 para a

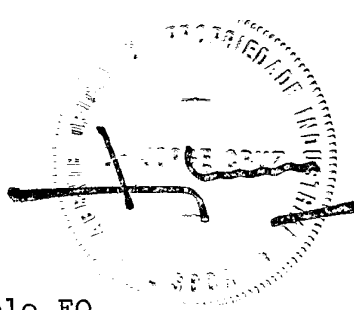
coloração do gel. Quando o gel tem um teor diferente de acrilamida indica-se geralmente entre parêntesis. Fez-se imunotransferência essencialmente como é do conhecimento geral (cf. Salermo G., Verde P., Nolli M.L., Corti A., Szots H., Meo T., Johnson J., Bullok S., Cassani G., Blasi F., Monoclonal antibodies to human urokinase identify the single-chain pro-urokinase precursor, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1984, 81: 110-114), usando anticorpos monoclonais purificados que não reconhecem ou ligam a região contendo o GFD de uPA como sejam os que reconhecem a cadeia B do uPA sem reconhecerem a cadeia A, os quais estão descritos por Herion et al. em Bioscience Reports 1, 885-892 (1981), Salermo M.G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81, 110-114, ou Kaltoft et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79, 3720-3723 ou um anticorpo monoclonal que se liga à cadeia A apenas na região de "ansas múltiplas" como seja o MAB 5B4 (ver atrás, Nolli et al).

1.6.5 - Purificação de GASGAs

Os GASGAs são purificados a partir dos sobrenadantes de culturas celulares por imunocromatografia e FPLC de permuta iônica como previamente descrito para a purificação de A431-uPA a partir de sobrenadantes de células tumorais A431 (Corti A., Nolli, M.L., Soffientini A., Cassani G., Purification and characterization of single-chain urokinase-type plasminogen activator (pro-urokinase) from human A431 cells, Throm Haemostas 1986; 56: 219-224). Uma matrix de agarose modificada portadora de um anticorpo monoclonal que se liga à cadeia B do uPA sem se ligar à cadeia A (como seja MAB AAU2 descrito por Herion P. e Bollen A. em Bioscience Reports 3, 373-379, 1983) é equilibrado com cloreto de sódio 0,15M e tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,4 contendo 1% de polietilenoglicol (PEG) 6000. A coluna é cheia com 2 litros de sobrenadantes celulares a um fluxo de 50 ml/h a 4°C e depois lavada com o tampão de equilíbrio. A desabsorção é efectuada com cloreto de sódio 1M e ácido acético 0,1M contem-

do 1% de PEG 6000. Todas as fracções são testadas por IAA (ver 1.6.2) e as fracções que contêm GASGAs são colhidas, reunidas de acordo com o seu teor e ainda purificadas e concentradas por cromatografia de permuta iónica num sistema FPLC ("fast protein liquid chromatography") (Pharmacia Fine Chemicals, Swedên) usando uma coluna Mono S HR 5/5 (permuta catiónica forte baseado em esferas de resina hidrofílica com uma distribuição estreita do tamanho das partículas; o grupo carregado é $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$) pré-equilibrado com tampão acetato de sódio 0,05M, pH 4. A amostra é geralmente diluída duas vezes com água destilada para reduzir a força iónica e depois aplicada na coluna. Após lavagem com o tampão de equilíbrio, as proteínas são eluídas com um gradiente linear de sal/pH, mistura de tampão A (tampão acetato de sódio, pH 4) e tampão B (cloreto de sódio 1M, acetato de sódio 0,05M, pH 5) de 30 a 70% de B em A em 50 min., depois 100% de B durante 20 min; caudal 60 ml/h. O teor de GASGAs enzimáticamente activos e inactivos, antigénio de GASGAs activável pela plasmina, é medido pelo ensaio imunoabsorvente-amidolítico (IAA) (ver 1.6.2). Os GASGAs enzimáticamente activáveis no produto final totalizam cerca de 95% do total. A análise por FPLC de fase reversa de GASGA resultou num único pico de absorvância a 280 nm.

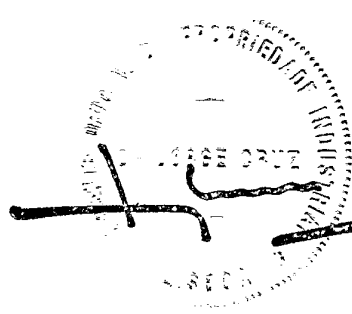
Como alternativa, o processo acima é efectuado numa matrix de afinidade que é uma matrix de Sepharose-MAB 5B4 preparada como descrito por Corti et al (ver atrás). A eficácia da purificação é semelhante à descrita atrás.



Exemplo EO

Biblioteca genômica humana

Prepara-se uma biblioteca de DNA genômico humano em bacteriofago lambda Charon 28 por técnicas conhecidas (c.f. P.H. Hieter et al., Cell, Vol. 22, 197-207 (1980) e Maniatis et al.). O lisado de lambda recombinante é titulado em E. coli K12 estirpe LE 392 (Maniatis et al. p. 504). As técnicas para titulação em placas, assim como para despiste de uma biblioteca de fagos com uma sonda marcada por "nick-translation", são também bem conhecidas (Maniatis et al.) e são aplicadas essencialmente como descritas nas experiências que se seguem. Para o despiste, 10 microlitros de uma diluição de mil vezes do lisado são adsorvidos a 0,3 ml de uma cultura 2,5 vezes concentrada de E. coli K12 LE 392 em 10 mM MgSO₄ e incubado durante 20 minutos a 37°C. Adiciona-se 7 ml de agarose a 0,7% e toda a mistura é semeada em caixas de plástico de 150 mm contendo agar NZYMC. (Ver Maniatis et al.). Usou-se um total de 0,41 ml de uma diluição de 10⁻³ do lisado com um total de 41 caixas. Após um dia de incubação observou-se uma média de 1,5x10⁴ placas/caixa. Observou-se um total de 6x10⁵ placas nas 41 caixas que é uma boa representação. Todas as placas de cada caixa são transferidas para dois filtros de nitrocelulose (Schleicher and Schuell Co.). Secam-se os filtros, lavam-se, incubam-se sob vácuo e são pré-hibridados como descrito (ver Maniatis et al.). A hibridação é efectuada com uma sonda marcada por "nick-translation" consistindo num fragmento de DNA isolado a partir de um cDNA de urocinase humana (Verde A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 4727-4731, 1984).



EO.1 - "Nick-translation"

O plasmídeo pHUK-I (verde et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 4727-4731, 1984) contem uma inserção recombinante complementar do mRNA de urocinase humana. Um fragmento de cerca de 1,5 kb é removido por tratamento com a endonuclease de restrição Pst-I, isolado por electroforese em gel de agarose, retirado na região de gel correspondente e recuperação do fragmento de DNA por electroeluição (1.5.7). O fragmento PstI de 1,5 kb contem cerca de 75% da região codificadora do mRNA da urocinase humana (Verde et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 4727-4731, 1984). A marcação uniforme deste fragmento PstI (5,0 microg) é efectuada com um "kit" de "nick-translation" da Bethesda Research Laboratories na presença de alfa ^{32}P -dCTP e de alfa ^{32}P -dGTP, 200 microCi de cada (c.f. Maniatis et al.). O rendimento de DNA marcado é $1,8-2,9 \times 10^8$ cpm/microg.

EO.2 - Isolamento de fagos positivos com genes uPA

Os 41 pares de filtros, são hibridados com o fragmento PstI marcado por "nick-translation". Grupos de 8 filtros são hibridados em 40 ml de solução de hibridação num único envelope de plástico com cerca de 10^8 cpm de DNA marcado. A hibridação é efectuada a 42°C durante 17 horas em $2 \times \text{SSC}$, 0,1% de dodecilsulfato de sódio (SDS) (Maniatis et al.). Os filtros são lavados quatro vezes em $2 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS durante 15 minutos à temperatura ambiente e uma vez em $1 \times \text{SSC}$ 0,1% SDS durante 2 horas a 68°C . Após secagem, os filtros são expostos a filmes de raios X (Kodak) durante 12-24 h e revelados. A partir deste despiste, as placas que deram uma mancha de hibridação positiva em posições idênticas em ambos os filtros dos duplicados (três) são colhidas com um pequeno volume de caldo NZYMC (Maniatis et al.) e usadas para infectar E. coli K12 L392 em diferentes diluições e espalhados em caixas de 10 cm com agar NZYMC. As caixas que dão entre 500 e 5000 placas são então seleccionadas e testadas no-



vamente. Estas placas são transferidas para filtros de nitrocelulose em duplicado (Schleicher and Schuell Co.) e os filtros são tratados e hibridados com o fragmento PstI de 1,5 kb marcado por "nick-translation" do cDNA de uPA humano descrito atrás. Praticamente todas as placas dão um sinal de hibridação positivo, com um factor de enriquecimento de cerca de 10^5 . Os isolados de placas individuais das três placas positivas foram designadas lambda-uPA-1, lambda-uPA-2 e lambda-uPA-3.

EO.3 - Preparação de fagos em larga escala

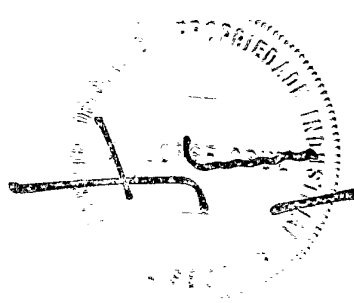
As placas são amplificadas em *E. coli* K12 LE 392 usando grandes lisados de cultura, os fagos são isolados por centrifugação repetida em cloreto de céσιο, purificados por extracção da fase aquosa com fenol e depois com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e precipitação do DNA com etanol a partir da fase aquosa de acordo com o processo descrito por Maniatis et al., cap. 3.

Exemplo E1

Expressão do gene codificador de uPA em células de mamífero

E1.1 - Isolamento da ORF de uPA

200 microg de lambda-uPA-1 obtido essencialmente como em EO.3 são digeridos em 80 microl com 30U de SmaI a 25°C durante 1 h; a reacção é parada com EDTA (concentração final 50 mM) e o DNA submetido a electroforese num gel de 0,8% de agarose contendo brometo de etídio usando um pente de 10 cm a 100V. Em seguida o gel é analisado com luz UV e a segunda banda mais lenta, um fragmento SmaI contendo a grelha de leitura aberta (ORF) do gene do uPA humano, de cerca de 7,3 kb removida do gel. O DNA é electroeluido e purificado como



descrito em 1.5.7.

El.2 - Preparação de DNA vector

Um fragmento derivado de RSV-neo contendo o promotor RSV e a resistência à ampicilina e origem de replicação derivadas do pBR322 é preparado por digestão com HindIII, preenchimento, digestão com HpaI, tratamento com CIP e separação do fragmento em gel de agarose.

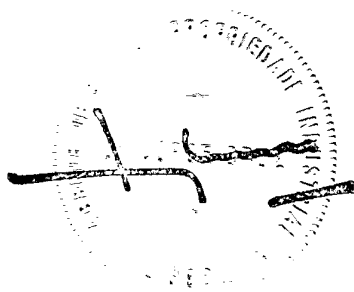
Mais particularmente, o vector RSV-neo é modificado como se segue (ver fig. 2):

El.2.1 - Digestão com HindIII

20 microg de DNA do plasmídeo RSV-neo é totalmente digerido com 80U de HindIII durante 1 h a 37°C em 200 microl. A enzima de restrição é inativada pelo calor e depois a mistura é extraída com igual volume de fenol; clorofórmio, o DNA é precipitado adicionando também 50 microg de tRNA (1.5.3) e redissolvido em 20 microl de TE (Maniatis et al).

El.2.2 - Preenchimento e digestão com HpaI

Os extremos protuberantes do vector aberto preparado acima são tornados cerses incubando o DNA com 1U do fragmento Klenow da DNA-polimerase I em 25 microl (Maniatis et al pág. 113) durante 1 h a 37°C e purificando-o como indicado em 1.5.2 e 1.5.3. Em seguida o DNA vector linearizado e com extremos cerses é clivado com 8U de HpaI em 40 microl durante 1 h a 37°C e purificado do mesmo modo. Estas operações clivam o gene de resistência à noemicina deixando um fragmento de DNA linear de 3,5 kb com extremos cegos tendo RSV-LTR aberto entre a região do promotor e o sítio de poliadenação e contendo a origem de replicação e o gene de resistência à ampicilina derivada do plasmídeo pBR322 (Fig. 2).



El.2.3 - Tratamento com CIP

O DNA é tratado com 1,5U de fosfatase de intestino de vitela (CIP) em 50 microl de meio de reacção (Volume final) de modo a remover o resíduo fosfato 5' dos extremos de DNA; a enzima é subsequentemente inactivada pela adição do ácido etileno bis(oxietilenitrilo)tetracético (EGTA) (concentração final 10 mM) e tratamento a 68°C (ver 1.5.4).

E.1.2.4 - Purificação do fragmento

Os fragmentos de DNA são separados usando um gel preparativo de 0,6% de agarose como indicado em 1.5.7. A porção do gel contendo a banda de 3,5 kb é removida e o fragmento de DNA electroeluído (1.5.7), a mistura obtida é ajustada à concentração salina adequada e purificado numa coluna Elutip-D (Schleicher and Schuell Co.). Após eluição, etanol, Na-acetato e adição de tRNA veículo à solução de DNA e o DNA precipitado e redissolvido em 20 microl de TE como descrito em 1.5.3.

El.3 - Clonagem do gene uPA sob o controle do promotor de RSV-LTR

3U de DNA-ligase de T4 e 2,5 microl de tampão 10x (Maniatis et al., p. 246) são adicionados a 3 microg de DNA vector desfosforilado (preparado como descrito em El.2) e 7,5 microg do fragmento uPA de 7,3 kb (preparado como descrito em El.1). A mistura da reacção de 25 microl é incubada 16 h a 14°C (ver 1.5.5) e usada para transformar 100 microl de células competentes E. coli HB101 (ver 1.5.8). As bactérias são seleccionadas durante 1 noite em placas de agar LB contendo 50 microg/ml de ampicilina a 37°C. Repicaram-se colónias isoladas, cultivaram-se em 5 ml de meio LB contendo ampicilina e processaram-se por análise convencional de mini-preparações (1.5.9). Os padrões de restrição dos DNA de plasmídeo purificados são estudados de modo a estabelecer a

orientação correcta do gene uPA na grelha de leitura do vector. Um destes plasmídeos tendo a orientação correcta foi designado RSV-uPA, isolado e usado em experiências posteriores (Fig. 2).

E.1.4.1 - Transfecção

RSP-uPA obtido acima é usado para transfectar células de mamífero. O processo usado está descrito mais detalhadamente no exemplo 2 quando do tratamento da transfecção com vectores GASGAs.

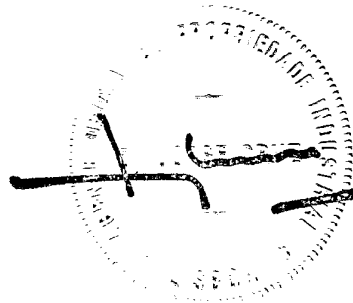
E1.4.2 - Cultura em massa

As células transformadas de elevada produção conforme obtidas atrás são ainda reclonadas e cultivadas em massa em grandes fermentadores de acordo com a técnica descrita no parágrafo correspondente do exemplo 2.

E1.5 - Quantificação de uPA

A produção de uPA pelas linhas celulares cultivadas como descrito acima é quantificada directamente nos clones resistentes G418 obtidos como descrito acima ou aplicando diluições seriadas dos sobrenadantes de células resistentes G418 em placas de caseína /agarose/plasminogénio conforme é conhecido através da avaliação da difusão radial do PA, após activação da plasmina no caso de cadeia simples, num gel de agar contendo caseína/plasminogénio substancialmente como descrito por Schumaker GFB e Schill W.B., em Anal. Biochem. 48, 9, 1972 e por Bjevum OJ et al., em Quantitative Immunoelectrophoresis, Scandinavian J. Immunol. suppl. 2, N.H. Axelsen ed., Aas e Wahl, Oslo, 1975, 82-83. Como alternativa a produção pode ser avaliada por IAA (ver 1.6.2).

A análise do uPA de duas cadeias activo versus a correspondente forma de cadeia simples é efectua-



da por IAA (ver 1.6.2).

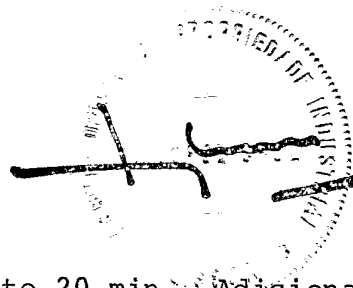
Exemplo 2

Construção de vectores de expressão de GASGAs

Para se obter unidades de transcrição expressando GASGAs de EO ou de E2 modificámos o plasmídeo RSVuPA (ver E.1.1.3) através da inserção de um sítio único no intrão C (5' relativamente ao exão IV, que contem a maior parte da região codificadora do domínio tipo EGF) ou no intrão D (3' relativamente ao exão IV) (Fig. 3B). Os plasmídeos resultantes, RSVuPA_{P > S} e RSVuPA_{B > X} (Fig. 3C), são usados para mutagenizar a ORF do uPA humano por alteração de exões obtendo-se dois vectores de expressão de GASGAs (Fig. 3D): RSVuPA-EO, em que o exão IV contendo o domínio tipo EGF foi eliminado; RSVuPA-E2, em que o exão IV foi duplicado.

E2.1 - Construção de RSVuPA_{B > X}

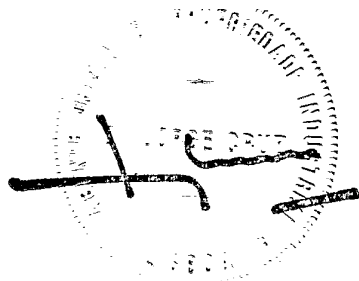
5 microg de DNA de RSVuPA são parcialmente digeridos com BglIII em vasos de reacção separados com a enzima variando entre 10U e 0,12U em 12,5 microl de tampão (volume final) durante 30 minutos a 37°C para encontrar as condições de reacção mais adequadas. Os tubos de reacção são colocados em neve carbónica/etanol, adiciona-se EDTA para 10 mM (concentração final) e finalmente a enzima é inactivada aquecendo durante 20 min. a 70°C. Uma amostra de cada tubo é analisado em minigel. Obtiveram-se bons resultados por digestão com 3,33U e 1,11U da enzima. Escolheram-se estas condições de reacção e usou-se 5 microg de DNA de RSV-uPA. Os extremos protuberantes 5' assim obtidos foram preenchidos separadamente usando 2U de DNA-polimerase de T4 na presença de dNTPs (concentração final 1 mM de cada) em 20 microl (volume final) durante 15 min a 37°C. Em seguida, a polimerase é inac-



tivada aquecendo a 70°C durante 20 min. Adiciona-se 2 microg de adaptador XhoI fosforilado e liga-se ao plasmídeo a 8°C durante 16 h em 80 microl de tampão (volume final) contendo 10% de PEG1500 e 1U de DNA-ligase de T4. Após inativação pelo calor, adicionam-se 8 microl de tampão XhoI, 80U em 1 microl de XhoI e 11 microl de água e o DNA é digerido durante 3h a 37°C; a enzima é então inativada pelo calor e o DNA precipitado, ressuspensão em 5 microl TE e ligado durante 3h a 15°C com 1U de DNA-ligase de T4 em 50 microl de tampão. 2,5 microl desta mistura são usados para transformar células competentes de E. coli HB101 e as colônias resistentes à ampicilina são despistadas por análise de minipreparações (1.5.9). Um plasmídeo tendo um sítio BglIII entre os exões IV e V convertido num sítio único XhoI (este fragmento de DNA modificado está ilustrado na Fig. 3C, à direita) é isolado e designado RSVuPA_B>X (aqui referido também como pB>X).

E2.2 - Construção de RSVuPA_p>S

O plasmídeo RSVuPA_p>X é obtido por digestão parcial de RSVuPA com PstI. As condições de restrição deixando aproximadamente 50% do DNA por clivar após 1 h a 37°C são aumentadas proporcionalmente para uma digestão de 50 microg/50 microl (0,0625U/microg) e após precipitação do DNA, os extremos protuberantes 5' são tornados cerses por tratamento com 2U de DNA-polimerase de T4 a 37°C durante 10 min. em 50 microl (volume final). 5 microg de DNA adaptador SalI fosforilado são então adicionados e ligados 16 h a 8°C em 100 microl (volume final) com 2U de DNA-ligase de T4 e 10% de PEG 1500. A ligase é inativada pelo calor e o DNA digerido (300 microl de volume final do tampão) com 80U de SalI a 37°C durante 3h. Finalmente o DNA obtido é aplicado num gel de 0,75% de agarose e migrado em paralelo com DNAs de plasmídeo linearizados (500 ng de cada). Uma porção do gel contendo as bandas que migram perto do marcador linearizado é cortada, electroeluída e purificada (1.5.7), ressuspensa em 5 microl de TE



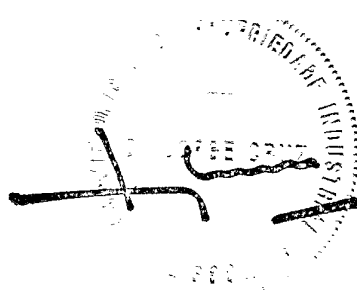
e auto-ligada em 10 microl durante 4h a 15°C com 2U de DNA-ligase de T4 (ver Maniatis et al). Usaram-se 2,5 microl para transformar células competentes de E. coli HB101 e as colónias resistentes à ampicilina são seleccionadas por análise de minipreparações (1.5.9). Um plasmídeo tendo um único sítio SalI em vez de sítio PstI situado entre os exões III e IV (este fragmento modificado está ilustrado na Fig. 3C à esquerda) é isolado e designado plasmídeo RSVuPA_{p > s}, aqui referido também como pP > S.

E2.3 - Preparação de fragmentos de DNA NdeI/XhoI a partir de RSVuPA_{B > X}

15 microg de DNA de RSVuPA_{B > X} são completamente digeridos com 40U de NdeI durante 3 h a 37°C em 40 microl (volume final). Este volume é levado até 50 microl com 5 microl de tampão 10X (Maniatis et al.) 1U de CIP e água. O DNA é desfosforilado durante 60 min. a 37°C, extraído uma vez com fenol:clorofórmio, depois precipitado e ressuspenso em 20 microl de TE (ver Maniatis et al). O plasmídeo linearizado é então totalmente digerido em 25 microl com 40U de XhoI e migrado num gel preparativo de 0,75% (1.5.7). As duas bandas que se formam são separadas, electroeluidas e purificadas como descrito em 1.5.7 e ressuspenso em 5 microl de TE.

E.2.4 - Preparação de fragmentos de DNA NdeI/SalI a partir de RSVuPA_{p > s}

15 microg de DNA de RSVuPA_{p > s} são digeridos totalmente com 40U de SalI a 37°C durante 60 min (40 microl, volume final). O volume da reacção é levado até 50 microl com 5 microl de tampão 10X, 1U de CIP e água e o DNA é desfosforilado durante 60 min. a 37°C, purificado como descrito no parágrafo anterior, digerido totalmente em 25 microl com 40U de NdeI a 37°C durante 5 h e os dois fragmentos de DNA resultantes são separados e purificados como descrito em 1.5.7.



E2.5 - Construção de RSVuPA-EO

1 microg do fragmento NdeI/SalI de 1,7 kb derivado de RSVuPA_{p > S} obtido acima é ligado com 2,5 microg do fragmento XhoI/NdeI de 8,6 kb derivado de RSVuPA_{B X} em 20 microl com 2U de ligase a 15°C durante 16h. 5 microl desta mistura são usados para transformar células competentes de E. coli HB101 e, entre as colônias resistentes à ampicilina, isola-se o plasmídeo RSVuPA-EO em que o exão IV de uPA está eliminado pela fusão dos intrões C e D e em que uma unidade de tirosina que é gerada pela fusão de resíduos de pares de bases dos códons relativos a Ser₉ e Asp₄₅, está inserida entre Pro₈ e Lis₄₆ (Fig. 3D à esquerda).

E2.6 - Construção de RSVuPA-E2

1 microg do fragmento NdeI/XhoI de 2,2 kb derivado de RSVuPA_{B > X} é ligado a 2 microg do fragmento SalI/NdeI de 9,1 kb derivado de RSVuPA_{p > S} indubando em 20 microl a 15°C com 2U de ligase. As colônias resistentes à ampicilina derivadas das células competentes de E. coli HB101 transformadas com 5 microl desta mistura são testadas por análise de minipreparações para isolamento do plasmídeo RSVuPA-E2 em que o exão IV e parte dos intrões ladeantes são duplicados e os dois domínios tipo EGF são ligados por uma treonina criada pelo codão de fusão (Fig. 3D, à direita).

E2.7 - Método alternativo para a construção de RSVuPA-EO

Um método alternativo para a construção de GASGAs EO é retirar os exões III e IV de um plasmídeo, como seja RSVuPA_{B > X}, por dupla digestão com HindIII e XhoI e substituí-los com um fragmento HindIII-PstI, incluindo apenas o exão III, em que o sítio PstI é convenientemente modificado para unir o extremo XhoI (ver Fig. 14). Resumidamente, obtém-se um fragmento de 275 pb a partir do plasmídeo p71 (fig.5) por:



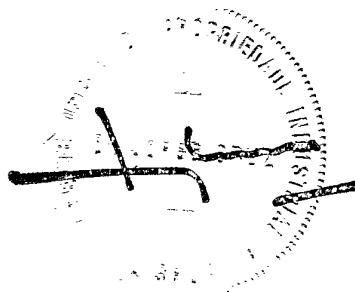
- digestão total com PstI;
- modificação dos extremos por DNA-polimerase de T4 e adição de adaptadores SalI;
- digestão com HindIII e tratamento com CIP seguido de digestão com SalI;
- purificação do fragmento em gel.

Este fragmento foi inserido em vector obtido a partir de RSVuPA_B > X por:

- digestão com XhoI e tratamento com CIP;
- digestão com HindIII;
- purificação em gel.

E2.7.1 - Preparação de um fragmento de 275 pb contendo o exão III

400 microgramas do plasmídeo p71 é digerido 1h a 37°C com 800U de PstI em 350 microlitros de tampão (1.5.1), em seguida a fracção de DNA é extraída e precipitada (1.5.2 e 1.5.3). Isola-se um fragmento de 0,69 kb e purifica-se em gel preparativo de 1,2% de agarose (1.5.7). Este fragmento é tratado com DNA-polimerase de T4 45 min a 37°C, a enzima é então inactivada pelo calor, as condições de reacção ajustadas ao tratamento com CIP em 100 microl (1.5.4) e o DNA desfosforilado 30 min a 37°C com 11U de CIP, extraído precipitado e ligado a um adaptador SalI de 8 meros, durante 16 h a 12°C. Após isto, a fracção de DNA é digerida com HindII em 200 microl de tampão com 400U de HindIII a 37°C durante 30 min, depois adiciona-se mais 50U da enzima e a reacção continua durante mais 60 min. Em seguida a enzima é inactivada pelo calor, as condições de reacção são ajustadas às condições de CIP em 400 ml de tampão contendo 11U de CIP e o DNA é desfosforilado durante 90 min a 37°C. Finalmente o DNA é digerido com 180U de SalI em 200 microl de tampão (volume final) durante 16 horas a 37°C e o fragmento de DNA de 275 pb que se obtem é isolado e purificado num gel de 2% de agarose.



E2.7.2 - Preparação do fragmento XhoI-HindIII a partir de RSVuPA_B X

50 microgramas do plasmídeo RSVuPA_B X é digerido em 350 microl de tampão com 200U de XhoI a 37°C durante 2h e 30 min (1.5.1), desfosforilado em 800 microl de tampão com 11U de CIP a 37°C durante 30 min, depois a 50°C durante 60 min (1.5.4) e finalmente extraído e precipitado (1.5.2 e 1.5.3) e totalmente digerido com HindIII a 37°C durante 1 hora. O fragmento de DNA de 9,9 kb que se forma é isolado e purificado por um processo de gel preparativo de 0,8% de agarose (1.5.7).

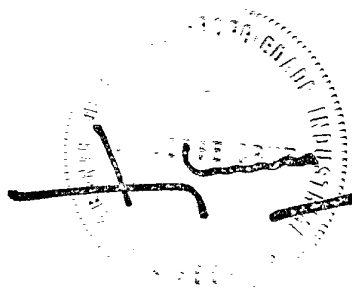
E2.7.3 - Construção de RSVuPA-EO-49

O fragmento de 275 pb preparado como em E2.7.1 e o DNA vector obtido como descrito em E2.7.2 são misturados numa proporção molar de 2:1 a diferentes concentrações (aproximadamente 600 ng/ml e 60 ng/ml, respectivamente) e ligados com 5U de DNA-ligase de T4 a 16°C em 100 microl durante 65 h, em seguida a fracção de DNA é precipitada e res-suspensa em 20 microl de água. Amostra desta solução são usadas para transformar células competentes de E. coli DH5 (1.5.8). Entre as colónias resistentes à ampicilina seleccionou-se uma para análise de minipreparações para testar o padrão de restrição esperado e designou-se RSVuPA-EO-49. (ver Fig. 14).

E2.8 - Expressão de GASGAs em células de mamíferos

Os vectores de expressão de GASGAs são transfectados em células LB6 de ratinho por técnicas de precipitação com fosfato de cálcio e os clones produtores de GASGAs são analisados por:

- ensaio de lise com caseína, como descrito por Piperno-Grannelli e Reich (J. Exp. Med. 148: 223-234, 1978) de modo a seleccionar clones produtores de PA e para quantificar a quan-



tidade de PA selecionado no meio de cultura;

- método das placas de fibrina, como descrito por Astrup T., Mullertz S., Arch. Biochem. Biophys, 1952, 40, 346-351;

- IAA, (c.f. 1.6.2) de modo a estabelecer as quantidades relativas de PAs de cadeia simples versus activados de duas cadeias;

- ensaio de ligação a receptores (como descrito por M.P. Stoppelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4939-4943, 1985), para verificar a capacidade dos GASGAs para se ligarem ao receptor de uPA em células U937 que se pensa ser o mesmo ou muito semelhante ao receptor de uPA endotelial.

E2.8.1 - Transfecção de vectores de expressão de GASGAs

Um dia antes das transfecções, as células (murinas LB6, descritas por Corsaro C.M. e Pearson L.M. em Somatic Cell Genetics, 7, 603, 1981) são semeadas a uma concentração de aproximadamente 10^4 microl/cm² em meio de Eagle modificação de Dulbecco (DMEM, Flow Laboratories Inc.) suplementado com penicilina (50U/ml), estreptomicina (50 microg/ml), 2 mM glutamina e 10% de soro fetal de vitela inactivado (FCS). No dia da transfecção as células estão na fase de crescimento logarítmico e são alimentadas 3 h antes da adição de DNA. O método de coprecipitação de DNA com fosfato de cálcio é essencialmente seguido na transfecção (Graliam e Vom der Eb, Virology 52, 456, 1983). O precipitado de DNA com fosfato de cálcio é preparado adicionando uma solução de DNA (neste caso uma mistura do vector de expressão de GASGAs, ver atrás, e RSV-Neo, ver El.2 uma proporção de aproximadamente 1:1) em COCl_2 2M (0,25 ml) (volume final) o tampão HBS 2x (137 mM NaCl, 0,7 mM Na_2HPO_4 , 21 mM Hepes, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanossulfónico, pH 7,1) (0,25 ml). Esta mistura de DNA coprecipitado é então adicionada às células. Após 3 h a 37°C, o precipitado é removido das células que são lavadas duas vezes com DMEM (sem soro fetal de vitela), adicionou-se 1,5 de uma solução a 15% de glicerol em HBS, as células são incubadas 1-2 min a 37°C e o glicerol é removido por

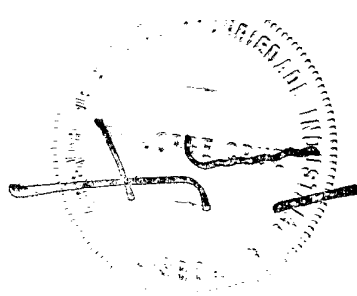
lavagem com DMEM (sem soro fetal de vitela). Em seguida as células são alimentadas com DMEM completo (ver acima quando do tratamento das culturas celulares) e deixadas a cerca de 37°C durante aproximadamente 48h, tripsinizadas muito suavemente e semeadas numa concentração de cerca de 10⁵ células/placa em DMEM + 10% de FCS inactivado pelo calor + 50U/ml de penicilina, 50 microg/ml de estreptomicina, 2 mM glutamina + 0,8 microg/ml de G418 (Geneticin). Em seguida, as células são incubadas durante cerca de 2-3 semanas, mudando o meio de 3 em 3 dias.

E2.8.2 - Seleção de clones produtores de GASGAs

Os clones de GASGAs são seleccionados pelos ensaios de caseína ou fibrina referidos atrás (E.2.8). O ensaio de lise com caseína é efectuado cobrindo a cultura com uma camada de caseína-plasminogénio-agarose preparada para cada placa como se segue:

- 0,25 ml de leite em pó sem gordura (8% p/v, aquecido 30 min num banho-maria fervente);
- 0,50 ml de meio DME 2x;
- 50 microl de 7,5U/ml de plasminogénio, esterilizado num filtro de 0,22 micrometros;
- 0,2 ml de agarose se uma solução a 5% autoclavada.

Estes componentes são adicionados a uma solução de agarose mantida num banho a 48°C e aplicados sobre a cultura de células após o meio ter sido removido. As células são incubadas a 37°C numa câmara de 5% de CO₂ humidificada e controladas relativamente ao aparecimento de áreas claras na camada opaca às 2, 4 e 8 horas. Os clones que apresentam a actividade mais elevada de PA são repicados aspirando-os com uma pipeta de Pasteur previamente cheia com aproximadamente 0,5% de DME, ressuspensas fortemente e semeadas de novo em placas de 24 poços. Em seguida as células são cultivadas até à confluência, tripsinizadas e 1/5 semeado no mesmo tipo de placas de cultura. Após 48 h os sobrenadantes são testados como descrito abaixo mais detalhadamente.

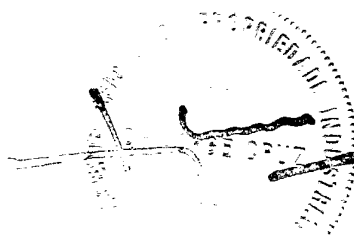


O ensaio das placas de fibrina é efectuado com um processo semelhante, mas substituindo os reagentes descritos atrás por uma preparação de 2,5 ml/placa de 100 mm de fibrina-agarose (ver Astrup T., a referência citada) em DME 1x (ver atrás).

E2.8.3 - Quantificação de GASGAs

a) Para quantificar o teor de PA, os sobrenadantes dos clones que expressam GASGAs assim como de células A431 (testemunha positiva) são comparados com diluições de uma concentração convencional de uPA em placas de caseína-plasminogénio-agarose preparadas como descrito no parágrafo anterior excepto a concentração final de agarose ser de 1,8% e usar-se 5 ml para cada placa de 100 mm. Fazem-se buracos em intervalos regulares aspirando com uma pipeta de Pasteur. Os sobrenadantes colhidos são diluídos seriadamente a 1:2 com tampão e aplicado 10 microl de cada uma das diluições nas placas. A solução padrão de uPA é primeiro preparada duas vezes concentrado em água e depois diluída 1:1 com DME 2x para uma concentração final de cerca de 400 UI/ml. A partir desta solução fazem-se diluições seriadas a 1:2 em DME e aplica-se 10 microl de cada uma delas nas placas. Os clones produtores de GASGA são classificados em três classes diferentes e as concentrações de GASGA deduzidas por comparação com diluições seriadas de uma preparação de uPA padrão.

b) Como alternativa contam-se as colónias resistentes a G418 que são transferidas para placas de microtitulação de 24 poços e deixadas em cultura até à saturação antes de se testar os sobrenadantes. Os clones que apresentam níveis úteis de produção de GASGAs (superior a 0,5 microg/ml) são guardados em "stocks" congelados em azoto líquido após suplementar soro fetal de vitela inactivado pelo calor com 10% de DMSO. Estas células são também reclonadas para seleccionar bons produtores que também são guardados congelados como descrito atrás.



Os clones que dão produções mais elevadas de GASGAs são reclonadas e cultivadas em massa. Os resultados das experiências usando células CHO (Ovário de Hamster Chinês) ou células LB6 de murganho estão descritos abaixo na Tabela 1:

Tabela 1

Linha Celular	Nº de clones resistentes a G-418	Nº de clones produtores de pro-uPA	Nº de clones seleccionados	Produção de GASGAs (gramas)ml
CHO	67	3	1	2-10
LB6	80	59	5	0,5-1 1-3 1-5 2-10 5-10

E2.8.4 - Cultura em massa

Um reactor de células de 4 l com controle automático da tensão de oxigénio dissolvido, pH e temperatura é usado para crescer um inóculo do clone de produção mais elevada obtido de acordo com o processo descrito nos exemplos acima. O meio para a cultura é DMEM com 5% de FCS inactivado pelo calor, 1 mM glutamina, 25U/ml de penicilina, 25 microg/ml de estreptomicina e 400 microg/ml de G418 ou uma formulação sem soro contendo DMEM como a base suplementado com albumina, insulina, transferina, etanolamina, colina, vitaminas e metais tipo micronutrientes. O inóculo de células é cultivado em frascos de 150 cm² em DMEM mais 10% de FCS inactivado pelo calor, 2 mM glutamina, 50U/ml de penicilina, 50 microg/ml de estreptomicina, 400 microg/ml de G418 e as células são cultivadas em microveículos Cytodex (Pharmacia). As células atin-



giram um máximo de densidade populacional de $2,5 \times 10^6$ /ml e os GASGAs são sintetizados ao longo da duração da cultura e testados por métodos conhecidos tais como método fibrinolítico ou IAA (ver 1.6.2). Atingiu-se uma concentração máxima de 20 microg/ml conforme testado por IAA.

E2.8.5 - Quantificação de GASGAs activados

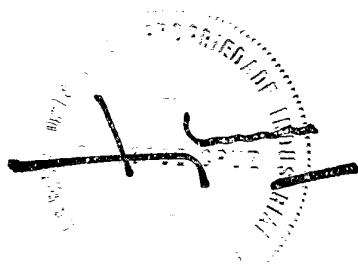
Para quantificar a quantidade relativa de PAs activados de duas cadeias em cultura de clones produtores de GASGAs ou de células A431, produtoras de u-PA (testemunha positiva), os sobrenadantes das referidas culturas são testados num ensaio IAA (1.6.1) usando anticorpos monoclonais de ratinho que reconhecem o domínio catalítico do uPA ou o domínio de ansas múltiplas sem interferência com a actividade enzimática e sem ligação a GFD.

Os resultados indicam que de um modo geral a quantidade de PA activado de duas cadeias, varia entre 20% e 50% do PA total e que é inferior a 5% quando se adicionam inibidores de proteases às culturas em crescimento.

E2.9 - Ensaio de ligação a receptores

Os sobrenadantes dos clones produtores de GASGAs ou das células A431 são testados quanto à sua capacidade para competir com a ligação de ^{125}I -DFP-UK radioactivo para o receptor de uPA em células U937 (Stoppelli M.P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 1985, 82, 4939-4943).

As colónias que secretam uma substância activa tipo PA são colhidas como descrito em E2.8.2, cultivadas até à confluência e os sobrenadantes são testados como descrito atrás. Os clones de elevada produção (ver tabela 1) e as células A431 são semeadas separadamente a 10^5 células/ml. A concentração de PAs é medida por IAA em amostras de sobrenadantes usando anticorpos monoclonais como descrito em E2.8.5



acima. Prepararam-se diluições de 1:2 no mesmo meio usado para a cultura para fazer o ensaio de ligação ao receptor essencialmente como descrito por Cubellis et al. (J. Biolog. Chem. 261: 15819-15822, 1986). Resumidamente, 200 microl de cada diluição são usados para ressuspender $1-2 \times 10^6$ células U937 (ver acima) e adiciona-se a cada suspensão de células uma quantidade de ^{125}I -DFP-UK tendo uma actividade correspondente a cerca de 20000-80000 cpm (concentração de scu-PA final de aproximadamente 50 pM).

Na Fig. 13 estão apresentados os resultados de uma experiência representativa e demonstram que enquanto os sobrenadantes dos clones transfectados com RSVuPA-EO não são capazes de competir com o tcu-PA iodinado para a ligação ao receptor de uPA.

E2.10 - Purificação de produtos GASGA-EO

O sobrenadante das células produtoras de GASGA-EO crescendo na presença de aprotinina é colhido e o GASGA-EO purificado como descrito em 1.6.5 por imunocromatografia, cromatografia de permuta iónica e cromatografia líquida de fase reversa (1.6.3) (Pureza superior a 95% por electroforese em SDS-PAGE).

E2.11 - Caracterização bioquímica e imunológica de GASGAs

GASGA-EO purificado apresenta um peso molecular aparente de aproximadamente 50 KD em condições redutoras (1.6.4). Após activação pela plasmina (1.6.2), a proteína reduzida é uma proteína de duas cadeias formada por uma cadeia de 30 KD que migra como a cadeia B do tcuPA e uma cadeia de 20 KD que migra mais rapidamente do que a cadeia A do tcu-PA. Conforme esperado, quando analisado por imunotransferência a proteína GASGA-EO reage com mAB 5B4 (reconhecendo a região de ansas múltiplas), com soro total de murganho anti-uPA mas que não reage com mABs DC₁ ou Cd₆ que reconhece a re-

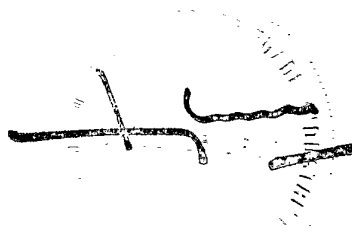
Exemplo E3

Produção de GASGAs por vectores RSV-uPA-BPV

No DNA do plasmídeo pRSVuPA as endonucleases de restrição NdeI e ApaI cortam cada uma apenas uma vez (Fig. 5), a primeira na região derivada do pBR322 perto do promotor RSV e a segunda na região do SV40 3' relativamente ao sítio de poliadenilação do uPA. Estes dois sítios podem ser modificados com adaptadores XhoI para se obter, após digestão com XhoI, um fragmento contendo a região codificadora de promotor RSV/uPA adequado à clonagem num vector tendo um sítio XhoI e/ou um sítio SalI.

E3.1.1 - 70 microg de DNA RSV-uPA são digeridos totalmente com 420U de NdeI em 300 microl durante 24h a 37°C (condições do ensaio: 150 mM NaCl, 10 mM Tris.HCl pH 7,8, 7 mM MgCl₂, 6 mM 2-mercaptoetanol, 100 microg/ml BSA). Após inactivação pelo calor, a concentração de NaCl é ajustada às condições de ApaI/6 mM NaCl, 6 mM Tris.HCl pH 7,4, 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-mercaptoetanol, 100 microg/ml BSA) e o DNA é totalmente clivado com 160U de ApaI em 400 microl (volume final) em 4 h a 30°C. O DNA é então purificado e precipitado como em 1.5.3, redissolvido em 20 microlitros de TE e os extremos protuberantes NdeI são preenchidos com 5U de DNA-polimeraseI de *E. coli* incubando o DNA (volume final de reacção 25 microl) durante 1 h a 37°C seguido de inactivação da enzima pelo calor (Maniatis et al. pág. 113).

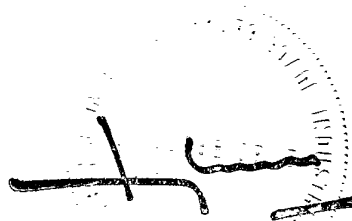
E3.1.2 - O plasmídeo RSV-uPA digerido com NdeI/ApaI e com extremos cerses conforme obtido atrás é misturado com o DNA adaptador XhoI fosforilado (proporção molar de aproximadamente 1:15) e incubado 18 h a 8°C (volume final 50 microl), conforme indicado em 1.5.5, seguido de inactivação da ligase pelo calor. Em seguida o DNA é digerido com 120U de XhoI em 200 microl durante 4 h a 37°C e XhoI é inactivada pelo calor.



E3.1.3 - Os fragmentos de DNA obtidos atrás são separados por electroforese num gel de 0,75% de agarose contendo brometo de etídio e migrados 20 h a 35V (ver 1.5.7 para mais detalhes), as bandas obtidas são detectadas num transiluminador de UV, a maior correspondendo a um fragmento de 8,35 kb da região codificadora do promotor de RSV/uPA e a mais pequena ao fragmento de 2,45 kb contendo a resistência à ampicilina e a origem de replicação. As duas bandas são retiradas e purificadas como em 1.5.7. A banda mais pequena é finalmente tratada com 3U de CIP durante 30 min a 37°C e 30 min a 56°C e purificada e precipitada como descrito em 1.5.2 e 1.5.3. Os fragmentos maior e menor são misturados em proporções molares diferentes variando entre cerca de 1:1 e cerca de 4:1, ligados 3 h a 14°C e uma fracção de cada uma das misturas de reacção é usada para transformar células competentes de E. coli DH1 como descrito em 1.5.8. As bactérias são cultivadas durante a noite em placas de agar contendo ampicilina, os plasmídeos de colónias isoladas são analisadas quanto ao padrão de fragmentos de restrição correcto e um deles seleccionado como plasmídeo p71, no qual o gene do uPA humano colocado sob o controle transducional do promotor RSV é removível do resto do plasmídeo pela clivagem com XhoI (Fig. 5 fundo).

E3.1.4 - Modificação dos sítios de restrição de BPV

pBPV 230.8 (Fig. 4) é modificado em três sítios diferentes (BamHI, HindIII ou SalI, respectivamente) através da inserção de um único sítio XhoI que torna mais fácil a inserção da região codificadora do promotor RSV/uPA (RSVuPA). Em todas as experiências usa-se um excesso da enzima de restrição adequada (BamHI ou HindIII ou SalI) para digerir totalmente 10 microg de DNA de BPV 230.8 durante 3 h a 37°C em 100 microl (volume final). A enzima é inactivada pelo calor e o DNA é purificado como descrito em 1.5.3, novamente dissolvido em 10 microl de tampão (Maniatis et al., pág. 113) e dotado de extremos cerses por tratamento com 5U do fragmento Klenow da DNA-polimerase I de E. coli durante 2 h a 37°C. Após



inactivação da polimerase pelo calor, o DNA é desfosforilado em 50 microl (volume final) com 5U de CIP durante 30 min a 37°C e durante mais 30 min a 56°C. Finalmente esta enzima é inactivada aquecendo na presença de EGTA e o DNA é purificado como descrito em 1.5.2 e 1.5.3. Ao DNA linear, redissolvido e com extremos cerses de BPV 230.8, adiciona-se DNA adaptador XhoI marcado (proporção molar 100:1) e liga-se em 50 microl (volume final) durante 15 h a 8°C na presença de 2,5U de DNA-ligase de T4 (1.5.4). Após inactivação da ligase pelo calor, uma amostra contendo cerca de 1% do DNA ligado é digerido com 8U de XhoI, submetida a electroforese com igual quantidade de DNA antes e após a ligação e analisado como em 1.5.6. Em seguida a concentração salina é ajustada a 100 mM NaC e o pH é ajustado a cerca de 7,5 (Maniatis et al., pág. 104 e Biochemicals for Molecular Biology; Boehringer Mannheim, Munique, 1985), todo o DNA é clivado com XhoI, 1 h a 37°C em 200 microl, aplicado num gel de 0,6% de agarose, sujeito a electroforese e a banda correspondente ao plasmídeo linearizado é retirada, electroeluida e purificada como em 1.5.7. O DNA linear é auto-emparelhado por ligação e usado para transformar células competentes E. coli DM5 (BRL) (ver 1.5.8). Os plasmídeos de colónias isoladas após incubação durante a noite em placas de agar contendo ampicilina são testadas por análise de minipreparações (1.5.9) quanto à presença do novo sítio XhoI. Obtiveram-se os seguintes plasmídeos derivados de pBPV 230.8 (Fig. 6, no meio):

- pBB, em que é criado um sítio XhoI na posição BamHI e é delimitado por dois sítios BamHI;
- pBS, em que é criado um sítio XhoI na posição SalI e é delimitado por dois sítios SalI;
- pBH, em que é criado um sítio XhoI na posição HindIII.

E3.1.5 - Em experiências diferentes, os DNAs de pBB, pBH e pBS, 50 microg de cada são digeridos totalmente com um excesso de XhoI (SalI no caso de pBS) em 50 microl, a 37°C durante 2 h, a enzima é inactivada pelo calor, as condições de reacção são modificadas com tampão concentrado (1.5.1) conforme necessário para duplicar o volume de reacção e o DNA de plasmídeo linearizado é desfosforilado com 1U de CIP como descrito em 1.5.4. Após inactivação da enzima pelo calor, o DNA é aplicado num gel de 0,6% de agarose contendo brometo de etídio e sujeito a electroforese durante 16 h a 30V. Uma banda de DNA principal correspondendo ao plasmídeo linear monomérico é electroeluida, purificada e redissolvida como descrito em 1.5.7. De modo idêntico, 50 microg de DNA do plasmídeo p71 é digerido totalmente com 80U de XhoI, a enzima é inactivada pelo calor e a mistura é aplicada num gel de 0,6% de agarose contendo brometo de etídio e sujeito a electroforese durante 16 h a 30V. A porção de gel com a banda de 8,35 kb, que contem a construção promotor RSV/região codificadora de uPA, é electroeluida, purificada e redissolvida como descrito em 1.5.7. O DNA vector de BPV (Fig. 6, no centro) e o DNA da inserção (Fig. 5, fundo) são misturados em proporções que variam entre 2:1 e 1:4 e ligados com 2U/amostra de DNA-ligase de T4 durante 24 h a 15°C numa concentração de DNA de aproximadamente 0,2 microg/microl. O meio de reacção é ajustado com o tampão e o DNA ligado é digerido 1 h a 37°C com 20U de XbaI em 15 microl (volume final). (Condições de ensaio: 50 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl pH 7,9, 6 mM MgCl₂, 100 microg/ml de BSA). Esta enzima não cliva a construção RSV/uPA e corta apenas uma vez os vectores derivados de BPV 230.8. Após inactivação de XbaI pelo calor, a mistura de DNA obtida é diluída a 1 para 5 com água, adiciona-se tampão de ligação 10X e incuba-se 2 h a 14°C com 2,5U de DNA-ligase de T4. Uma amostra de 5 microl de cada experiência de reacção é usada para transformar células competentes de E. coli DH5 (1.5.8). Estas bactérias são cultivadas durante a noite em placas de agar contendo ampicilina a 37°C e amostras das colónias resultantes são analisadas por análise de minipreparações (ver 1.5.9).

Os plasmídeos de colónias isoladas com o padrão de restrição correcto são seleccionados (1.5.9, Fig. 6, fundo).

E3.2 - Modificação da unidade de transcrição de uPA em vectores de expressão derivados de BPV

No fragmento SmaI de 7,3 Kb contendo a ORF do uPA as enzimas de restrição BssHI e SacI cortam apenas uma vez, cada uma, dando origem respectivamente a um extremo protuberante 5' em nt413 e a um extremo protuberante 3' em nt4344. Este fragmento compreende a região codificadora de GFD do uPA, enquanto os fragmentos correspondentes no plasmídeo GASGAS derivados de RSVuPA(ver Fig. 3) contêm as regiões GFD₀ e GFD₂.

O fragmento BssHI/SacI em todos os vectores BPV é assim substituído com o fragmento BssHI/SacI de RSVuPA-EO ou de RSVuPA-E2 para se obter:

- os vectores das séries EO, tendo uma ORF sem exão IV;
- os vectores da série E2, tendo uma ORF com um duplicado do exão IV;

Resumidamente, as duas séries são preparadas como se segue:

a) O DNA de RSVuPA-EO ou de RSVuPA-E2 é completamente digerido com BssHI, tratado com CIP, totalmente digerido com SacI e o fragmento de DNA mais pequeno é purificado em gel;

b) o DNA dos vectores de expressão de uPA derivados de BPV é análogamente totalmente digerido com SacI, tratado com CIP, totalmente digerido com BssHI e o fragmento maior purificado em gel;

c) os fragmentos BssHI/SacI com o exão IV eliminado ou com o exão IV em duplicado são inseridos em cada

um dos DNAs vectores episomais obtidos atrás.

E3.2.1 - Preparação de cassetes BssHI/SacI "EO" ou "E2"

50 microg de DNA de plasmídeo de RSVuPA-EO ou RSVuPA-E2 (fig. 3) são digeridos totalmente com 64U de BssHi em 75 microl (volume final) durante 2 horas a 37°C. A enzima é então inactivada pelo calor e o DNA é desfosforilado com 2,5U de CIP em 150 microl (volume final). O DNA é então purificado com fenol/clorofórmio (1.5.2), precipitado (1.5.3) e ressuspensão em 100 µl de tampão para o digerir com 80U de SacI a 37°C durante 3 horas. Obtem-se, respectivamente, um fragmento contendo a cassette "EO" ou um fragmento contendo a cassette "E2" que se purifica em gel de agarose (1.5.8).

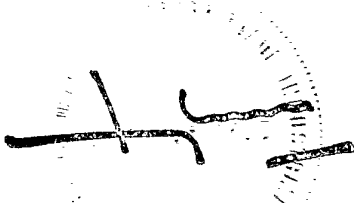
E3.2.2 - Preparação de grelhas BssHI/SacI de vectores derivados de BPV

20 microg de DNA de cada um dos vectores de expressão de uPA derivados de pBPV 230.8 (ver fig. 6, fundo) são totalmente digeridos com 40U de SacI durante 3 horas a 37°C em 50 microl (volume final), a enzima é então inactivada pelo calor e o DNA é desfosforilado em 100 microl (volume final) com 2U de CIP (1.5.4). Após extracção e precipitação (1.5.2, 1.5.3), o DNA é redissolvido em 100 microl de tampão e digerido com 40U de BssHI a 37°C durante 2 horas. O fragmento maior que não possui a região BssHI/SacI contendo EGF é isolado em gel de agarose (1.5.8).

E3.2.3 - Inserção de cassetes "EO" ou "E2" na grelha BPV/RSV/
/uPA

Este processo é usado para gerar a série GFD₀ ("zero") ou a GFD₂ ("dois") em vectores de expressão de uPA derivados de BPV:

a) 1 microg do fragmento de DNA BssHI desfosforilado/SacI, contendo a cassette GFD₀ ou GFD₂ preparadas como descrito atrás



(E3.2.1) é ligado a 4microg de DNA vector SacI desfosforilado/BssHI contendo a grelha BPV/RSVuPA (E3.2.2) durante 16 horas a 15°C com 2U de DNA-ligase em 20 microl (volume final);
b) 5 microl desta mistura são usados para transformar células competentes E. coli DH5;
c) as colónias resistentes à ampicilina são testadas por métodos de minipreparações (1.5.9) e os plasmídeos que apresentam o padrão de restrição esperado são isolados.

Repetindo este processo partindo de cada uma das séries de plasmídeos produtores de scu-PA e derivados de pBPV 230.8 (fig. 7A), obtem-se duas séries de vectores de expressão de GASGA derivados de BPV:

- série "zero" em que pelo menos uma porção do domínio tipo EGF foi eliminado (sufixo EO); fig. 7B).
- série "dois" em que a maior parte do domínio tipo EGF foi duplicado (sufixo E2; fig. 7C).

E3.3 - Expressão e análise de produtos GASGA

Os vectores de expressão de GASGA derivados de BPV obtidos atrás são cotransfectados com RSV-Neo em células LB6 de murganho ou células CHO (ver E.1.4) e os clones resistentes a G418 são seleccionados e analisados como descrito em E2.8.

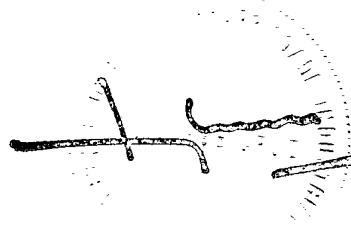
As propriedades enzimáticas de PA, as características imunológicas e as propriedades de ligação ao receptor de uPA das proteínas obtidas refletem as obtidas com RSVuPA-EO e RSVuPA-E2 (ver atrás).

Exemplo E4

Construção de derivados modificados da região do promotor de
uPA humano

E4.1 - Construção do plasmídeo puPA2

50 microg de DNA de lambda-uPA1 preparado como descrito em E0.3 são digeridos em 100 microl (volume final) com 30U de SmaI no tampão adequado durante 60 min a 30°C. 500 ng do DNA obtido são analisados em gel de 1% de agarose contendo brometo de etídio enquanto o restante é guardado a -20°C. A enzima é então inactivada pelo calor a 68°C (10 min) e a preparação de DNA resultante é aplicada num gel preparativo de 0,8% de agarose contendo brometo de etídio. A separação electroforética decorre durante 20 h a 50V em tampão TBE (Maniatis et al., cap. 5) e as bandas de DNA são visualizadas num transiluminador de UV de comprimento médio. Retirou-se uma banda de aproximadamente 2,38 kb que contem o promotor de pro-uPA e electroelui-se e purificou-se o DNA como descrito em 1.5.7. 50 microg de DNA de pEMBL8CAT (Fig. 8) é digerido de modo idêntico durante 1 hora a 30°C com 30U de SmaI em 25 microl (volume final). Adiciona-se 64 microl de água, 10 microl de tampão CIP 10X e 1U de CIP em 1 microl (volume final) e a mistura de reacção é ainda incubada durante 60 min a 37°C. CIP é inactivada adicionando EGTA e aquecendo como descrito em 1.5.4 e o DNA é purificado num gel de 0,8% de agarose contendo brometo de etídio nas condições descritas em 1.5.7. 1,5 microg do fragmento de 2,38 kb derivado de lambda-uPA1 e 500 mg de DNA de pEMBL8CAT linearizado e desfosforilado como preparado atrás são misturados e ligados em 20 microl do tampão adequado contendo 10% de PEG e 2U de DNA-ligase de T4 durante 20 horas a 14°C. 5 µl desta mistura de reacção são então usadas para transformar células competentes de E. coli HB101 como descrito em 1.5.8. As colónias resistentes à ampicilina são analisadas e entre as que contêm a inserção na orientação correcta é seleccionada uma que se de-



signa puPA2 (Fig. 8 à direita).

E4.2 - Construção do plasmídeo puPA2/41

As condições óptimas para se obter um DNA de puPA2 parcialmente digerido com SmaI e na forma linearizada são investigadas digerindo 250 ng deste plasmídeo respectivamente com 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0U de SmaI em 10 microl (volume final) do tampão adequado. 50% (v/v) de cada mistura de reacção é transferido para um tubo diferente e congelado num banho de neve carbónica/etanol após 6 min de reacção a 30°C, enquanto as porções restantes são congeladas após incubação durante mais 9 min. Em seguida, cada amostra congelada é ajustada a 10 mM com EDTA, a enzima é inactivada pelo calor e o DNA analisado num minigel de 1% de agarose contendo brometo de etidio. Conseguiram-se bons resultados incubando com 2U durante 15 min e com 3U durante 6 min. Em seguida fez-se uma digestão preparativa como se segue: 5 microg de DNA de puPA2 é digerido com 40U de SmaI em 50 microl do tampão adequado, a reacção é parada adicionando 1 microl de 500 mM EDTA e congelando. Após inactivação pelo calor da enzima adicionada esta preparação de DNA de puPA2 é misturada com 2,25 microg de adaptador XhoI, fosforilado como descrito em 1.5.6 e ligado em 86 microl de uma mistura de reacção contendo 10% PEG 1500 e 2,5U de DNA-ligase de T4, incubando primeiro 6 h a 7°C depois aumentando lentamente a temperatura até 17°C e incubando durante mais 10 horas. A enzima de ligação é inactivada pelo calor, 10% do DNA ligado é digerido com 55U de XhoI durante 2 h a 37°C em 20 microl (volume final), esta enzima é então inactivada pelo calor e o DNA precipitado como indicado em 1.5.3. O DNA precipitado é redissolvido em 4 microl de TE (Maniatis et al), adiciona-se 1 microl de tampão de ligação 5X contendo 1U de DNA-ligase de T4 (Maniatis et al), a mistura é deixada autoligar-se a 15°C durante 2 h 30 m e depois usada para transformar células competentes E. coli HB101 (1.5.8). As colónias resistentes à ampicilina são testadas por análise de minipreparação. Uma destas, ten-



do o sítio SmaI, que delimita o extremo 5' da inserção de 2,38 kb contendo o promotor do uPA, convertido num sítio XhoI (Fig. 10) é designado puPA2/41.

E4.3 - Análise de CAT

puPA2, o seu derivado puPA2/42 e RSV-CAT são testados quanto à sua capacidade para conduzirem a transcrição do gene CAT. Os DNAs de plasmídeo são transfectados para uma linha celular humana A125 (1.1) derivado de um carcinoma do rim (Stoppelli M.P., Verde P., Grimaldi G., Locatelli E.K., Blasi F., J. Cell. Biol. 1986, 102, 1231-1241) pelo processo de precipitação com fosfato de cálcio e os níveis da proteína CAT possivelmente produzida nas células transfectadas são medidos após 64 ± 4 horas.

E4.3.1 - Purificação de DNA de plasmídeo

Os DNAs de plasmídeo são purificados usando o método de lise alcalina como descrito por Birnboim H.C. e Doly J. 1979, Nucleic Acids Res. 7, 1513 (descrito também em Maniatis et al pág. 90) a partir de 400 ml de um caldo LB da cultura durante a noite de cada clone, bacteriano. O DNA de plasmídeo assim obtido é purificado duas vezes em gradientes de CsCl e brometo de etídio, a banda contendo-o é colhida furando o tubo e extensivamente extraída com álcool isoamílico contendo brometo de etídio (ver Maniatis et al. p. 93-94). A solução aquosa de CsCl contendo DNA é então diluída a 1:4 com água e o DNA é precipitado adicionando 0,1 vol de Na-acetato pH 5,2 e 3 vol de etanol. Após permanência da mistura a -20°C durante 30 min, a fracção de DNA é centrifugada a 10000xg durante 15 min a 4°C, lavada uma vez com etanol a 70% e uma vez com etanol a 100%, seca, dissolvida em 2 ml de TE, reprecipitada e lavada do mesmo modo e finalmente redissolvida em 1 ml de TE (Maniatis et al). Lê-se D.O.₂₆₀ e a concentração é ajustada até cerca de 500 ng/microl, testada em minigel e medida novamente por espectrofotometria. Fi-

nalmente os DNAs de plasmídeo são diluídos a 1:1 com etanol absoluto e guardados a -20°C .

E.4.3.2 - Precipitação pelo processo do fosfato de cálcio

Para cada placa de Petri de 60 mm a ser transfectada, 40 microl de solução de DNA em etanol/TE, equivalente a 10 microg de DNA, são secos numa centrífuga de vácuo Savant e redissolvidos em 220 microl de água. Adiciona-se 30 microl de 2M CaCl_2 (da Mallinkrodt ou Merck) e mistura-se rapidamente. 250 microl de HBS2x (10 g/l de HEPES, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanossulfônico, 16 g/l de NaCl, pH $7,1 \pm 0,05$, estéril) e 5 microl de PO_4 100x (70 mM Na_2HPO_4 e 70 mM NaH_2PO_4 , estéril) são misturados e a solução de DNA/ CaCl_2 é lentamente adicionada gota a gota borbulhando a solução com uma pipeta de Pasteur. Esta mistura é então deixada à temperatura ambiente durante 30 min (Graham e Van der Eb, Virology, 52, 456; 1984).

E.4.3.3 - Transfecção de células A1251

As células A1251 são cultivadas até perto da confluência em meio completo / meio DME (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal de vitela (Hyclone) e 1% da solução de antibióticos (Gibco) numa câmara humidificada contendo 5% de CO_2 a 37°C . 24 horas antes da transfecção as células são repartidas por placas de Petri de 60 mm a 10^5 células/placa e alimentadas com meio fresco 4 a 6 horas antes da transfecção. Em t_0 o DNA precipitado é adicionado e a mistura é deixada durante 16 a 18 horas na câmara. Após incubação durante a noite, as células são lavadas uma vez com DME (7.2) depois suplementadas com meio completo, deixadas para completar a incubação e colhidas. Nas experiências com triplicados todos os passos após dissolução do DNA seco são efectuados separadamente para cada amostra. As células colhidas são usadas nos passos subsequentes.



E4.3.4 - Preparação de lisados celulares

64 \pm 4 horas a adição do DNA precipitado, as células (preparadas como em E3.3.3) são lavadas 3 vezes com tampão de fosfatos salino (PBS) sem Ca^{++} (80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 g KH_2PO_4 por 1 litro de água destilada, levado a pH 7,2, em seguida adiciona-se 1 ml de STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA) e a mistura é deixada à temperatura ambiente durante 5 min. Após isto as células são raspadas com um "policeman" de borracha e colocadas num tubo Eppendorf, centrifugadas numa microcentrifuga 3 min a 4°C e ressuspensas em 100 microl de TRIS 250 mM pH 7,8. A suspensão de células é deixada 15 min em neve carbônica/etanol e depois transferida para um banho a 37°C; este ciclo de congelação/descongelação é repetido duas vezes, os núcleos celulares são sedimentados em microcentrifuga a 4°C durante 5 min e o sobrenadante é transferido para um tubo arrefecido. Para ultrapassar pequenas diferenças no teor proteico de cada amostra devido a uma possível ligeira diferença no número de células de placa para placa, a concentração de proteína é determinada em 10 microl de cada amostra de acordo com o método de Lowry (ver E1.6). A restante parte dos lisados é guardada a -20° até ser usada no ensaio de CAT.

E4.3.5 - Ensaio de CAT

Um volume de cada lisado contendo 100 microg de proteína é levado até 133,5 microl com água e adiciona-se-lhe 44 microl de uma solução pré-misturada contendo 22,5 microl de 2M Tris pH 7,8, 20 microl de uma solução preparada de fresco de 3 mg/ml de acetilCoA (Sigma) e 1,5 microl de ^{14}C -cloranfenicol (50-60 mCi/mmol, da Amersham). A mistura é incubada a 37°C durante 1 h, depois a reacção é parada pela adição de 1 ml de acetato de etilo e vortex. As duas fases que se formam são separadas numa microcentrifuga Eppendorf (5 min) e a fase orgânica é transferida para um tubo Eppendorf arrefecido, seca numa centrifuga de vácuo Savant, . .



redissolvida em 20 microl de acetato de etilo e testada por TLC em placas de sílica de 0,25-1 mm (Kodak). A cromatografia decorre durante 2-3 h com clorofórmio:metanol (grau de pureza para HPLC), 95:5 como fase móvel e as manchas radioactivas correspondendo ao antibiótico marcado são visualizadas por autorradiografia. As áreas do cromatograma correspondendo às manchas radioactivas são removidas, colocadas num frasco com 5 ml de uma solução de cintilação adequada como seja Econofluor, (New England Nuclear) e a radioactividade é medida num contador beta. Os resultados estão apresentados na Tabela 2 (ver E4.4.3).

E4.4.1 - Construção do plasmídeo puPA2/17

300 ng de DNA de puPA2/41 (ver E3.2) é completamente digerido com 4,2U de OxaNI durante 4 h a 37°C no tampão adequado (100 mM NaCl, 10 mM Tris.HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM 2-mercaptoetanol, 100 microg/ml de BSA). O corte do DNA é testado num minigel contendo brometo de etídio (1.5.1) e a enzima é inactivada aquecendo 10 min a 68°C. Adiciona-se então 2 microl de água, 1,5 microl de tampão 10X e 1,5 microl de DNA-ligase de T4 e a mistura é incubada a 15°C durante 18h. 2,5 microl desta mistura são usados para transformar células competentes E. coli HB101 (1.5.8). As colónias resistentes à ampicilina são analisadas por análise de minipreparações (1.5.9). As que têm o padrão de restrição correcto são seleccionadas e uma delas foi designada puPA2/17. (Fig. 10).

E4.4.2 - Construção do plasmídeo puPA2/254

4 microg de DNA do puPA2/41 (ver Fig. 10) é totalmente digerido com 5U de EcoRV em 10 microl do tampão adequado (Maniatis et al) a 37°C durante 2 h, depois adiciona-se uma mistura de 7 microl de água, 2-microl de tampão 10X e 1U de CIP em 1 microl de tampão (Maniatis et al). A mistura é incubada 1h a 37°C, adiciona-se EGTA para uma concentração final de 10 mM e a mistura é incubada a 68°C durante 45



min. O DNA é precipitado, lavado e seco como descrito em 1.5.3 e finalmente redissolvido em 7,5 microl de TE (Maniatis et al). O DNA é totalmente digerido com 4,2U de OxaNI durante 4 h a 37°C em 10 microl (volume final) e os extremos 5' são preenchidos com 1U do fragmento Klenow da DNA PolII/20 microl, volume final) a 37°C durante 1 h. O DNA é então precipitado (1.5.3) e ressuspenso em 7,5 microl TE (Maniatis et al). Adiciona-se 0,5 microl de 100 mM ATP, 1 microl de tampão 10X (Maniatis et al) e 2,5U de DNA-ligase de T4 (1 microl) e a mistura é incubada durante 18 h a 15°C. Em seguida 2,5 microl desta mistura é usada para transformar células competentes E. coli HB101 (1.5.8), as bactérias são semeadas em placas LB contendo ampicilina (Maniatis et al). As colônias tendo o padrão de restrição correcto são seleccionadas e uma delas foi designada puPA2/254 (Fig. 10).

E4.4.3 - Análise de CAT

puPA2/41, os seus derivados de deleção puPA2/17 e puPA2/254 assim como RSV-CAT são testados quanto à sua capacidade para conduzirem a transcrição do gene CAT. Os DNAs de plasmídeo são transfectedados em linhas celulares A1251 e HeLa (1.1) através da técnica de precipitação com fosfato de cálcio e o nível de CAT intracelular é medido após 64± 4 horas. A purificação do DNA de plasmídeo, precipitação por fosfato de cálcio, transformação de células, preparação de lisados celulares e ensaio de CAT são efectuados substancialmente como descrito em E3.3. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2

	Al251	HeLa
RSV-CAT	100	100
puPA2/41	128	32,3
puPA2/17	303,8	74,3
puPA2/254	378,5	174,3

E.4.5 - Construção de vectores de expressão derivados de uPA

O gene CAT bacteriano pode ser removido dos plasmídeos puPA2/41, puPA2/17 e puPA2/254 de modo a usá-los como vectores de expressão. De preferência, as modificações conservarão a sequência derivada do promotor de uPA, a caixa TATA do uPA, o ponto de iniciação do mRNA e o poli-adaptador derivado do pEMBL8. Os fragmentos de DNA compreendendo estas regiões podem ser removidos do vector e inseridos a montante de diferentes genes como "cassetes de expressão". A partir dos plasmídeos descritos atrás foram obtidos três vectores de expressão derivados do uPA removendo o gene CAT bacteriano: pPP41 a partir de puPA/41, pPP17 a partir de puPA2/17; pPP254 a partir de puPA2/254.

E4.5.1 - Construção de pPP41

25 microg de DNA de puPA2/41 são parcialmente digeridos com 4U de XbaI a 37°C durante 45 min e a reacção parada adicionando EDTA (para 50 mM) e inactivação pelo calor. Após precipitação (1.5.3) o DNA é preenchido com 2,5U do fragmento Klenow da DNA-PolI (volume final 20 microl) a 37°C durante 1 h, ligado a um excesso molar de 50 vezes de adaptador SalI (1.5.5 e 1.5.6) durante 16 h a 8°C com 2U de ligase e após inactivação da enzima pelo calor, completamente digerido a 37°C durante 2 h com um excesso de SalI. Os fragmentos de DNA migraram num gel de 0,75% de agarose (1.5.7) e a porção de gel contendo um fragmento de DNA da gama 5-6 kb



foi retirada. Este DNA é então extraído e purificado como descrito em 1.5.7, ressuspensão em 10 microl de TE e 2 microl desta solução são auto-ligadas a 16°C durante 4 h com 2U de ligase (volume final 10 microl). 2,5 microl desta preparação de DNA são então usados para transformar células competentes E. coli DH5. (1.5.8-1.5.9). Entre as colónias resistentes à ampicilina seleccionou-se por análise de minipreparações o plasmídeo pPP41, i.e. um plasmídeo tendo a região compreendida entre o sítio SalI no poliadaptador e o sítio XbaI a jusante do gene CAT eliminado (Fig. 11B).

E4.5.2 - Construção de pPP/17 e pPP/254

Seguindo substancialmente o processo descrito atrás, obtem-se dois vectores de expressão por digestão completa de 10 microg de DNA de puPA2/17 ou 10 microg de DNA puPA2/254, respectivamente, com 24U de XbaI a 37°C durante 2 h. Os extremos protuberantes 5' do plasmídeo linearizado são preenchidos com o fragmento Klenow da DNA-PolI (2,5U) a 37°C durante 1 h e depois ligados a um excesso molar de 50 vezes do adaptador SalI (1.5.5 e 1.5.6) durante 16h a 8°C com 2U de ligase e, após inactivação da enzima pelo calor, o DNA é completamente digerido a 37°C durante 2 h com um excesso de SalI. Em seguida esta enzima é inactivada pelo calor e o DNA precipitado (1.5.3) e ressuspensão em 10 microl de TE. 2 microl desta solução de DNA são ligados a 15°C durante 16 h com 2U de DNA ligase (volume final 10 microl) e usou-se 2,5 microl para transformarcélulas competentes E. coli DH5. Entre as colónias resistentes à ampicilina, seleccionam-se os plasmídeos pPP17 e pPP254 que possuem promotores de delecção derivados do uPA e têm as mesmas características descritas para pPP41 em E.4.5.1 (Fig. 11B).

Exemplo E5

E5 - Produção de GASGAs por minigenes derivados de uPA com GFD modificado

E5.1 - Purificação do fragmento SmaI contendo uPA

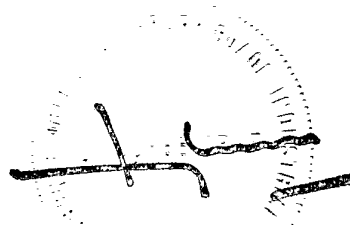
Um fragmento SmaI de 7,3 kb contendo a região codificadora do uPA foi obtido a partir do fago lambda como descrito em E.1.1 (Fig. 1).

E5.2 - Preparação de DNAs vectores

Os DNAs de plasmídeo pPP41XS, pPP17XS e pPP254XS, 20 microg de cada, são preparadas separadamente digerindo-os com 50V de SmaI a 25°C durante 3 h (50 microl, volume final), depois os plasmídeos linearizados são desfosforilados com 1U de CIP a 37°C durante 1 h (150 microl, volume final) e purificados num gel de 0,8% de agarose como descrito em 1.5.3. As preparações de DNA separadas são ressuspensas em 20 microl de TE e guardadas a 4°C.

E5.3 - Construções de minigenes derivados de uPA

Cada DNA de plasmídeo linearizado e desfosforilado obtido atrás (E5.1) (3 microg) é misturado com 1 microg de u-PA-ORF (i.e. fragmento SmaI de aproximadamente 7,3 kb contendo a região codificadora do uPA obtida como descrito em E1.1) em 10% de PEG 1500 com 2U de ligase (volume final 10 microl) durante 16 h a 15°C. Usou-se 2,5 microl de cada mistura de reacção para transformar células competentes E. coli DH5 (c.f. 1.5.8). Entre as colónias resistentes à ampicilina, os plasmídeos pPP41XS, pPP17XS e pPP254XS, que derivam de pPP41, pPP17 e pPP254, respectivamente, são seleccionados por análise de minipreparações (c.f. 1.5.9) por terem as seguintes características (ver fig. 11C):



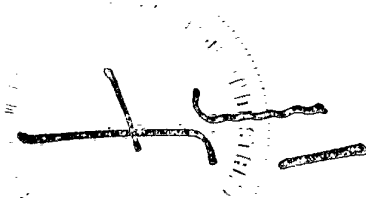
- a região codificadora do uPA é inserida no sítio SmaI do vector contendo o promotor uPA
- o ponto de iniciação do mRNA de uPA é o mesmo do gene humano do uPA
- contem uma sequência derivada de pEMBL8
- os minigenes derivados de uPA podem ser removidos daqueles vectores e inseridos em diferentes vectores por digestão com XhoI e SalI
- os minigenes removidos podem ser inseridos em vectores tendo um sítio SalI ou XhoI.
- o minigenes removidos podem ser inseridos em vectores capazes de os manter numa forma de epissoma quando inseridos num hospedeiro adequado
- pPP41XS tem a região codificadora do uPA sob o controle de um fragmento de 2,35 kb derivado do promotor de uPA
- pPP17XS tem a região codificadora do uPA sob o controle do mesmo fragmento de promotor contido em pPP41XS mas em que foi criada uma deleção entre os dois sítios OxaNI
- pPP254XS tem a região codificadora do uPA sob o controle do mesmo fragmento de promotor contido em pPP41XS mas em que uma deleção foi criada entre o sítio 5' OxaNI e o sítio EcoRV.

E5.4 - Construção de minigenes-expressando GASGAs

Uma substituição de um fragmento de DNA BssHI/SacI, incluindo a ORF do uPA desde o exão II ao intrão J (c.f. Fig. 3A) nos vectores de expressão derivados de pPP é feita essencialmente como descrito para a obtenção dos plasmídeos expressando GASGAs derivados de BPV no Exemplo 3.

E.5.4.1 - Purificação do DNA vector

20 microg de DNA dos plasmídeos pPP41XS, pPP17XS ou pPP254XS é digerido com SacI, tratado com CIP e cortado com BssHI como descrito em E3.4.3. As grelhas de vector contendo a região de pEMBL8, o promotor de uPA ou seus de-



rivados e os extremos 5' e 3' da ORF de uPA (c.f. Fig. 12A) são purificados num gel de agarose (1.5.8) e o fragmento de DNA ressuspense em 10 microl de TE.

E.5.4.2 - Purificação de DNA da inserção

50 microg de DNA do plasmídeo RSVuPA-EO ou do plasmídeo RSVuPA-E2 são digeridos com BssHI, desfosforilados com CIP e cortados com SacI como descrito em E3.4.1. Os dois fragmentos, contendo a região codificadora de "EO" ou de "E2", são purificados em gel de agarose (ver 1.5.8) e ressuspensos em 20 microl de TE.

E5.4.3 - Construção de minigenes expressando GASGAs

Para cada plasmídeo derivado usa-se o mesmo processo:

- a) mistura de um DNA vector (preparado como descrito em E5.4.1) e um DNA de inserção (preparado como descrito em (E5.4.2) numa proporção molar de 1:2 (0,3 microg de DNA em 10 microl, volume final) e ligado a 15°C durante 16 horas com 2U de DNA-ligase de T4;
- b) transformação de células competentes E. coli DH5 (1.5.8) com 2,5 microl de cada uma das misturas obtidas atrás;
- c) as colónias resistentes à ampicilina foram analisadas (1.5.9) quanto a possuírem a inserção BssHI/SacI, obtendo duas séries de três plasmídeos (Fig. 12B e 12C).

E5.5 - Expressão e análise de produtos GASGA

Vectores de expressão de GASGA derivados de minigenes de uPA obtidos como descrito atrás são cotransfectados com RSV-Neo em células LB6 de murganho e células CHO e os clones resistentes a G418 são seleccionados e analisados como descrito em E2.8.

As propriedades enzimáticas, caracterís-

ticas e propriedades de ligação ao receptor de uPA obtidas para o PA são paralelas às obtidas com RSVuPA-E0 e RSVuPA-E2.

Exemplo E6

Produção de GASGAs interrompidos

E6.1 - Modificação de sítios de restrição: digestão parcial

O plasmídeo RSVuPA contém dois sítios ScaI, o primeiro no gene de resistência à ampicilina derivado do pBR322 e o segundo GFD, que está incluído no exão IV do gene de uPA (ver fig. 2).

Para encontrar as condições ótimas de linearização do RSVuPA, 100 ng do plasmídeo são digeridos com ScaI em 10 microl de tampão a 37°C durante 1 hora (ver 1.5.1). A quantidade de enzima adicionada vai de 10U a 0,3U. Os resultados ótimos são obtidos com 5 e 2,5U/100 ng. As reacções são aumentadas proporcionalmente para 1 micrograma de ambas para ambas as concentrações, em seguida, após digestão, adiciona-se EDTA para uma concentração final de 10 mM, as misturas de reacção são reunidas e o DNA extraído e precipitado (ver 1.5.2 e 1.5.3). Este DNA de plasmídeo é ligado a um adaptador KpnI/Asp718 de 8 meros e fosforilado (ver 1.5.6) (Boehringer; sequência CGGTACCG) com uma proporção molar de plasmídeo/adaptador de 1:100 em 20 microl de tampão (volume final) durante 48 horas com 5U de DNA ligase de T4 (ver 1.5.5). A enzima é então inactivada pelo calor e o DNA é digerido em 400 microl de tampão com 360U de Asp718 (ver 1.5.1), precipitado (ver 1.5.3) e aplicado num gel de electroforese preparativa migrado durante 16 horas a 40V (ver 1.5.7). A banda de DNA correspondendo ao tamanho do plasmídeo linearizado (10,8 kb) é electroeluído e purificada com em 1.5.7, quantificado em minigel e 50 ng dele é auto-ligado com 2,5U de ligase em 24 mi-

crol de tampão, precipitado e usado para transformar 100 microl de células competentes DH5 (ver 1.5.8). Entre os clones resistentes à ampicilina um, tendo o padrão de restrição, foi selecionado e designado RSV-6-Asp (ver fig. 15). Para se obter GASGAs interrompidos, RSV-G-Asp pode ser modificado como descrito abaixo para dar o plasmídeo RSV-uPA-Tet-Asp (E6.2) preenchendo totalmente o sítio Asp718 (como descrito em E6.3.1) ou pelo seu preenchimento parcial seguido da obtenção de extremos cerses (como descrito em E6.3.2) obtendo-se assim dois vectores expressando produtos GASGAs que são equivalentes aos obtidos expressando RSV-SVRTD (E6.3.1) ou RSV-SAD (E6.3.2).

E6.2 - Modificação de sítios de restrição: digestão total

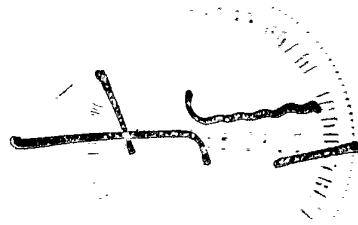
Para se obter um plasmídeo portador de um único sítio ScaI a resistência à ampicilina e a resistência à tetraciclina (ver Fig. 16) é substituído por:

- deleção da maior parte do gene de resistência à ampicilina no pBR322, obtendo o plasmídeo pBR13Tet^S, Tet^R;
- substituição do fragmento HpaI-NdeI em RSVuPA com o fragmento NdeI-PvuII do pBR322 com deleção.

No plasmídeo obtido o sítio ScaI está presente apenas na região codificadora do uPA no exão IV e está mutagenizado por inserção de uma série de adaptadores.

E6.2.1 - Construção de um plasmídeo pBR322 com deleção (pBR13Tet)

100 ng de DNA de pBR32 é digerido com 10U de PstI (1.5.1) 1 hora a 37°C em 50 microl de tampão (volume final), a enzima é então inactivada pelo calor e as condições de reacção ajustadas a uma digestão com 50U de HindIII durante 1h a 37°C em 400 microl de tampão, volume final (1.5.1). A fracção de DNA é extraída e precipitada (1.5.2 e 1.5.3), redissolvida e dotada de extremos cerses usando 4U de DNA-polimerase de T4 (Maniatis et al) a 37°C durante 30 min.



Após extracção e precipitação o DNA é auto-ligado com 2,5U de DNA-ligase de T4 (100 microl de tampão, volume final) precipitado e usado para transformar células competentes de E.coli DH5. Entre as colónias positivas para a tetraciclina seleccionou-se uma por análise de minipreparações por ter o padrão de restrição correcto e designou-se pBR13Tet (fig. 16b).

E6.2.2 - Substituição

a) 2 microgramas de pBR13Tet é digerido em 50 microl de tampão (volume final) com 12U de NdeI a 37°C durante 1 hora, em seguida as condições de reacção foram mudadas para tratamento com 2U de CIP (1.5.4) em 200 microl a 37°C durante 30 min, adicionou-se EGTA para uma concentração final de 10 mM, extraiu-se a fracção de DNA, precipitou-se e digeriu-se 1h a 37°C com 20U de PvuII em 100 microl de tampão (volume final), depois extraiu-se e precipitou-se novamente e finalmente redissolveu-se em 10 microl de TE.

b) 20 microgramas de RSVuPA foram digeridos em 150 microl com 100U de HpaI a 37°C durante 1 hora, depois as condições de reacção foram ajustadas ao tratamento com 22U de CIP (1.5.4) em 300 microl de tampão a 37°C durante 30 min, adicionou-se EGTA para uma concentração final de 10 mM, a fracção de DNA foi extraída, precipitada e digerida 1 hora a 37°C com 60U de NdeI em 200 microl, extraída e precipitada de novo e finalmente redissolvida em 20 microl de TE.

c) Fizeram-se três reacções de ligação diferentes (1.5.5) adicionando a 2,5 microl de pBR13Tet cortado (ver E4.4a) diferentes quantidades de RSVuPA digerido (ver E4.4b) para se obter proporções molares de 1:1, 1:2 e 1:4. A ligação é efectuada com 5U de DNA-ligase de T4 em 50 microl de tampão, durante 1 noite. A enzima é então inactivada pelo calor, a fracção de DNA precipitada, redissolvida em 10 microl de água e 5 microl desta mistura foi usado para

transformar células competentes E. coli DH5. Entre as colónias positivas para a tetraciclina seleccionou-se uma por análise de minipreparações por ter o padrão de restrição correcto e designou-se RSVuPA-Tet (Fig. 16d).

E6.2.3 - Modificação do sítio ScaI

1 micrograma de RSVuPA-Tet foi completamente digerido com 100U de ScaI em 200 microl a 37°C durante 3 horas (1.5.1). O DNA foi extraído, precipitado e redissolvido (1.5.2 e 1.5.3) em 20 microl de TE. Em vasos de reacção separados, 2 microl de RSVuPA-Tet linearizado assim obtido foi ligado a um excesso molar de 50 vezes dos adaptadores que se seguem que não contêm qualquer um dos sítios que estão presentes no plasmídeo antes do tratamento:

- Asp718 8 meros (sequência CGGTACCG, da Boehringer);
- ClaI 8 meros (sequência CATCGATG, da New England Biolabs);
- XhoI 8 meros (sequência CCTCGAGE, da New England Biolabs).

As reacções de ligação são efectuadas como descrito em 1.5.5 em 10 microl de tampão com 12U de DNA-ligase de T4, a fracção de DNA é extraída e precipitada, redissolvida em 300 microl do tampão adequado contendo respectivamente 360U de Asp718, 200U de ClaI ou 240U de XhoI durante 16 horas a 37°C. As fracções de DNA de três misturas de reacção são extraídas separadamente, precipitadas e o DNA é auto-emparelhado (1.5.5) com 1U de ligase em microl de tampão durante 16 horas. Após extracção e precipitação, cada uma das fracções de DNA é redissolvida em 5 microl de água e usada para transformar 100 microl de células competentes E. coli DH5. Entre as colónias positivas para a tetraciclina de cada uma das séries de transformação, seleccionou-se uma colónia por série por análise de minipreparações por ter o padrão de restrição correcto e designou-se respectivamente, RSVuPA-Tet-Asp, RSVuPA-Tet-Cla e RSVuPA-Tet-XhoI (Fig. 17).



E6.3 - Preparação de vectores de expressão de GASGAs

A região de ligação ao receptor de uPA (GFD) do uPA humano foi destruída abrindo os plasmídeos descritos em E6.1 e .2 no sítio introduzido de novo e preenchimento dos extremos protuberantes. Dependendo dos nucleotídeos adicionados durante a reacção de preenchimento, o resultado é uma inserção de 12 pb (quando se adiciona todos os nucleotídeos (ver E6.3.1)) ou uma inserção de 6 pb (quando se adiciona apenas o primeiro nucleotídeo e o resto do extremo protuberante é digerido pela DNA-polimerase de E. coli (ver E6.3.2). Estes vectores de GASGAs mantêm a grelha de leitura do uPA mas a proteína expressa não tem capacidade para se ligar ao seu receptor celular.

E6.3.1 - Preenchimento completo

1 micrograma de cada um dos plasmídeos com Asp718 ou XhoI modificados descritos em E3.2 pode ser ainda modificados linearizado-os no adaptador inserido por digestão com 5U da enzima adequada em 50 microl a 37°C (1.5.1) obtendo assim extremos protuberantes de quatro nucleotídeos por lado. O DNA pode ser extraído e precipitado (1.5.2 e 1.5.3) redissolvido em 50 microl do tampão adequado (Maniatis et al) contendo os quatro nucleotídeos e tratado com 5U de DNA-Polimerase, fragmento Klenow, à temperatura ambiente durante 30 min. O DNA obtido com extremos cerses pode ser extraído e precipitado como habitualmente. Uma porção correspondendo a 10% deste precipitado é auto-ligada em 100 microl (1.5.5) com 6U de DNA ligase durante 16 horas. Após extracção e precipitação, cada uma das fracções de DNA pode ser redissolvida em 5 microl de água e usado para transformar 100 microlitros de células competentes E. coli DH5. Para cada transformação, entre as colónias positivas para a tetraciclina pode-se seleccionar uma por análise de minipreparações por ter o padrão de restrição esperado e designou-se respectivamente (Fig. 18):

- RSV-SVRTD, derivado do preenchimento total do sítio Asp718 em RSVuPA-Tet-Asp e em que foi introduzido um novo sítio SraBI;
- RSV-SSIED, derivado do preenchimento total do sítio, XhoI em RSVuPA-Tet-Xho e em que foi introduzido um novo sítio PvuI.

E6.3.2 - Preenchimento parcial e/ou obtenção de extremos cerses

1 micrograma de cada um dos plasmídeos modificados com adaptadores Asp718 ou ClaI descritos em E6.2.3 (RSVuPA-Tet-Asp e RSVuPA-Tet-Cla) podem ainda ser modificados por linearização no adaptador inserido por digestão com 5U da enzima adequada em 50 microl de tampão (volume final) a 37°C (1.5.1) obtendo-se assim extremos protuberantes de 4 ou 7 nucleotídeos. Em seguida o DNA pode ser extraído e precipitado (1.5.2 e 1.5.3), redissolvido em 50 microl do tampão adequado (Maniatis et al) contendo apenas 2 mM dGTP no caso do preenchimento de Asp718 ou dATP e dTTP, 2 mM cada, no caso de se tornar cerses os extremos ClaI e tratados com 12U de DNA-Polimerase de E. coli (sem DNase; (Boehringer)) à temperatura ambiente durante 30 minutos. O DNA com extremos cerses obtido pode ser extraído e precipitado como habitualmente e 10% do precipitado obtido é auto-ligado com 6U de DNA-ligase em 100 microl do tampão adequado (1.5.5) durante 16 horas. Após extracção e precipitação, cada preparação de DNA é redissolvida em 5 microl de água e usada para transformar 100 microl de células competentes de E. coli DH5. Entre as colónias positivas para a tetraciclina, seleccionou-se um clone por série de transformação através de análise de minipreparações por ter o padrão de restrição esperado e é designado respectivamente (Fig. 18):

- RSV-SAD, derivado do preenchimento do sítio Asp718 em RSVuPA-Tet-Asp, em que foi introduzido um novo sítio EagI;
- RSV-SYD, derivado da colocação de extremos cerses no sítio ClaI em RSVuPA-Tet-Cla e em que um novo sítio NdeI foi introduzido.



E6.4 - Expressão e análise de GASGAs "interrompidos"

Vectores de expressão de GASGAs interrompidos tais como os descritos em E6.3 podem ser cotransfectados com RSV-Neo em células CHO e os clones RSV-Neo resistentes seleccionados e analisados como descrito em E2.6. Activação do plasminogénio pelos GASGAs "interrompidos", características imunológicas e propriedades de ligação ao receptor de uPA são paralelas às obtidas com RSVuPA-EO. Os clones seleccionados podem ser isolados e cultivados em fermentadores mantendo ao mesmo tempo a pressão selectiva (cf. E2.8).

E6.5 - Expressão de GASGAs "interrompidos" em vectores episomais

Vectores episomais, tais como vectores de expressão baseados em BPV (ver E3), expressando GASGAs "interrompidos" podem ser gerados substituindo um fragmento BssHI/SacI englobando a ORF uPA desde o exão II ao intrão J (cf. Fig. 3A) com um fragmento análogo derivado dos vectores de expressão de GASGAs descritos em E6.3 seguindo essencialmente a preparação de plasmídeos de expressão de GASGAs derivados de BPV descrita em E3. Tais vectores episomais podem ser expressos e analisados como descrito em E6.4.

Preparações

Pl. Preparação de anticorpos monoclonais anti-GFD

Anticorpos monoclonais (MABs) específicos da região GFD de tcuPA/scuPA podem ser obtidos por seleção adequada de MABs anti-uPA derivados de hibridoma cujas células genitoras de baço são de animais que foram imunizados com scuPA, tcuPA ou ATF ou uma mistura deles. Uma sonda adequada a esta seleção consiste num fragmento peptídico designado F₆ que tem um peso molecular aparente de cerca de 6 kd, uma sequência de aminoácidos correspondendo à sequência de uPA desde o resíduo de leucina na posição 4 até ao resíduo de ácido glutâmico na posição 43 e corresponde (inclui ou é uma posição relevante) ao chamado GFD (domínio tipo factor de crescimento) do uPA, i.e. uma sequência de aminoácidos altamente homóloga de uma sequência característica do factor de crescimento epidérmico. Pensa-se que esta área é responsável pela ligação do uPA aos seus receptores da superfície celular.

Pl.1 - Produção de anticorpos monoclonais

Urocinase de 54000 Daltons altamente purificada, 120000UI/mg) (PERSOLV^R Lepetit) foi usada para imunizar murganhos Balb/C fêmeas de 7 semanas de idade. 10 Microgramas desta urocinase em adjuvante completo de Freund é injectado no peritoneu dos animais 60 dias antes da fusão. Mais 10 microgramas de urocinase é dado aos ratinhos 30 dias mais tarde. Dez dias antes da fusão o título de anticorpos anti-urocinase é medido por ELISA convencional em amostras de sangue retiradas das veias da cauda e 5 dias antes da fusão, é dada uma injeção final de memória de 10 microgramas de urocinase por via endovenosa apenas aos animais possuidores de um título de anticorpos superior a 10000. Os baços são então removidos no dia da fusão e as células do baço (cerca de 1×10^8) são fundidas com aproximadamente 5×10^7 células de mieloma de ratinho NSO (sublinha de P3/NS1/1Ag 4.1, Número de acesso

ATCC TIB18) em 50% de PEG 6000.

Após fusão que foi efectuada seguindo substancialmente o método de C. Milstein e G. Köhler, as células são ressuspensas em meio de Eagle modificação de Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal de vitela em meio HAT (0,1 mM Hipoxantina, 0,25 mM Aminopterin, 0,017 mM Timidina, Flow Laboratories) e colocadas em 5 placas diferentes Costar contendo macrofagos de murganho (camada de sustentação).

O meio HAT é mudado de 3 em 3 dias e a partir do dia 10 após fusão, os sobrenadantes são testados num imunoensaio ELISA todos os 2-3 dias quanto à presença de anticorpos monoclonais anti-urocinase.

Pl.2 - Despiste de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-urocinase

De acordo com uma modificação do método de Perlman (Immunochemistry, 8, 873 (1971)), placas de microtitulação de 96 poços flexíveis (Dynatech) são revestidas com 50 microlitros/poço de uma solução de urocinase a 20 microgramas/ml em tampão de fosfatos salino pH 7,2, (0,05 M fosfato de sódio pH 7,2 que contém 0,5M cloreto de sódio) e incubadas durante 1h à temperatura ambiente. Após lavagem extensiva em tampão de fosfatos salino contendo 0,05% de Tween 20, os poços são saturados com albumina do soro bovina a 3% em tampão de fosfatos salino, durante 3h à temperatura ambiente para evitar ligações inespecíficas. Após lavagem cuidadosa, adiciona-se 50 microlitros de sobrenadante de culturas de hibridomas (ou o mesmo volume de fluido ascítico) aos poços e deixa-se reagir durante duas horas à temperatura ambiente. As placas são então lavadas e incubadas com uma diluição a 1:1000 do conjugado de Ig de coelho anti-ratinho com peroxidase de rábano silvestre (Pl61, DAKO), durante 90 min. à temperatura ambiente. Após lavagem extensiva, as placas são incubadas

com 200 microlitros/poço de solução a 1 mg/ml do cromogénio o-feniletildenodiamina (SIGMA) em tampão citrato 0,1M pH 6, 1,7 mM H₂O₂. A côr é desenvolvida em 20 minutos e a densidade óptica lida a 429 nm contra brancos sem antigénio ou sem anticorpo. Os poços com níveis de côr 4 vezes superior aos brancos são considerados positivos.


Pl.3 - Despiste de anticorpos monoclonais anti GFD por imunotransferência

Os clones positivos no despiste atrás (pl.2) são ainda analisados por um ensaio de imunotransferência (transferência Western) na presença de scuPA, uPA, ATF e uPA F₁₂, B₁₁ e F₆, que são obtidos como descrito em P2 abaixo. Estes compostos de referência migram paralelamente numa experiência de SDS-PAGE (contendo 20% de acrilamida) (ver 1.5.7) e depois transferidos para uma membrana de nitrocelulose e analisado contra os sobrenadantes de clones que eram positivos no ensaio de ELISA descrito atrás.

Os MABs que se ligam scuPA/tcuPA, ATF e fragmento F₆ do uPA sem se ligarem aos fragmentos F₁₂ ou B₁₁ são isolados e os clones produtores são ainda cultivados para produzir quantidades significativas deles. Dois clones que produziram MABs tendo especificidade para GFD (i.e. sem capacidade de ligação a outras regiões do uPA) foram isolados e designados CD1 e CD6 (ver Tab. 3).

Pl.4 - Cultura em massa de hibridomas produtores de anti-urocinase

Os hibridomas produtores de anticorpos anti-urocinase foram seleccionados, clonados por diluição limite, cultivados em culturas em massa e injectados no peritoneu de murganhos Balb/C préviamente tratados com 0,5 ml de Pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano; Aldrich). Quinze dias mais tarde são colhidos os fluidos ascíticos. A concen-



tração de anticorpos monoclonais anti-urocinase está na gama de 10-20 mg/ml. Eles são purificados por cromatografia em Proteína-A Sepharose ou cromatografia de afinidade em urocina-se-Sepharose.

Pl.5 - Purificação de anticorpos monoclonais anti-urocinase por cromatografia de afinidade em Sepharose-urocinase

Preparou-se um conjugado Sepharose-urocinase reagindo Sepharose 4B activada com CNBr (Pharmacia) com urocina-se de alto peso molecular (120 000UI/mg). A eficácia de acoplamento é de cerca de 20 mg de urocina-se/ml de gel inchado. Os fluídos de ascites obtidos como atrás (1 ml por hibridoma produtor) são então aplicados à coluna de afinidade de Sepharose-urocinase (1,6 cmx15 cm) pré-equilibrada em tampão 0,01M fosfato de sódio pH 8,0. Após lavagem com o mesmo tampão, os anticorpos monoclonais anti-urocinase seletivamente adsorvidos são eluidos com 0,1M ácido acético pH 3,0. As fracções contendo anticorpo são reunidas e concentradas por ultrafiltração em membranas Millipore PSDE 09005 e guardadas congeladas até serem usadas.

Pl.6 - Avaliação da pureza e homogeneidade das preparações de anticorpos monoclonais por electroforese em gel

O anticorpo monoclonal obtido atrás é submetido a SDS-PAGE (electroforese em gel de dodecilsulfato de sódio e poliacrilamida) de acordo com o método descrito por W.K. Laemmli em Nature 227, 680 (1970). São evidentes apenas as bandas correspondentes às cadeias pesada e leve de IgG indicando que o eluato acima contém imunoglobulinas puras.

P2 - Preparação do fragmento de uPA F₆, B₁₁ e F₁₂

a) clivagem enzimática de ATF e identificação dos fragmentos produzidos (F₆, B₁₁ e F₁₂)

O fragmento amino-terminal do uPA (ATF), (1,1 mg) preparado de acordo com Stoppelli M.P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 4939-4943, é tratado com protease V8 derivada de Staphylococcus aureus (0,32 mg; Boehringer) em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,8) durante 90 min a 37°C. Nestas condições a protease V8 corta o ATF no lado carboxílico dos resíduos de ácido glutâmico. A reacção enzimática é bloqueada fervendo a mistura 2 min e os fragmentos proteicos assim obtidos são analisados em SDS-PAGE (20% de acrilamida) e comparado com o ATF original. A banda correspondente ao ATF já não está presente mas observam-se três bandas com peso molecular aparente de (2000, 11000 e 6000, respectivamente, conforme determinado por comparação com padrões de determinado peso molecular.

b) separação dos fragmentos F₆, B₁₁ e F₁₂ por cromatografia de afinidade.

A mistura atrás obtida é aplicada numa matrix de 5B4-agarose (uma matrix de agarose modificada portadora de um anticorpo monoclonal, designado 5B4, que se liga a urocinase de alto peso molecular sem se ligar à forma de baixo peso molecular de acordo com métodos convencionais ligando MAB 5B4 com Sepharose (Pharmacia) como descrito por Corti A., Nolli ML., Soffientini A. e Cassani G. em Trom. Haemostas 1986; 56, 219-224). Esta coluna foi préviamente equilibrada com 0,15M cloreto de sódio e tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,4 contendo 1% de polietilenoglicol (PEG) 6000.

c) recuperação da fracção não ligada

O tampão de equilíbrio é passado através da coluna e as fracções são colhidas, controladas por U.V. (280 nm) e reunidas dependendo do seu teor. Obtiveram-se dois conjugados de fracções principais, um que contem o fragmento do uPA com peso molecular de 12000 (que se designa F_{12}) e um outro com peso molecular aparente de 6000 (que se designa F_6). Estes fragmentos são purificados por cromatografia de permuta iónica seguido da remoção de sal em cromatografia de fase reversa como descrito abaixo em e).

e) recuperação da fracção ligada

A fracção ligada à matrix é então eluída com cloreto de sódio 1M e ácido acético 0,1M contendo 1% de PEG 6000. As fracções são colhidas, controladas por U.V. (280 nm) e reunidas de acordo com o seu teor. Obteve-se uma única fracção principal que contem o fragmento de uPA com peso molecular aparente de 11000 que se designa B_{11} e foi purificado como descrito abaixo.

e) purificação dos fragmentos B_{11} , F_6 e F_{12}

As fracções reunidas que contêm, separadamente, os fragmentos B_{11} , F_{12} ou F_6 obtidos atrás, são ainda purificados e concentrados por cromatografia de permuta iónica num sistema de FPLC (cromatografia líquida "fast" de proteínas) (Pharmacia Fine Chemicals, Suécia) usando uma coluna Mono SHR5/5 (permutador de catiões forte baseado em esferas de resina hidrofílica com uma distribuição de tamanho das partículas estreita; o grupo carregado é $-CH_2SO_2$) pré-equilibrado com tampão acetato de sódio 0,05M, pH 4,8.

A eluição é feita com um gradiente linear de cloreto de sódio aquoso de 0 a 1M a 60 ml/h em 45 min. Às fracções contendo, separadamente, fragmentos B_{11} , F_6 e F_{12} é



então removido o sal submetendo-se a cromatografia em coluna de fase reversa como descrito em 1.6.3. Os fragmentos puros são isolados a partir das fracções em que estão por evaporação do solvente sob pressão reduzida.

f) sequenciação de aminoácidos de F_6 , B_{11} e F_{12}

A sequência N-terminal de fracções F_{12} e F_{11} foi determinada por sequenciador automático (Applied Biosystem, Modelo 470A Fase-Gasosa) e cada pico verificou-se ser composto por um fragmento principal com poucos contaminantes, enquanto o fragmento consistiu num único peptídeo (Tabela 4). As sequências do fragmento apresentam clivagem preferencial por V8 no lado carboxilo de um resíduo de ácido glutâmico. O fragmento F_{12} e o fragmento B_{11} diferem apenas no corte entre a posição 52 e 53. O peso molecular do fragmento F_6 corresponde a um peptídeo resultante do corte de ATF nas posições Glu_3 e Glu_{43} . Assim V8 corta um peptídeo na região GFD e dois peptídeos essencialmente correspondendo à chamada região de "ansas múltiplas" (diferindo apenas num sítio clivado).

Tabela 3

mAB	scuPA	LMW	ATF	B11	F12	F6
5B4	+	-	+	+	-	-
DC1	+	-	+	-	-	+
CD6	+	-	+	-	-	+

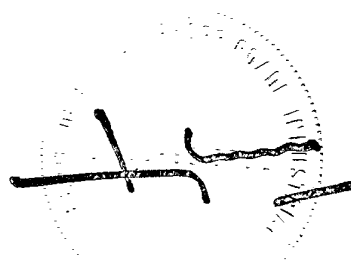
Reconhecimento das diferentes partes do uPA por anticorpos monoclonais (mAB):
5B4 reconhece um epítipo conformacional na região de ansas múltiplas, DC1 e
CD6 reconhece a região GFD. Peso molecular baixo (LMW) refere-se ao produto de de-
gradação do uPA de 33KD compreendendo os aminoácidos 136 a 411.

11

Tabela 4

F6	1	5	10	14										
a.a.	Leu	His	Gln	Val	Pro	Ser	Asn	---	Asp	---	Leu	Asn	Gli	Gli
uPA	4	8	13	17										

Tab 4: Sequência de aminoácidos N-terminal do fragmento F6; uPA indica as posições correspondentes na molécula de uPA; (ciclos 8 e 10) não se detecta qualquer aminoácido; isto é interpretado como se tratando de resíduos Cis, uma vez que estes resíduos não são directamente detectáveis pelo sistema de HPLC usado.



REIVINDICAÇÕES

1a. - Processo para a preparação de derivados do activador de plasminogénio de urina humana caracterizado por compreender:

a) a modificação química de um scu-PA ou uPA nativos na região GFD, ou

b) a alteração da região uPA codificadora da GFD por deleção inserção ou mutação dirigida específica de sítio.

2a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender a inserção numa célula animal adequada de um vector de expressão contendo uma região codificadora de uPA de origem genómica com uma deleção na região codificadora da proteína GFD e a recuperação de um activador do plasminogénio de urina humana, após cultura das células transformadas.

3a. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por a deleção ser na região do DNA codificadora da sequência de aminoácidos entre 9 e 50.

4a. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por a deleção ser na região do DNA codificadora da sequência de aminoácidos entre 9 e 45.

5a. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por a deleção ser na região do DNA codificadora da sequência de aminoácidos 19 e 32.

6a. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por a deleção ser entre o pb 1027 e o pb 1784 do DNA codificador da sequência.

7a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um derivado do ativador do plasminogénio de urina humana tendo alterada a região contendo o domínio tipo Factor de Crescimento.

8a. - Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por se preparar um derivado do ativador do plasminogénio de urina humana, em que a região entre o aminoácido 9 e o aminoácido 50 é alterada.

9a. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por se preparar um derivado do ativador do plasminogénio de urina humana, em que a região entre o aminoácido 9 e o aminoácido 45 é alterada.

10a. - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por se preparar o derivado do ativador do plasminogénio de urina humana, em que a região entre o aminoácido 19 e o aminoácido 32 é alterada.

11a. - Processo de acordo com as reivindicações 7, 8, 9, 10, caracterizado por se preparar um derivado de activador do plasminogénio de urina humana que é um derivado de deleção do scu-PA nativo.

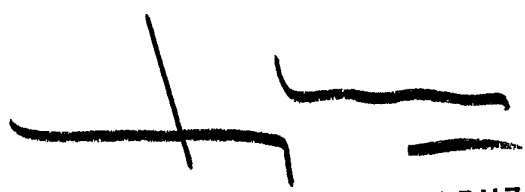
12a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um composto, em que a sequência de aminoácidos entre o aminoácido 9, e o aminoácido 45 é substituído por unidade tirosina.

13a. - Processo para a preparação de uma

composição farmacêutica caracterizado por se incluir na referida composição um composto obtido de acordo com uma das reivindicações 1 a 12, misturado com um veículo farmacêuticamente aceitável.

14ª. - Método para o tratamento anti-trombotico, caracterizado por se administrar a um paciente, um composto obtido de acordo com uma das reivindicações 1 a 12, sendo a gama de dosagem diária de 2 a 30 mg, de preferência de 2 a 10 mg.

Lisboa, 6 de Setembro de 1988



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR GORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA

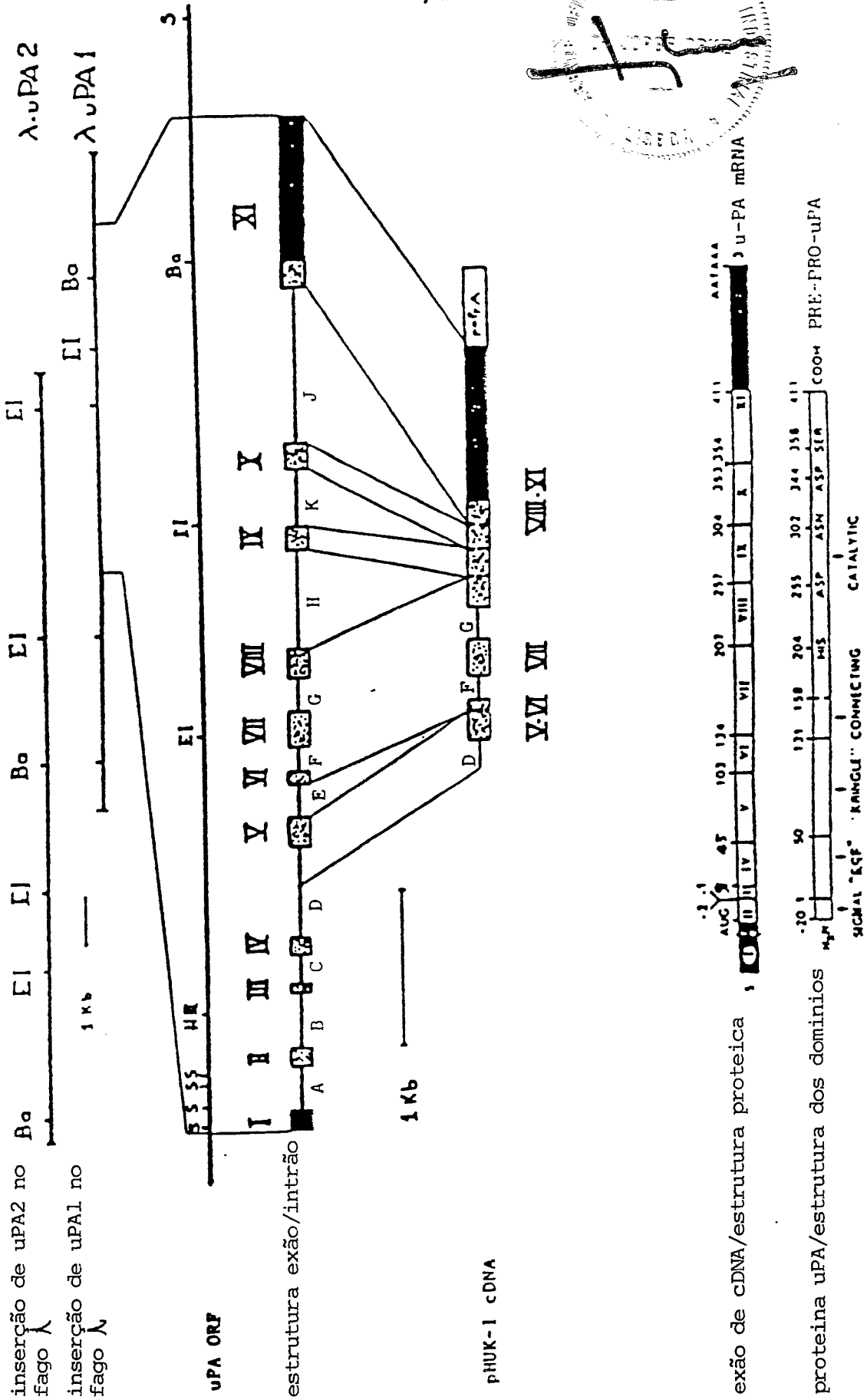
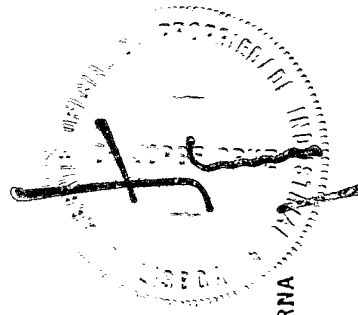


Fig. 1

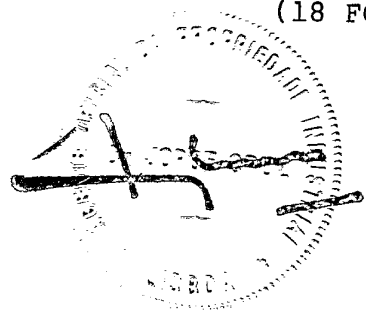
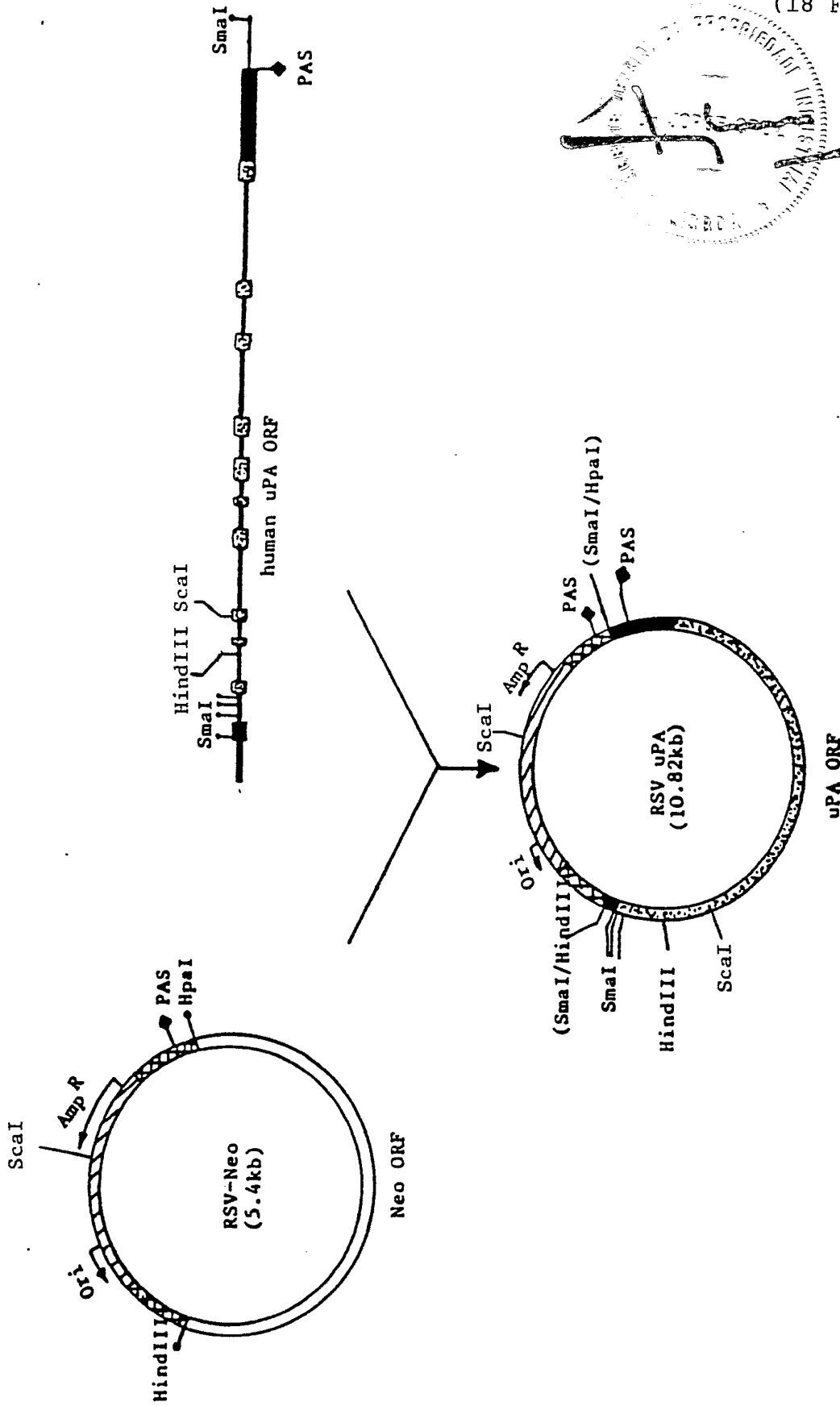


Fig. 2

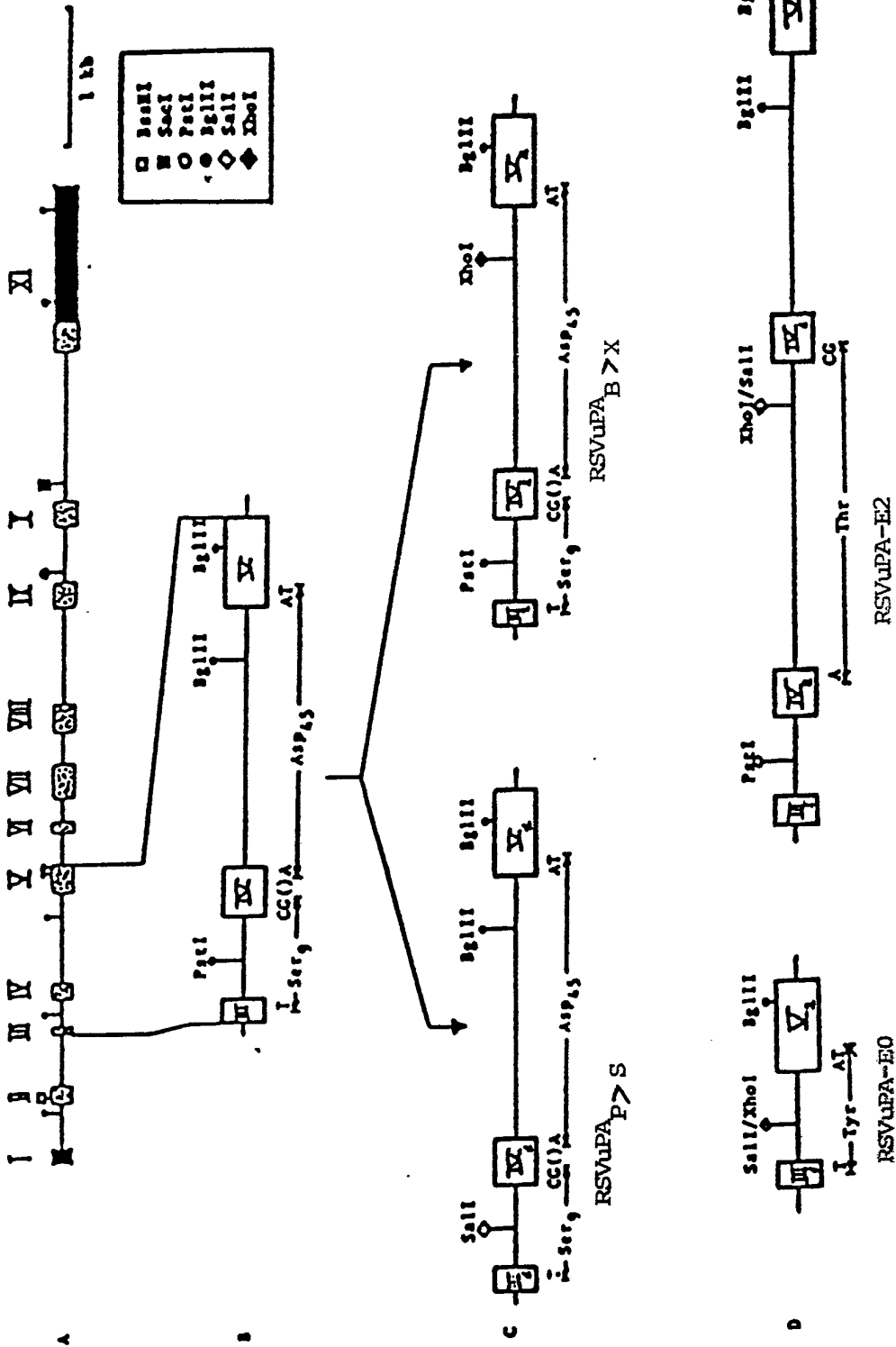
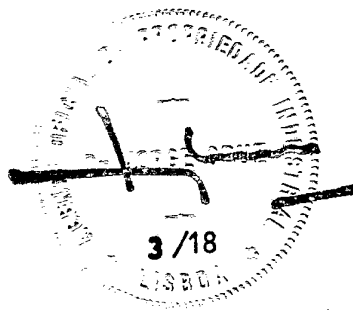
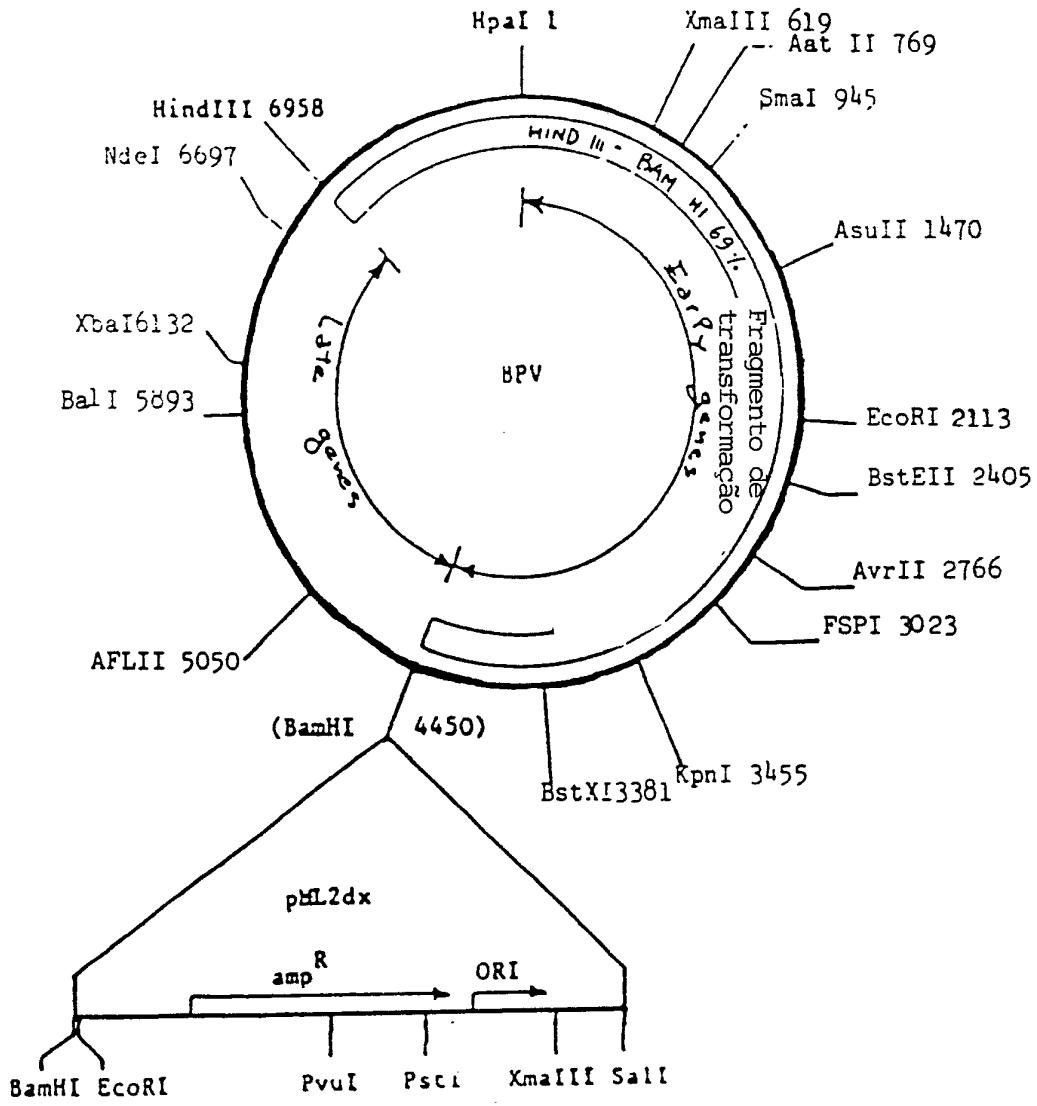
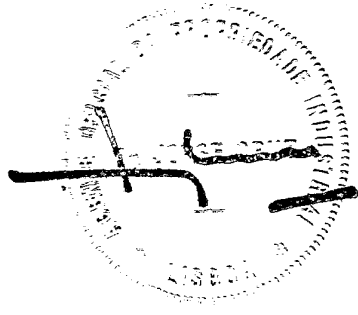


Fig. 3



pBPV 230.8

Sarver et al, Mol.Cell.Biol. 5, 1507 (1985)

Fig. 4

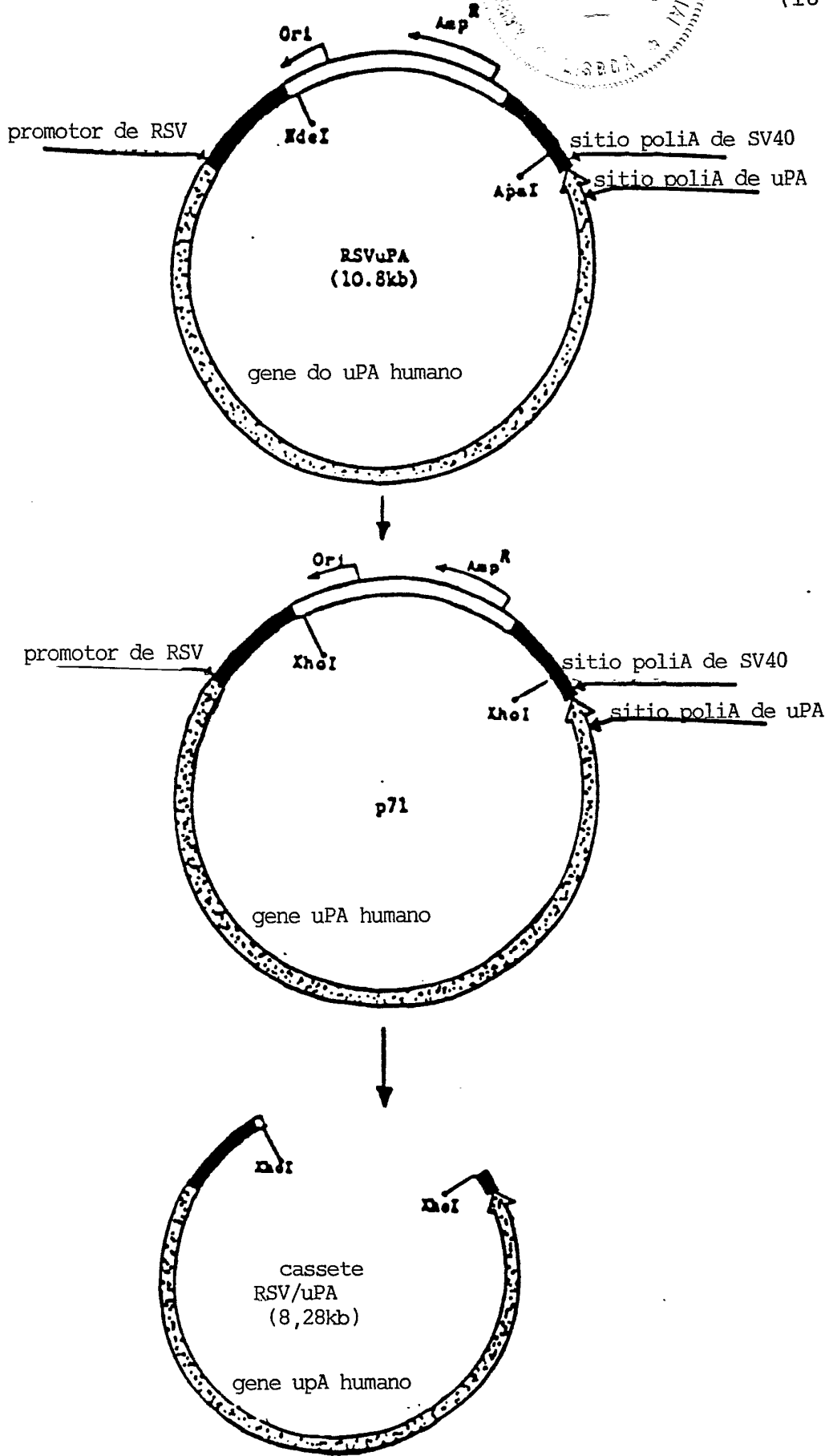


Fig.5

DNA do virus de papiloma bovino

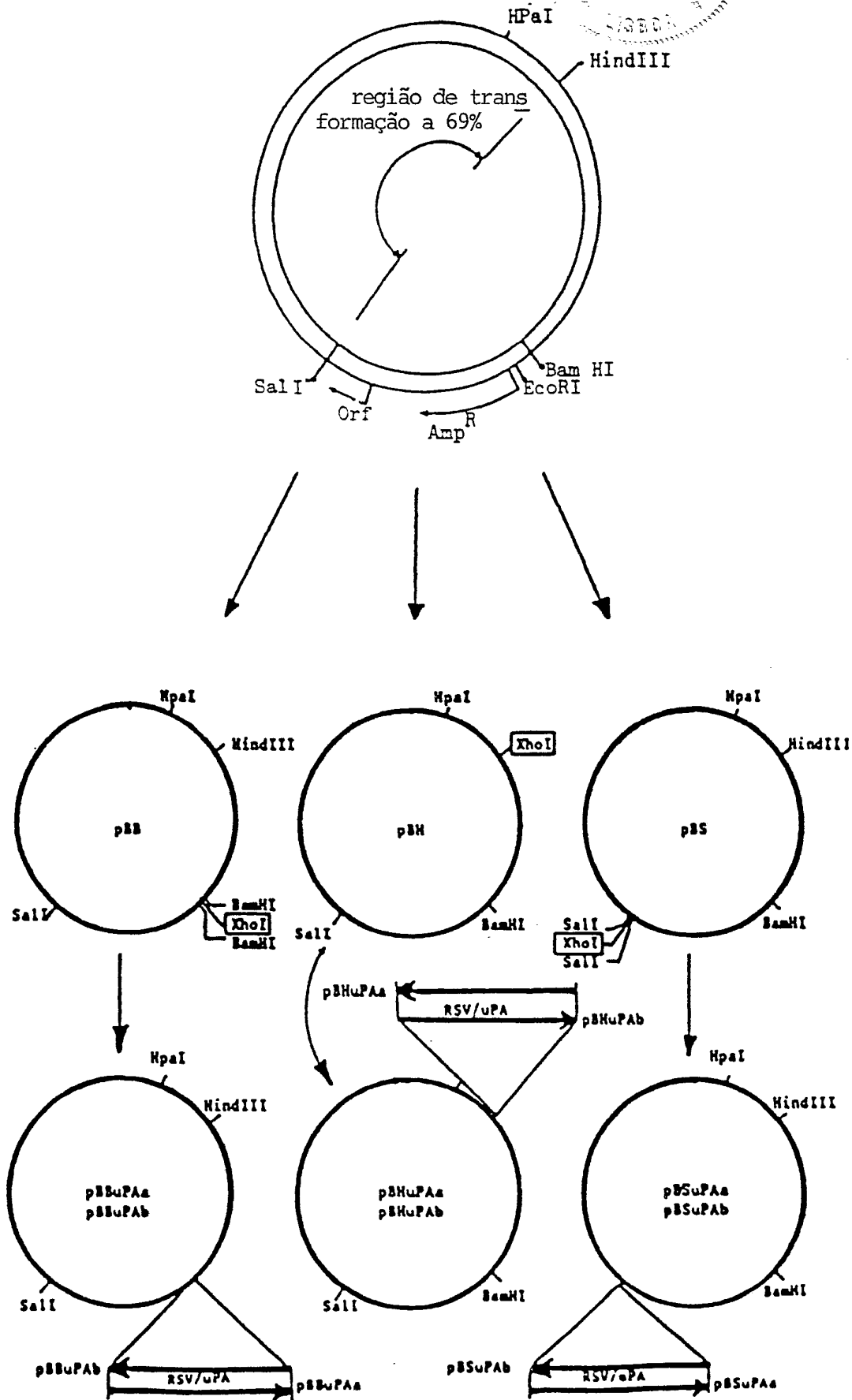


Fig. 6



derivados de pBB

derivados de pB4

derivados de pB5

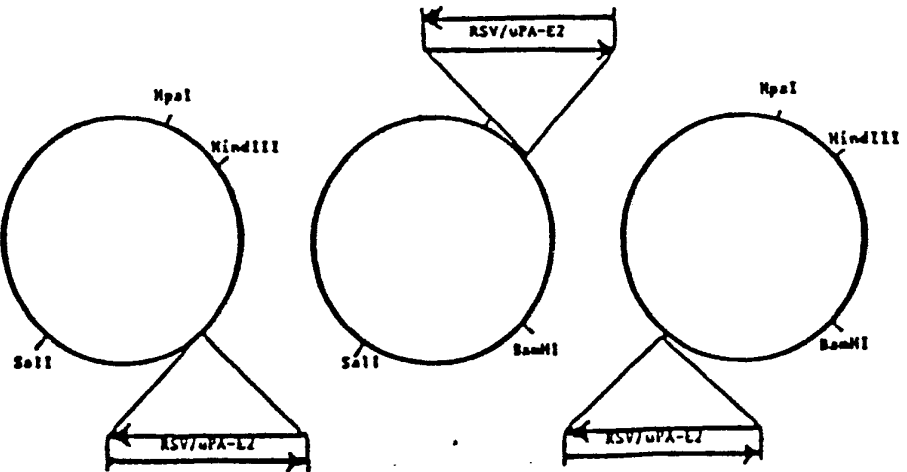
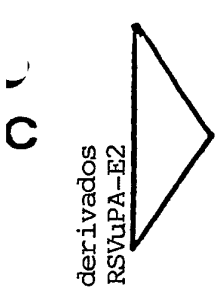
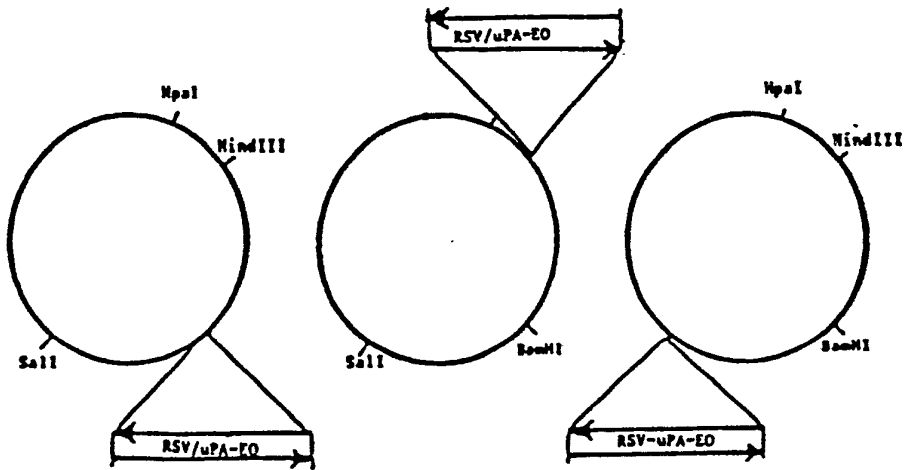
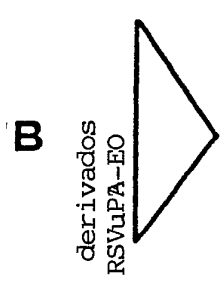
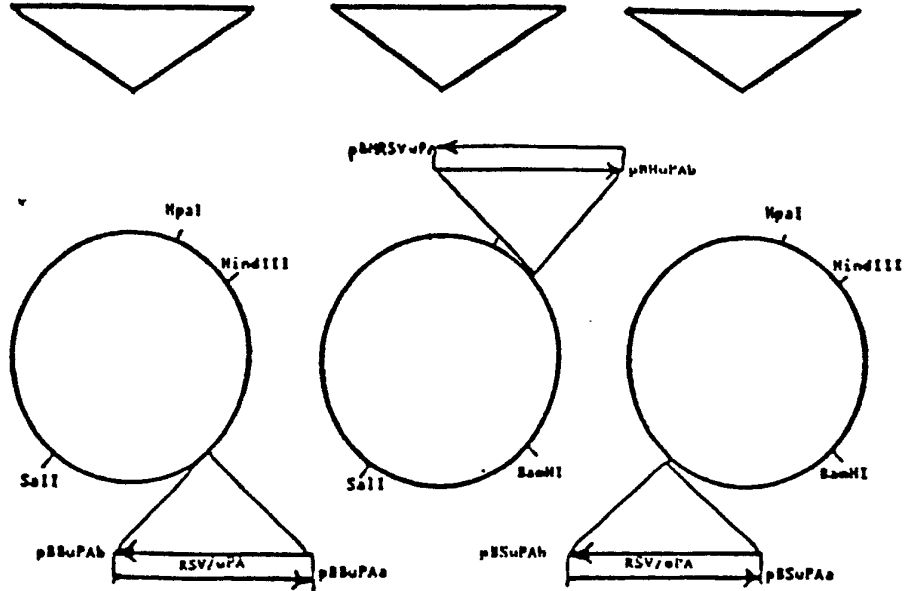
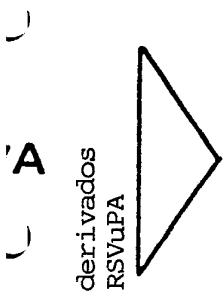


Fig. 7

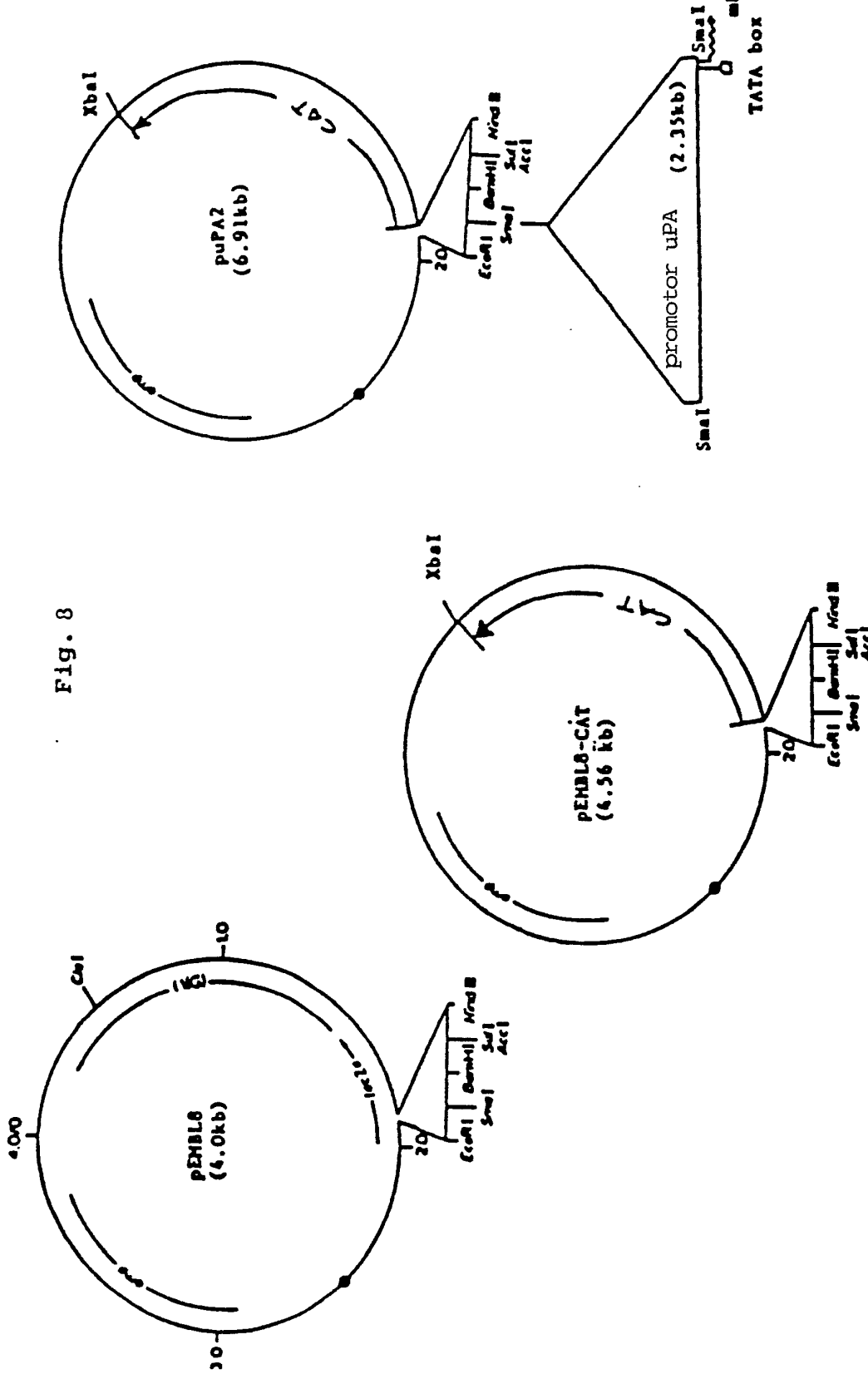
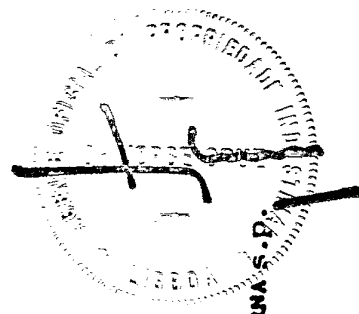
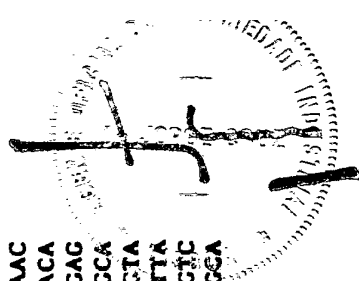


Fig. 8



Sequência do promotor uPA humano

```

-2353
-2300 GTGACAGACC GAGACTCCGT CTCAAAAA AAAAATAAAA AATATGGCTG GGG GAGGGGGAGC TTGCAGTGAG CCGAGATTGT GCCACTGCAC TCACGCTCG
-2200 GAGGACCCCT TGAACCCAGA AGCCACGCA AACCTGTCT TAAAAAAA CGTGGCAGG AAMAGAAGCTG TGCACAAAGA TTTACAGAGG TAATCCAGC ACITTTGGAAG GATCAGCTGG
-2100 ATAAGCAACT TCTGTGAAGA GTTGAAGTCC TAGGTGAAGA CGTGGCAGG CCGAGGAGCG GCGGAAACCG GAGAAAGGCT GCTAAAGAT TAGCCGATCC
-2000 CCAACCTCT TTGTCCAGCA GGAATGAAG TCATGTGCC TCAGCAAT CAGCATGACA GCTCCAGCC AAGTAACCTT GGACTCATGA GAGCTGTAG
-1900 GGGAGCAACA TGAATCATGA CCGCCCGCT GGAATTTCC TGATTACTAA CCTGGGAGTT TCGGGTAAG TCCTCAGGCT GCAGCATCTC TGTTTATGTT
-1800 CTGGTACCT TATTACAA TTAATGGGT CTCAAATCCA AACAAACTG ACCACAGTCT TCTAGAGGA CTAGCAAGGT TGGCTCTGAA GCCTATAGCA
-1700 TCTCTACTC AGTCTGTCCC TTGAAAGGT GGCAGTCCG GAAGCAGAG AGTCTCTCA GAAGCAGTG GCTCACCTGC CTCCAAAAG CTGAAAGACT
-1600 AACTTGTAT TTCCCAGCA GGEAGTGG ATCCTGAGCC CTGGCTGG GCAGAGCAA GGAGCTTCC TCGTTCTAC CTTCCTGGA CTCTCCCTGC
-1500 CTTCCTTCT TCACTCTCAG GTGGACCG ACCCAAGTC CAGATTGCA AGCCAGGAA ATGCTGCAG CCTAGGCTG GAAAGGGCC AAGCCGCTA
-1400 GTGGATTGCT GGGACTCAG CTCCTCTTC CCACTAAGAG AGGAGTGT ACTGGTTCA AATGACCCC ANSCCTGT TTCTGACACT AGGGGAAGA
-1300 GATGGGGTG ACAGATCAC AGAAQCCCTG CTATGTTCT CCAAGTGTCC CCAGAGATCC GTGTGTGT TTGTGATAC ACAATGTCT GCTTATCCTC
-1200 AGCAGGAAG GGTGGATNCA GTCAITTTACA CATGTTCT TTTTCTGGAG GACAAITTTA TTGATAAAC AATTGTTCT ATCTCAATAG AATAACAAG
-1100 GCTCTATGAT GAAGTAAAC ACTAATACA CATGCATTA AATATGATA ATTATCTTT TCCATGGC TATACAGAGA TGCTCTTT AACCTGTTAA
-1000 GAGTGTAAA GGACAAACAG TGAANTRA TCRCTCTCT TAQTTGTCC TCCAGTCCC GANTTCTCT TATACAGAGA TGCTCTTT TCCACACCCC
-900 TCCAGAACCT CCACAGTTAG AACTGTCTAC ATGTTCCCA TGCTTTTAC TTTTATCTT CCCTCCCTT GCCTGCACAV ATAAATGAA TGTCCATTA TGGAACTTC
-800 CCAATCCTTA TCAAGCCCTG CACTTCAATA GGAAGCACA ACAGTTATG CACTAGCCTT TTTTGAGTAA TCTGGCCTG CATCTGTAAC ATCATATCAC GACACCTAAC
-700 AACCCCTTA CTGGGAAAG CAATAGCCC CCTTTGTTG CATCCACTGG TIGTGTGGT CGTACATTTG TCGCGTGATG AAGACTTCA AGCTCCATCA CTTGCGGGCA
-600 CCCCTACAG CAGGGTTTT TCTGTCTGT CTTCTTGGG GAGTATGCT GGAAGAATC CAGTAGAGG CCCCAGGAGG CTTGAGAGCT GCGCGAGTA
-500 AGGGGTCTG AGCCAGTCTT AGCCAAGTTG GGGCCAGCG GGAGAAGTTG GAGTAGGCA GATTAGAGG CCGCAGGAGG CTTGAGAGCT GCGCGAGTA
-400 GAGAGTCTC TGTCGGCTT CTCTCTCTC TGAATTCGG GACTGGGCA GCGCCCGGG AGCTGCATGG GAGGAAGCAC GGAGAATTTA
-300 CAAGCCTCTC GATTCCTCAG TCCAGAGCT GTTGGTCCC CTCGGCTGA GATGGGCTT CCCCCAAATC TTGTGAGCG TTGGGAAAG ACGGGGCTC
-200 CCGTCTCTG ACGCTGCCA GACAGGGAG GAGCCGGG GAGAGAGG GCGGGCGGG CCTGATATAG AGCAGGGCC CCGGGTCTCA
-100 CCACAGTCCG AGACCCAGC CCGGAGCCC
+1

```

Fig. 9

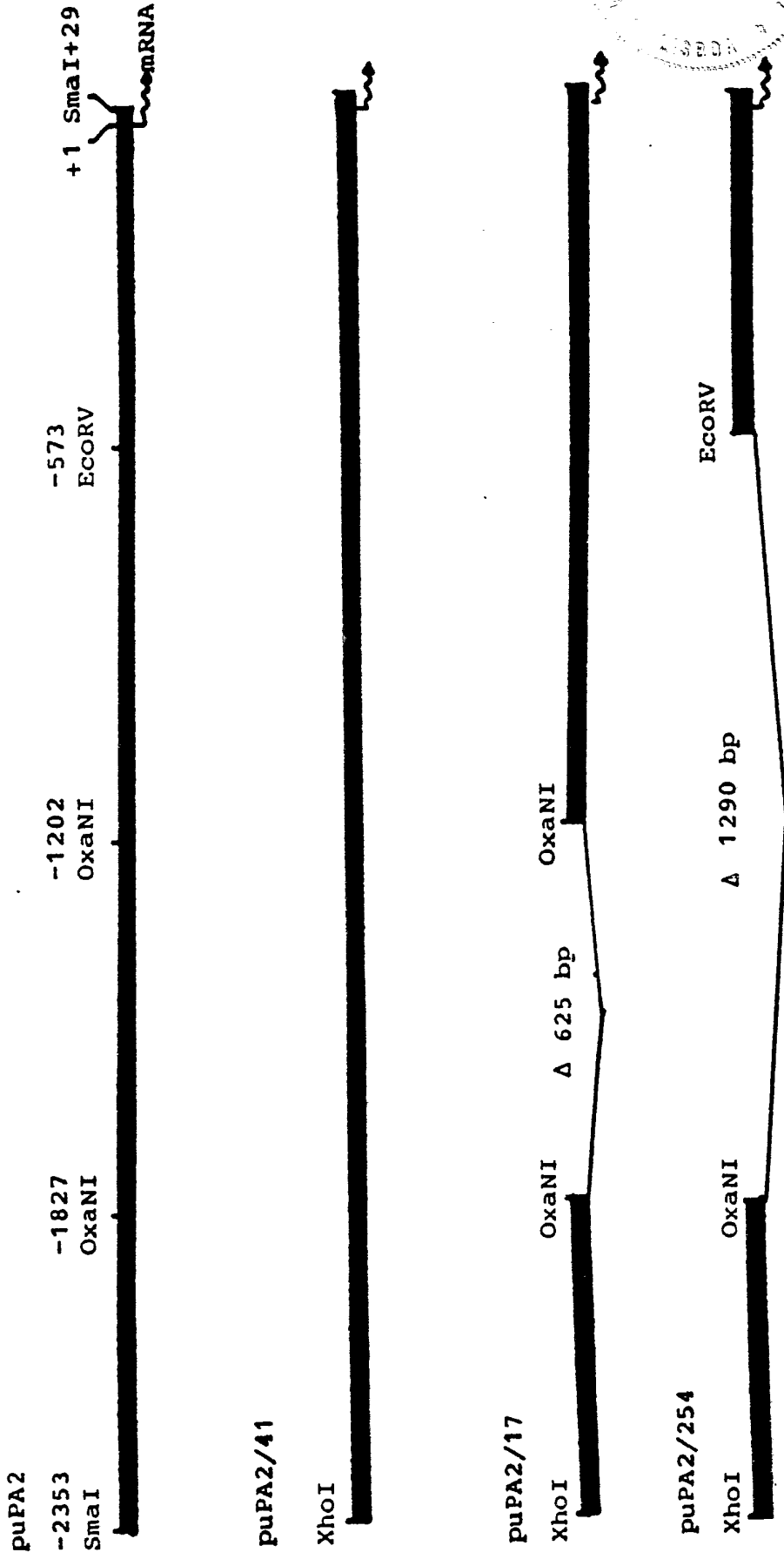
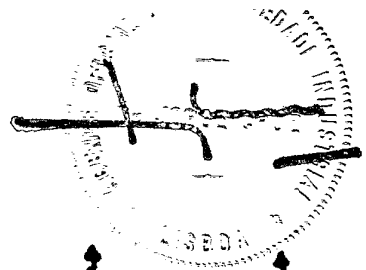


Fig. 10

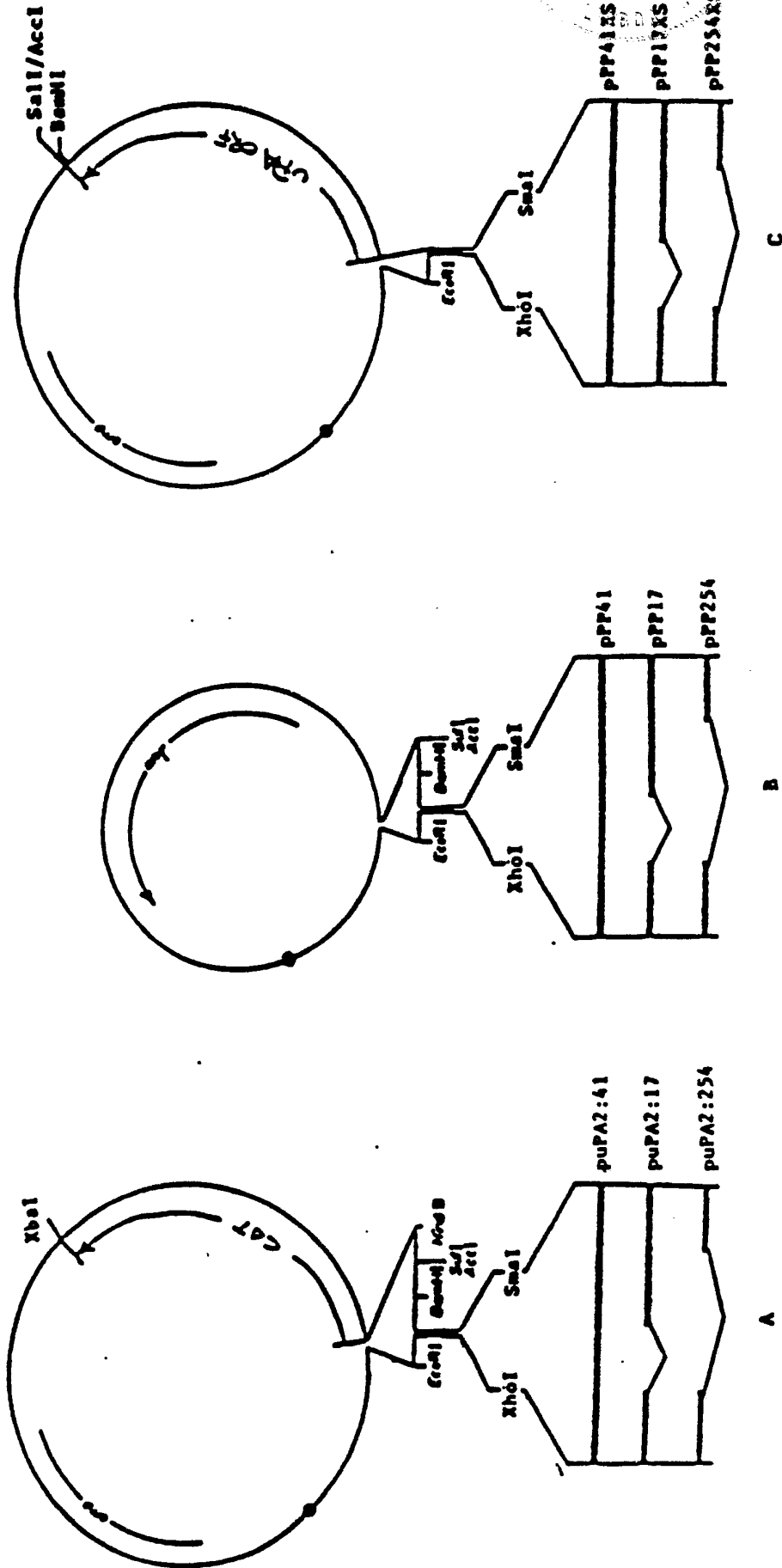
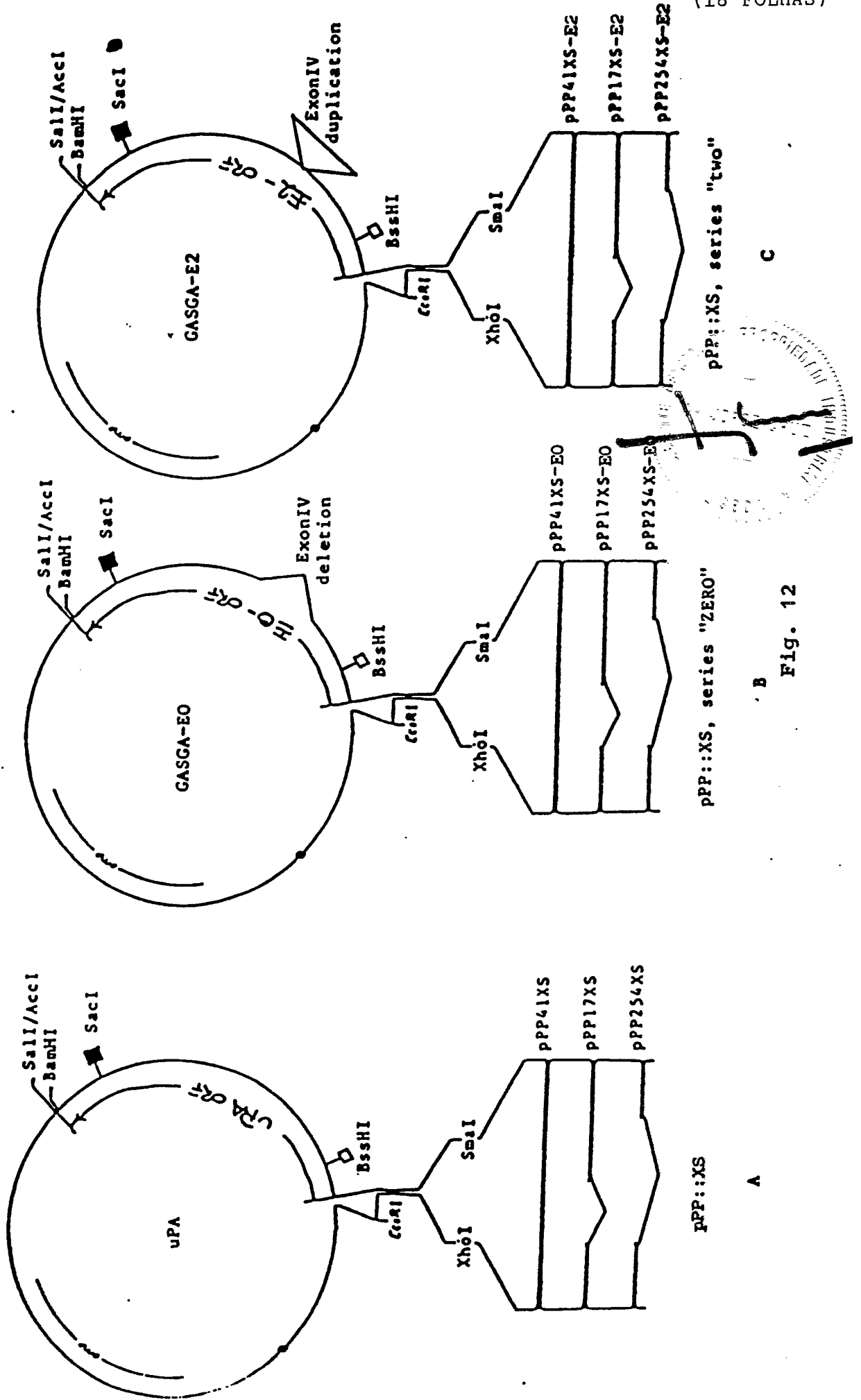


Fig. 11



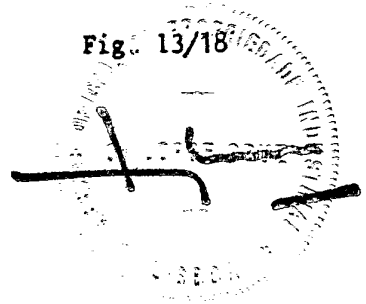
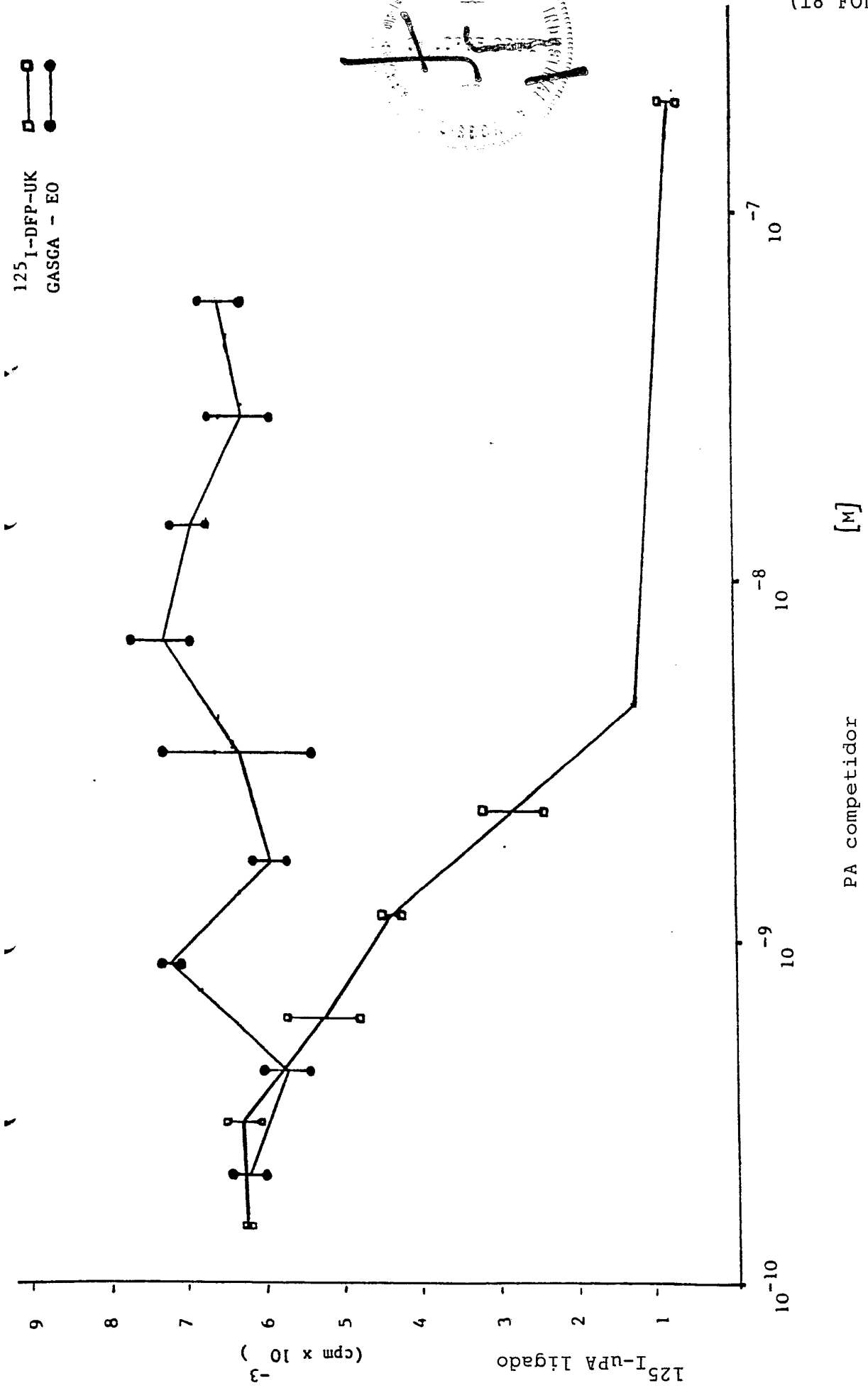
PPP::XS, series "ZERO"

PPP::XS, series "two"

A
B
C

Fig. 12

Fig. 13/18



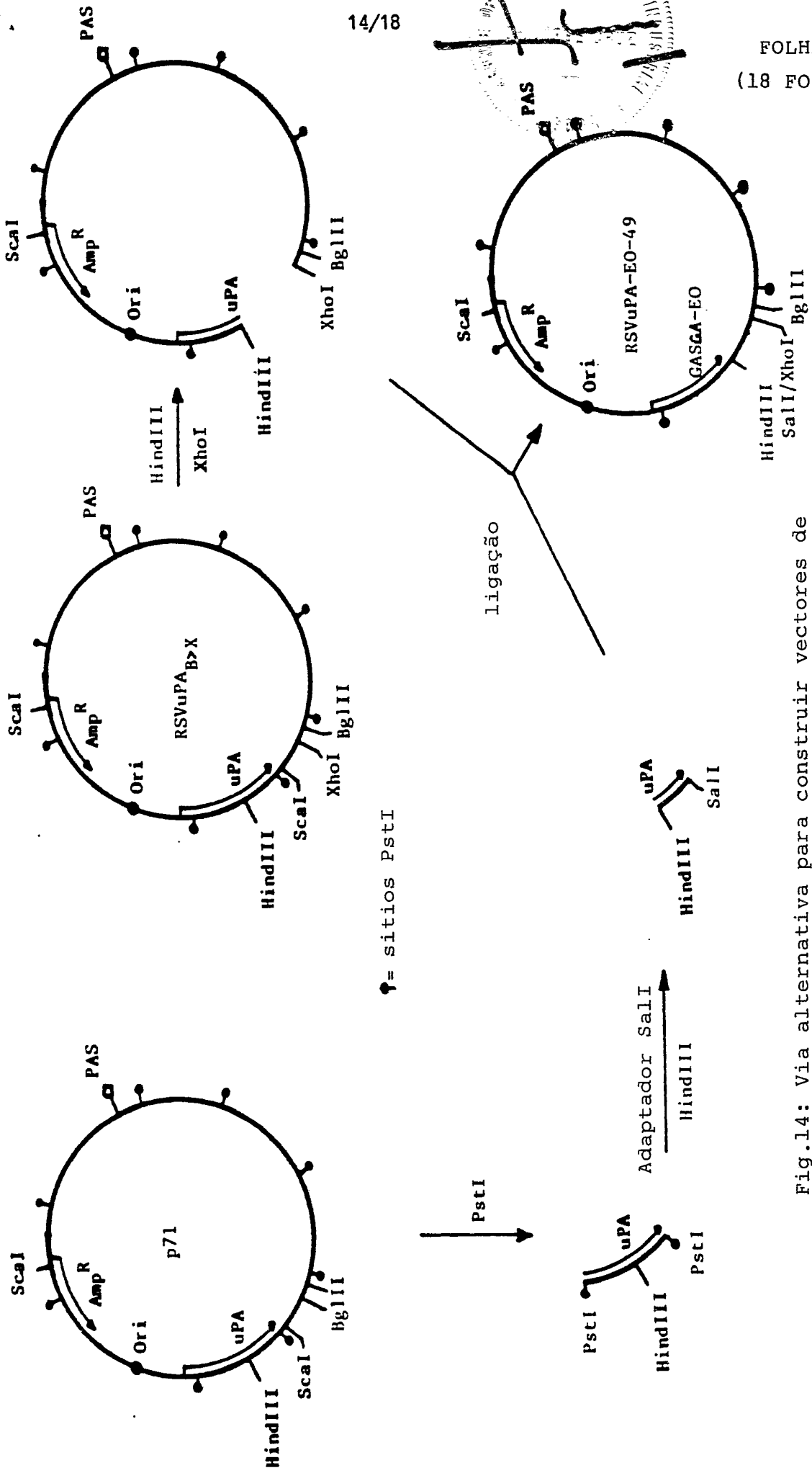


Fig.14: Via alternativa para construir vectores de expressão GASGA-ED

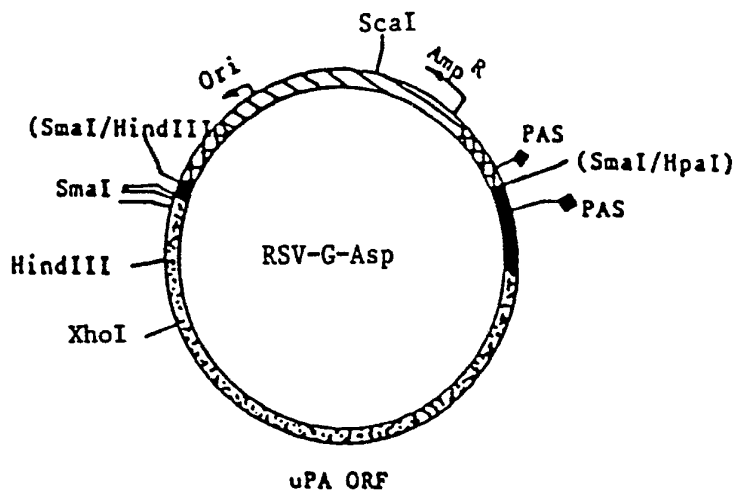
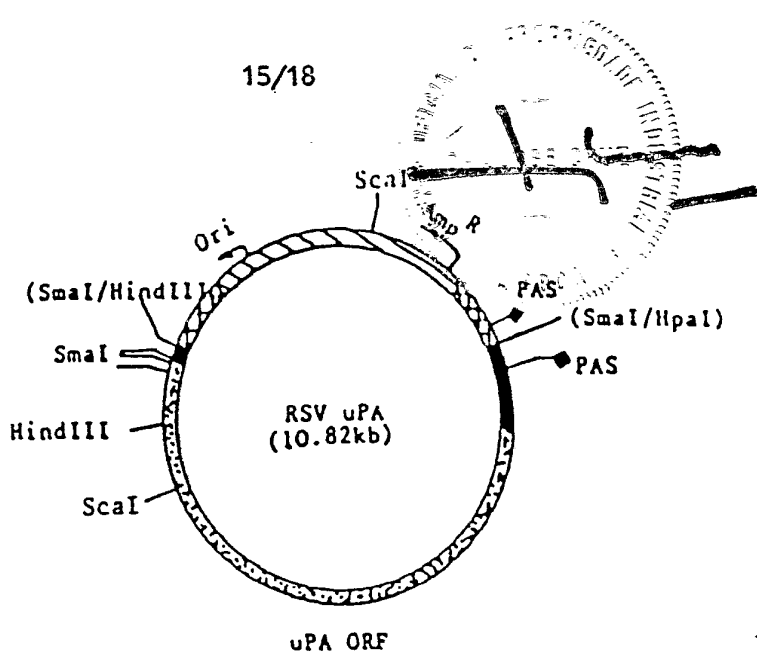


Fig.15

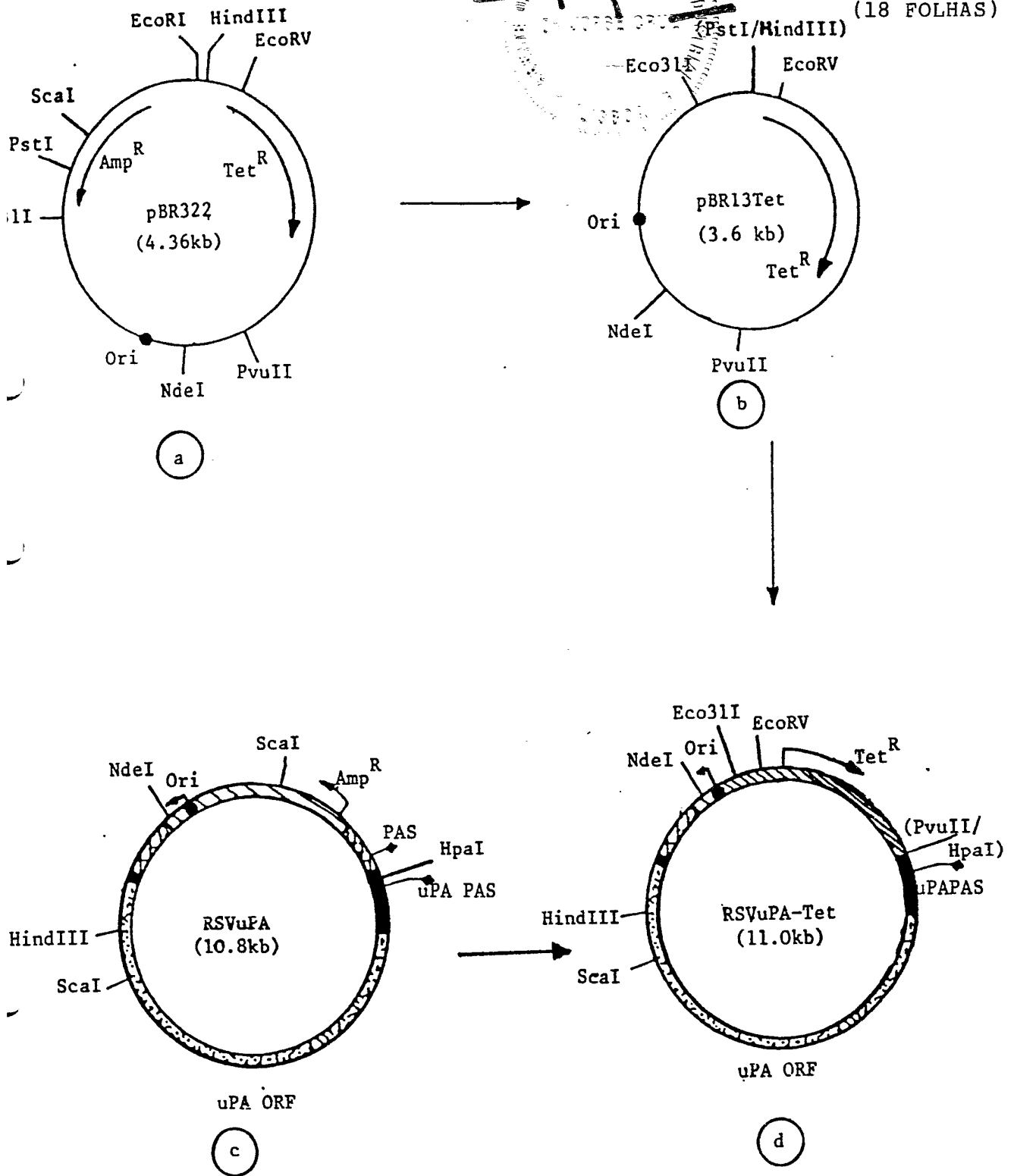


Fig.16

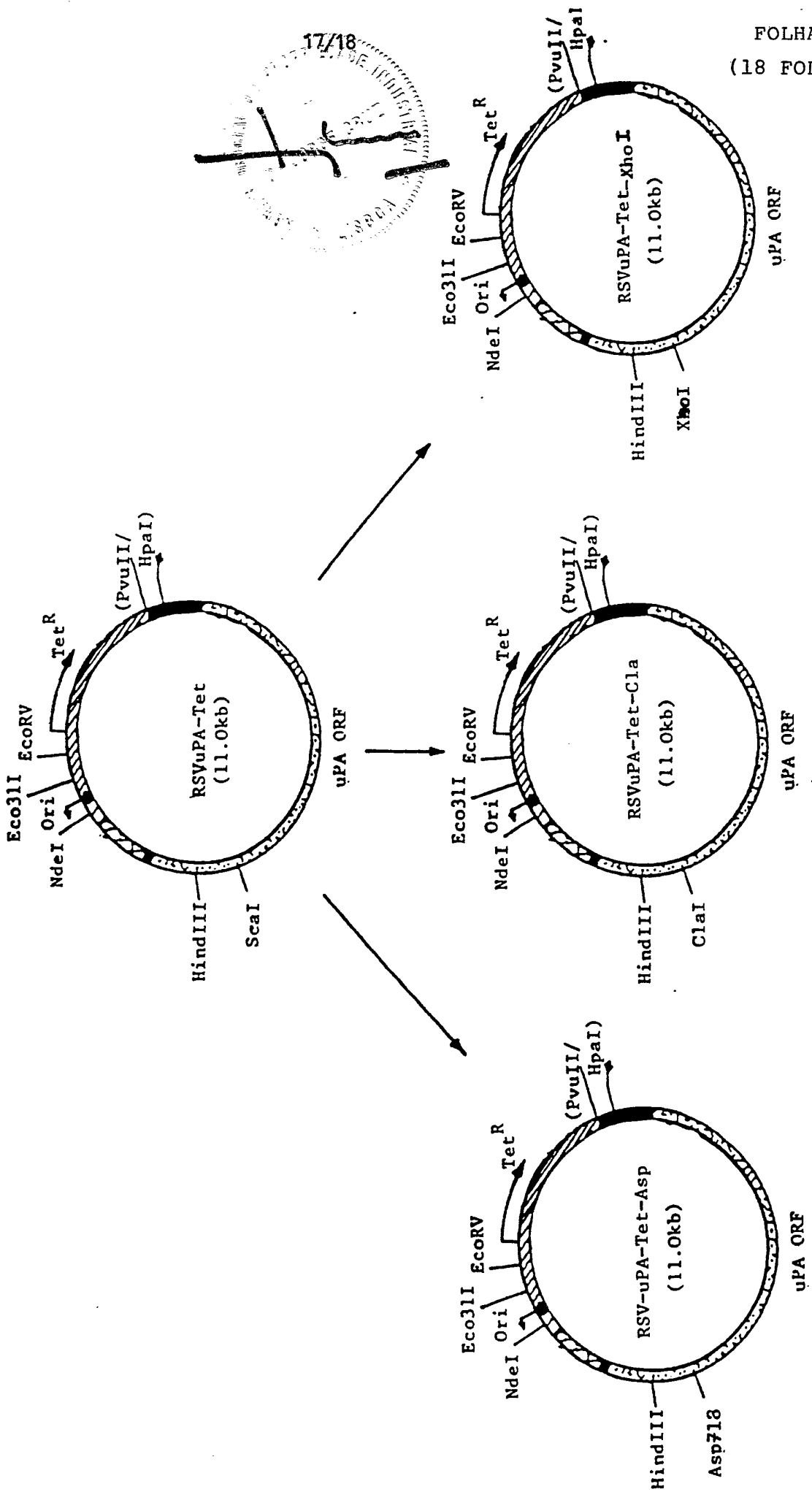


Fig 17

Plasmideo

Sitio modifi-
cado

	20	<u>ScaI</u>	26	
RSVuPA	TTC AAC AAG T		AC TTC TCC AAC	
	Ser Asn Lys T		yr Phe Ser Asn	
	20	<u>EagI</u>	28	
RSV-SAD	TTC AAC AAG TCG G		CC GAC TTC TCC AAC	Asp718(1)
	Ser Asn Lys Ser A		la Asp Phe Ser Asn	
	20	<u>SnaBI</u>	30	
RSV-SVRTD	TTC AAC AAG TCG GTA CGT ACC GAC TTC TCC AAC			Asp718(2)
	Ser Asn Lys Ser Val Arg Thr Asp Phe Ser Asn			
	20	<u>NdeI</u>	28	
RSV-SYD	TTC AAC AAG TCA T		AT GAC TTC TCC AAC	ClaI(3)
	Ser Asn Lys Ser T		yr Asp Phe Ser Asn	
	20	<u>PvuI</u>	30	
RSV-SSIED	TTC AAC AAG TCC TCG ATC GAG GAC TTC TCC AAC			XhoI(2)
	Ser Asn Lys Ser Ser Ile Glu Asp Phe Ser Asn			

- (1) sitio cerse e parcialmente preenchido no derivado RSVuPA-tet
 (2) sitio totalmente preenchido no derivado RSVuPA-Tet
 (3) sitio cerse no derivado RSV-uPA

Fig. 18

Sequência de DNA e de aminoácidos de GASGAS
interrompidos