56.626
TPA

Patente Nº-81231

- R E S U M O -

"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UM ACTIVADOR PLASMINOGÉNEO DE TECIDO UTERINO HUMANO OBTIDO POR MEIO DE ADN RECOMBINANTE"

Descreve-se um processo para a produção de um activador plasminogéneo de tecido uterino humano obtido por meio de um ADN recombinante, designadamente para a produção de um ATP uterino humano, processo esse que compreende a cultura de uma célula transformada com um vector de expressão replicável, susceptível de, na célula hospedeira transformada, expressar uma sequência ADN que codifica um ATP uterino humano activo.

O referido processo abrange a purificação do uATP a partir do meio de células cultivadas que o produz e a sua extracção do referido meio, a produção de um vector de expressão replicável e a utilização de uma célula de ADN recombinante que codifica o ATP humano activo.

Descreve-se, finalmente, a preparação de um ATP humano, activo, ao qual faltam uma ou mais das porções de hidrato de carbono N- ligados de um ATP humano de ocorrência natural.

56.626
TPA

Descrição do objecto do invento que INTEGRATED GENETICS, INC., norte-americana (Estado de Delaware) industrial com sede em 51 New York Avenue, Framingham, Massachusetts 01701 Estados Unidos da América, pretende obter em Portugal, para: "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UM ACTIVADOR PLASMINOGÉNIO DE TECIDO UTERINO HUMANO OBTIDO POR MEIO DE ADN RECOMBINANTE".

O presente pedido constitui, uma continuação parcial de Cha-Mer et al., U.S.S.N. 656.770, pedida em 1 de Outubro de 1984.

O presente invento refere-se à utilização de técnicas de ADN recombinante para a produção de proteínas terapêuticas, em particular à utilização destas técnicas na produção de um activador de plasminogénio de tecido uterino humano da proteína (uTPA).

Rijken et al. (1979) Biochim. Biophys. Acta 580, 140, descreve a purificação parcial a partir de um tecido uterino humano, de uATP, uma enzima zimogénica de cadeia simples, susceptível de ser activada pelo plasma sanguíneo numa forma de 2 cadeias, capaz de dissolver coágulos de fibrina. O uATP é, assim, sem dúvida alguma, útil como composição terapêutica para a dissolução de coágulos em doentes sofrendo de uma variedade de doenças vasculares, em particular enfartes do miocárdio que resultam na formação de coá

gulos dentro e à volta do coração.

As técnicas de ADN recombinantes foram anteriormente utilizadas para se obter mARN a partir de uma linha de células cancerosas (células de melanona de $Bo_{W}es$) e mARN utilizado para produzir CADN codificando TPA de Bowes, tal como se descreve em Goeddel et al. Pedido de Patente Europeia Nº. 0093619.

De uma maneira geral, o presente invento caracteriza uma sequência cADN codificando o TPA uterino humano activo.

Segundo outro aspecto, o presente invento caracteriza um vector de expressão replicável capaz de, numa célula hospedeira transformada, exprimir uma sequência ADN codificando um TPA uterino humano activo e uma célula hospedeira, e.g., uma célula de fermento ou de mamífero, transformada com o vector.

As células transformadas em cultura são utilizadas para produzirem uTPA isento de outras proteínas não humanas, e que pode ser purificado de modo a ser, pelo menos 97 % isento, em peso, de proteínas não uTPA.

O uTPA é purificado num meio de cultura de células de mamífero ou, no caso do fermento, num extracto de material celular, num processo incluindo, facultativamente, uma primeira etapa de extracção da fase líquida/líquida para se eliminar a porção da proteína não uTPA do meio para se produzir uma composição possuindo uma actividade específica aumentada do uTPA.

A etapa de extracção da fase líquida/líquida é efectuada misturando o meio ou extracto de cultura com dois compostos poliméricos diferentes solúveis em água para formar uma mistura de duas fases na qual, pelo menos,65 %, em peso, do uTPA estão presentes numa fase e, pelo menos, 40 %, em volume, de água do meio ou do extracto se encontram presentes na outra fase. A purificação e a concentração podem também incluir as fases de ultra-filtração e/ou

cromatografia por afinidade hidrófoba. De preferência, o método inclui ainda, uma etapa de cromatografia por afinidade na qual o uTPA se liga a um anticorpo anti-TPA.

O uTPA de acordo com o presente invento é codificado por vectores de expressão que, devido à origem do gene (tecido uterino humano normal) simulam uma bio-síntese normal do uTPA em seres humanos (incluindo, de preferência, padrões de glicosilação, quando se utilizam células hospedeiras eucarióticas) para que o produto proteico se comporte naturalmente em doentes humanos.

O presente invento proporciona também TPA's não glicosilados ou parcialmente glicosilados produzidos em células eucarióticas; estes TPA's modificados proporcionam com vantagem, vidas médias mais longas.

Serão, agora, descritas formas de realização do presente invento:

Serão descritos, primeiro, os desenhos:

Desenhos

A Figura 1 é uma representação em forma de diagrama da sequência base do gene TPA uterino humano, incluindo as zonas de flanqueamento ; são indicadas as diferenças entre o gene TPA uterino e o gene TPA do malenona de Bowes.

A Figura 2, é uma representação em forma de diagrama da construção da sequência uTPA cADN completa.

A Figura 3, é uma representação, em forma de diagrama, de um vector de expressão do fermento (Saccharomyces cerevisiae) da invenção.

A Figura 4, é uma representação, em forma de diagrama, de um vector de expressão de outro fermento de acordo com o presente invento.

A Figura 5, é uma representação, em forma de diagrama, da construção de um vector de expressão de ma-

mífero de acordo com o presente invento.

A Figura 6, é uma representação, em forma de diagrama, de um outro vector de expressão de mamífero de acordo com o presente invento.

A Figura 7 é uma representação, em forma de diagrama, de outro vector de expressão de mamífero de acordo com o presente invento.

A Figura 8, é uma representação, em forma de diagrama, da sequência base do gene TPA uterino humano, apresentando pontos da N-glicosilação.

Síntese do cADN de TPA Uterino Humano

O cADN codificando o TPA uterino humano foi produzido e clonado de acordo com os seguintes passos principais:

1) isolou-se o mARN total a partir de tecido uterino humano;

2) enriqueceu-se o mARN de uTPA a partir do mARN total;

3) sintetizou-se o cADN a partir de mARN de TPA para proporcionar uma sequência de cADN de 3' e 5';

4) combinaram-se as sequências cADN de 5' e 3' para proporcionarem a sequência cADN completa num vector plasmídico intermediário.

Isolamento do mARN de uTPA

O mARN de tecido uterino humano foi isolado conforme se descreve a seguir. Trituraram-se cerca de 30 g de tecido uterino humano em 40 ml de uma solução de tiocianato de guanidina contendo tiocianato de guanidina 4M 2-mercaptoetanol 1M, 50 mM de acetato de sódio (pH 5,0) e 1 mM de EDTA num homogeneizador de tecidos. Adicionou-se 1 g de CsCl por ml de produto e centrifugou-se o mesmo a 3000 rpm duran-

te 10 minutos. O produto sobrenadante foi colocado, em camadas, sobre 15 ml de"amortecedor de CsCl" contendo 50mM de acetato de sódio (pH 5,0), 1mM de EDTA e 1,592 g de CsCl por ml de solvente em tubos de 50 ml e centrifugado a 45.000 rpm a 20°C durante 24 horas. Recolheu-se a fase branca contendo o ARN, diluiu-se a solução de CsCl três vezes com água e o ARN precipitou mediante a adição de 2 volumes de etanol, a -20°C. Recolheu-se o precipitado por centrifugação. Eliminou-se qualquer contaminação de CsCl repetindo-se o processo de solubilização e de precipitação. Recuperaram-se cerca de 11 mg de ARN purificado.

Aplicou-se o ARN purificado a uma coluna de afinidade contendo 1 ml de oligo-dT de celulose num tampão com elevado teor de sal (10 mM de Tris (pH 8,0), 0,5 M de NaCl e dodecilsulfato de sódio a 2%) e concentrou-se por precipitação do etanol para produzir 300 ug de ARN concentrado. Dissolveu-se o ARN em 200 l de 0,1M de TrisHCl (pH 7,5), 1mM de EDTA, dodecilsulfato de sódio a 1 % e formamida a 50 % em tubos de SW41. Centrifugaram-se os tubos a 35.000 rpm a 15°C durante 16 horas. Recolheram-se fracções e determinou-se a quantidade do ARN em cada fracção por meio de marcadores internos 4S, 18S, e 28S ^{3}H-rotilados.

Identificaram-se as fracções contendo o mARN de TPA por meio de análise de mancha "Northern" utilizando-se um material gordo ^{32}P rotulada e juntaram-se as referidas fracções. Recuperou-se o mARN do gradiente por diluição com um volume igual de NaOAc 0,4M de pH 5, e precipitou-se com etanol num volume 2,5 vezes superior ao da solução gradiente diluída. Eliminou-se qualquer porção de formamida que ainda pudesse contaminar o ARN recuperado por repetição da solubilização e a precipitação.

Produção de uma sequência 3' de CADN de uTPA

Produziu-se a primeira cadeia do cADN de TPA a partir do mARN isolado, tal como se segue. Num volume

total de 50 µl contendo 50 mM de TrisHCl, pH 8,3 50mM de KCl, 8mM de $MgCl_2$, 1mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 25 µg/ml de oligo-dT_{12-18}, 50 ug/ml de actinomicina D, 30mM de 2-mercaptoetanol, 0,5 mCl/ml dCTP, 50 unidades de RNasin e 40 unidades de transcriptase inversa de AMV, incubou-se o ARN a 37°C durante 1 hora tendo terminado suspenso pela adição de 20 mM de EDTA. A mistura de reacção foi, então aplicada a uma coluna Sephadex G-100 equilibrada com 10mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1mM de EDTA e dodecilsulfato de sódio a 0,1 % e pré-cromatografado com 50 ug de tARN de E. coli.

As fracções contendo o híbrido de mARN-cADN foram reunidos e precipitaram pela adição de etanol. O hibrído recuperado foi tratado com NaOH 2,5N a 37°C durante várias horas, neutralizado com ácido acético glacial e precipitado com etanol.

Eliminaram-se os trifosfatos nucleótidos por meio de uma precipitação em etanol com um elevado teor de sal, da maneira que se segue. Dissolveu-se primeiro o ADN em 20 a 50 µl de água e adicionou-se um volume igual de acetato de amónia 4M. Adicionaram-se, então, dois volumes de etanol e a fusão manteve-se a -70°C durante a noite. Deixou-se que a solução voltasse à temperatura ambiente e centrifugou-se para transformar o ADN em bolinhas. Repetiu-se este procedimento mais duas vezes eas bolinhas foram lavadas uma vez com etanol a 70 %, produzindo uma primeira cadeia purificada do cADN correspondendo a uma porção grande da extremidade 3' do gene TPA.

Utilizou-se a primeira cadeia do cADN numa síntese da segunda cadeia de cADN num volume total de 100µl contendo 50 mM de tampão de HEPES (pH 6,9), 10mM de $MgCl_2$, 2mM de DTT, 70mM de KCl, 0,5 mM de cada, dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Adicionaram-se à mistura 20 unidades de fragmento de polimerase-Klenow de ADN a 15°C durante 20 horas. Extraíu-se o ADN com 1 : 1, v/v, de uma mistura de fenol e clorofórmio e precipitou-se com etanol.

Tratou-se o cADN de dupla cadeia num nuclease Sl para se eliminar estruturas em "gancho de cabelo" num volume total de 100 ul contendo 30 mM de NaOAc (pH 4,5), NaCl 0,3M, 4,5 mM de ZnCl, e 50 unidades de nuclease Sl à temperatura ambiente durante 30 minutos. Suspendeu-se a reacção mediante a adição de EDTA e TrisHCl 1M pH 8,0, para proporcionar concentrações finais de 10 mM e 0,1M, respectivamente. Purificou-se o ADN por meio de uma extracção de fenol-clorofórmio e repetiu-se a precipitação de etanol na presença de um elevado teor de sal, tal como foi anteriormente descrito.

A sequência de cADN, de dupla cadeia, purificada foi clonada da seguinte maneira. O cADN de dupla cadeia foi primeiramente ligado a oligo-dC num volume de reacção de 100 µl contendo 60 mM de cacodilato-O, Tris 0,14 M (pH 7,6), 1mM de ditiotreitol 0,1mM de dCTP e 0,2 µCi/µl $[^{3}H]$ dCTP. Por fim, adicionaram-se dez mM de $CoCl_2$ para uma concentração final de 1mM e adicionaram-se 50 unidades de deoxitransferase terminal a 15°C durante 10 minutos. Suspendeu-se a reacção pela adição de EDTA até 10 mM e dodecilsulfato de sódio até 0,1 % e diluiu-se duas vezes com água. A mistura de reacção foi, então, submetida a uma electroferase de gel em agarose e recuperou-se o cADN de 500 bp, ou superior, a partir do gel.

O cADN ligado a oligo-dC foi temperado para se converter num ADN de pBR322 ligado a oligo-dG que tinha sido linearizado com PstI num volume total de 0,5 ml contendo 15 mM TrisHCl (pH 7,5), 150 mM de NaCl, elmM de EDTA a 65°C durante 10 minutos, e depois a 42°C durante 2 horas. O ADN temperado foi utilizado para transformar 2,5 ml de células de E, Coli eficazes (MC1061) que tinham sido previamente tratadas com $CaCl_2$ e mantido comgelado. Manteve-se a mistura das células e do AND em gelo durante 20 minutos, submeteu-se a um choque térmico durante 7 minutos a 37°C e, depois, incubou-se com 20 volumes de um caldo L a 37°C durante 45 minutos e co-

locaram-se em placas contendo 15 ug/ml de tetraciclina.

Transferiram-se os clones recombinantes para filtros de nitrocelulose e colocou-se um conjunto de filtros nas placas de tetraciclina para se armazenarem clones viáveis. Colocou-se um segundo conjunto de filtros contendo clones de replicação recombinantes em placas de cloranfenicol a 37°C durante a noite para uma amplificação do plasmídeo. Os filtros foram preparados para exporem o ADN. Efectuou-se uma pré-hibridização dos filtros numa solução contendo formamida a 50 %, 3XSSC, 5X Denhart's, dodecilsulfato de sódio a 0,1 % e 100 ug/ml de tARN de E. coli a 42°C durante 2 horas ou mais. O material de ensaio ^{32}P rotulado contendo uma sequência cAND de TPA foi adicionado à solução de pré-hibridização e deixado hibridizar com ADN em filtros a 42°C durante 18 horas ou mais. Lavaram-se, então, os filtros quatro vezes em 3XSSC, SDS a 0,1 % a 65°C durante 30 minutos e, mais uma vez, com 3XSSC à temperatura ambiente durante 30 minutos. Secaram-se os filtros ao ar e, depois, exposeram-se a uma película de raio-X da Kodak XAR-5 com um filtro de intensificação a -70°C durante 16 horas.

Foram isolados 10 clones presumivelmente positivos, sub-clonados e filtrados de novo pelo método anteriormente descrito. Apenas se analizaram os clones que apresentavam, repetidamente, sinais positivos mediante cisão da endonuclease de restricção. O clone designado por pUPA 327 continha o maior cADN inserido, 2.15kb.

Produção de uma Sequência 5' de cADN de uTPA

Uma vez que nem o maior clone do cADN continha a sequência de codificação inteira em relação ao uTPA, utilizou-se a estratégia seguinte para se isolar a sequência 5' ausente. Isolou-se o mARN de acordo com o anteriormente descrito, salvo quanto à escolha da dimensão. Sintetizou-se, então, o cADN de primeira cadeia pelo método primário de extensão, como se segue. O fragmento PstI de 72bp

do cADN de TPA (nucleótidos 552-624) foi temperado com o mARN numa mistura de reacção de 100 ul contendo formamida a 80 %, 10mM de tampão PIPES (pH 6,4), NaCl 0,4M, 0,25 ug de fragmento de 72 bp e 70 ug de mARN. Aqueceu-se a mistura até 85°C durante 5 minutos e incubou-se a 50°C durante 20 horas para hibridização. O híbrido de ADN-RNA foi recuperado do tampão mediante 3 diluições com água e precipitação com etanol a -20°C durante a noite. Repetiram-se a solubilização e a precipitação do mARN uma vez mais para se eliminar a contaminação. As condições em relação à síntese do cADN de primeira cadeia eram as mesmas que as utilizadas na sequência 3', excepto no facto de se ter omitido o oligo--dT.

O segundo cADN de cadeia foi sintetizada utilizando-se um pentadecâmero sintético, CTGTGAAGCAATCAT, como primário (nucleótidos 1-15) em relação ao fragmento de polimerase I-Klenow do ADN. Temperaram-se quinhentos ug de pentadecâmero com primeiro cADN de cadeia em 100 ul contendo 50 mM de tampão HEPES (pH 6,9), 10 mM de $MgCl_2$ e 70 mM de KCl a 65°C durante 5 minutos, de 65°C a 43°C durante 15 minutos, 43°C durante 15 minutos e a mistura foi, então, mantida em gelo antes de ser utilizada. Sintetizou-se e clonou-se um cADN de dupla cadeia, de uma maneira essencialmente idêntica à descrita anteriormente em relação à sequência de 3'.

Após pulranização peneiração e sub-clonação identificou-se um clone, designado por pUPA432, que continha a sequência de codificação de 5' ausente e que foi sobreposto com o clone pUPA372 por 60 bp.

Construção de cADN de uTPA de Comprimento Total

Antes da construção o clone de cADN inteiro codificando o gene TPA uterino humano dispuseram-se em sequência as porções 5' e 3' do gene. Isto foi feito analisando o clone pUPA432 (sequência de codificação 5') e pUPA372 (sequência de codificação 3'), utilizando uma combi-

nação do método de degradação química Maxam-Gilbert e o método de terminação da cadeia dideoxinucleótida Sanger. A sequência nucleótida resultante é apresentada na Figura 1.

Depois de determinada a sequência do gene, foi construído um gene cADN completo, tal como ilustra a Fig. 2. O plasmídeo pUPA432 (sequência 5') foi primeiro digerido com uma combinação de BglI e BglII. O fragmento BglI - BglII 400 bp foi isolado a partir da poliacrilamida gel e digerido ainda com HaeIII até uma realização parcial. O fragmento Bgl II-Hae III resultante (nucleótidos 117-387) foi purificado por electroforese de gel de poliacrilamida. O fragmento PstI-NarI (nucleótidos 321-448) foi isolado por combinação da digestão de PstI e NarI e subsequente electroforese em gel. Este fragmento foi ainda digerido com HaeIII para produzir o fragmento HaeIII-NarI 61 bp. Ambos os fragmentos BglII-HaeIII-NarI foram clonados em pBR322 linearizado por combinação da digestão de BamHI e NarI. A partir do clone resultante, designado por pUPA-BglII/NarI, isolaram-se o fragmento BglII-Nar (nucleótidos 117-448) e os fragmentos maiores BglII-SalI.

No plasmídeo pUPA372 , o local de BglII no nucleótido 2091 foi convertido num local de SalI por digestão do plasmídeo com BglII, formando extremidades embotadas com polimerase I de ADN, adicionando agentes de ligação SalI e, depois, produzindo pUPA372-SalI por clonação em E. coli. Uma subsequente cisão de pUPA372-SalI mediante uma dupla digestão de NarI e SalI produziu um fragmento NarI-SalI (nucleótidos 448-2091).

Depois, a sequência principal do cADN de TPA uterino foi construída a partir de pUPA432 mediante eliminação da extremidade G-C e introdução da porção SalI. Esta porção SalI foi introduzida por isolamento do cADN a partir de produtos de digestão de PstI, cisão da região 5', não transferida, com SfaN1 formação de extremidades embotadas com polimerase I de ADN, adição de um agente de ligação

SalI, digestão com uma combinação de SalI e BglII e clonação num vector pBR322 linearizado com uma digestão dupla de BamHI e SalI. O TPA uterino construído principal foi lançado no vector por meio de uma combinação de a digestão de XhoII e SalI.

Este fragmento SalI-BglII (nucleótidos 7-117) foi unido ao fragmento SalI-BglII (nucleótidos 117-2091) formado pela ligação dos fragmentos BglII-NarI, NarI-SALI e BglII-SalI atràs descritos.

Após ligação e transformação, o gene TPA uterino de comprimento total flanqueado pela porção de SalI foi clonado num vector pUC9. Este plasmídeo pUC9-uTPA foi utilizado como intermediário em mais uma construção de vectores de expressão.

Vectores de Expressão de Fermento

Podem produzir-se vectores de expressão de fermento nos quais um promotor de fermento e sequência de sinal precedem a porção do cADN de uTPA codificando a proteína madura (e excluindo o sinal de uTPA) ou, como variante, o vector pode incluir um promotor de fermento, mas nenhum sinal de fermento, de forma que o cADN de uTPA codifica, a proteína imatura, incluindo o sinal de TPA. Por outras palavras, a sequência do sinal pode ter origem quer num fermento quer no uTPA. Excepto em relação ao facto dos vectores particulares descritos adiante exprimirem uTPA activo, em vez de outras proteínas, foram produzidos de acordo com métodos semelhantes aos descritos no Pedido de Patente N.A. de Lemont et al., Nos. de Série 636.365 e 629.202, incorporados no presente invento a título de referência. Assim, apenas serão apresentadas as estruturas dos vectores, não os pormenores da sua construção.

Vector Contendo o Sinal de Fermento

O vector de expressão do fermento, pYBDT-6,

referido na Fig. 3, é composto pelos seguintes fragmentos de ADN (começando na única porção de BamHI e movendo-se em sentido contrário ao dos ponteiros do relógio):

BamHI-BglII, contendo o promotor pH05 de fermento e as sequências de sinal, mais 9 pares de bases da sequência ADN sintética sendo o código de sequência Cly(-6), Ala (-5), Arg (-4), tal como mostra a Fig. 1; este fragmento tem cerca de 0,6 kb de comprimento.

BjlII-SalI, contém o cADN de TPA uterino, descrito atrás; este fragmento codifica a proteína madura e contém, também, cerca de 0,4 kb de região 3' não transferida; este fragmento tem cerca de 1,975 kb de comprimento.

SalI-(SalI/XhoI), contém uma região "terminadora" de TRP1 que, originariamente, era o fragmento HindIII--BjlII do gene TRP1; este fragmento tem cerca de 0,240 kb de comprimento.

(SalI/XhoI)-XhoI, contém o fragmento EcoRI--BglII do gene TRP1.

XhoI-XhoI; este é um fragmento de pBR322 contendo AMP^R e ORI; este fragmento de 2,1 kb corresponde, grosseiramente, à região de pBR322 da posição 2246 à posição 4361 no mapa do pBR322.

XhoI-BamHI; este fragmento é o fragmento de EcoRI com, aproximadamente, 2,2 kb do círculo de 2-microns, forma "B".

Vector Contendo O Sinal de TPA

O vector pYBDT-10 de expressão de fermento, referido na Fig. 4, é idêntico ao pYBDT-6, excepto no que se refere a dois fragmentos:

1) em vez do fragmento BamlII-BglII, o pYBDT-10 tem o BamHI-SAlI, que contém uma região do promotor PH05 no qual o local de inserção 3' foi ligado a SalI; este fragmento tem cerca de 0,52 kb de comprimento.

2) em vez do fragmento BglII-SalI, o pYBDT-

-10 tem SalI-SalI que contém o cADN de TPA uterino, codificando a proteína imatura, incluindo o sinal.

Vectores de Expressão de Células de Mamífero

Além dos vectores de expressão do fermento, podem preparar-se vectores de expressão de mamíferos para a produção de TPA uterino humano. Tal como no caso do fermento, pode utilizar-se uma variedade de fragmentos de ADN auxiliares para efectuar a transcrição e a transferência do ADN do TPA uterino, bem como a transformação da célula hospedeira.

Vão-se descrever agora vectores de expressão particulares para a produção de TPA uterino humano em células de mamífero de cultura. Os vectores descritos são mantidos na estirpe RF322 de E. coli antes da sua utilização na transformação em células hospedeiras de mamíferos.

Plasmídeo CL28-uTPA-BPV

O vector CL28-uTPA-BPV de expressão de mamífero, a que se refere a Fig. 5, no qual o gene uTPA se encontra sob o controlo do promotor de metalotioneina do rato (MT) e a transformação das células hospedeiras é efectuada pelo vírus do papiloma de bovinos (BPV), é construído da seguinte maneira.

Os dois plasmídeos de partida são pUC9-uTPA (contendo o gene TPA; descrito atrás) e pCL28-Xho, um derivado de pCL28 (descrito, como pJYmmT(E), em Hamer et al., (1983) J. Mol. Applied Gen. 1, 273) no qual se eliminou o ADN de SV40 e no qual um local de restrição de XhoI, de preferência ao local de BglII, se posiciona perto do promotor MT.

O plasmídeo pUC9-uTPA foi digerido com SalI e o fragmento de 2098 bp contendo o gene uTPA foi inserido no local de XhoI do pCL28-Xho para formar o pCL28-uTPA, no

qual o gene uTPA se encontra entre o promotor MT e o gene estrutural de MT.

Na fase seguinte, o plasmídeo pB2-2, contendo o genoma de BPV inteiro, foi digerido com BamHI e SalI para produzir um fragmento contendo o genoma de BPV inteiro e uma região de ADN de pBR322. Este fragmento foi inserido em pCL28-uTPA que tinha sido linearizado por digestão com BamHI e SalI, para produzir o plasmídeo pCL28-uTPA-BPV.

Plasmídeo pBMTH-uTPA

O vector de expressão de mamífero BMTH-uTPA, a que se refere a Fig. 6, foi construído utilizando-se CL28-uTPA, atrás descrito, e pBMTH1, obtido a partir de Dean Hamer dos Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda, Maryland. O plasmídeo pBMTH1 contém o gene estrutural de MT e o promotor MT flanqueado num dos lados por 69% da porção transformada de BPV e, no outro lado, pelos 31% remanescentes de BPV.

O fragmento HindIII de pBMTH1, contendo o gene MT, foi eliminado e substituído pelo fragmento HindIII do pCL28-uTPA contendo o gene uTPA inserido no gene MT, para produzir o plasmídeo pBMTH-uTPA.

Plasmídeo pCAT

O plasmídeo pUPA372 (plasmídeo do cADN de TPA uterino contendo as sequências uTPA partindo de 372 bp, e o que resta da sequência, tal como mostra a Fig. 1) referindo-se à Fig. 7, foi separado com BglII e EcoRI e ligado a ADN de SV40 viroso separado com BclI e EcoRI. A mistura da ligação foi clonada na porção EcoRI de pBR322 para obter o plasmídeo pTPA-A.

Para se alterar a orientação da transcrição de uTPA, o plasmídeo pCL28-uTPA (Fig. 5) foi separado de HindIII e ligado de novo a uma concentração elevada de ADN. Após peneiração por corte com EcoRI e BamHI, foi escolhido o

plasmídeo pCL28XTH3.

pTPA-A e pCL28XTH3 foram ambos digeridos com SmaI e BamHI e ligados para se obter CL28XTH3A que contém um fragmento de ADN de SV40 com 237 bp substituindo um fragmento de metalotioneino de 1,5 kb em pCL28XTH3. Nesta construção, a expressão do uTPA depende da utilização do promotor MT e, a jusante do gene uTPA (sendo eliminado o gene estrutural de MT) sequências isoladas de sinal de SV40 poli A.

Os plasmídeos pCL28XTH3A e pB2-2 (descritos atrás) foram separados de BamHl e SalI e o ADN de BPV do pB2-2 foi inserido como fragmento BamHI-SalI. O produto construído resultante foi pCAT.

Transformação de Células de Mamífero

O ADN dos plasmídeos pCL28-uTPA-BPV ou pBMTH-uTPA foi introduzido em células C127 de rato utilizando uma alteração da técnica de "transfecção" de Wigler et al., (1977) Cell 11 223, como se segue.

Adicionaram-se 5 µg de ADN a 0,5 ml de uma solução de 240mM de $CaCl_2$ contendo 10 µg de ADN do esperma do salmão como veículo. Esta solução foi borbulhada para dentro de um volume igual de 2xHBS (280mM de NaCl, 20mM de Hepes e 1,5mM de fosfato de sódio) com um pH de 7,1. Deixou-se que se formasse fosfato de cálcio durante 30 minutos à temperatura ambiente e 5 x 10^5 C127 células foram galvanizadas durante 24 horas antes da "transfecção". Enquanto o precipitado de fosfato de cálcio se formava, o meio de crescimento da célula ia-se alterando. O precipitado de fosfato de cálcio foi adicionado às células e incubado durante 6-8 horas a 37° C. O ADN foi eliminado e as células foram expostas ao glicerol a 20% numa solução salina tamponada de fosfato (PBS), pH 7, durante 1-2 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS e 10 ml de meio de Dulbecco alterado com soro fetal de vitelo a 10% (MA Biologicals), adicionaram-se penicilina/estreptomicina e 10mM de glutamina (GIBCO). O meio

foi mudado 24 horas depois e, a partir daí, todos os 3-4 dias. Após 14-21 dias podia-se detectar a presença de focos que foram isolados pelo método do anel de clonação 21 dias depois. Foram expandidos focos para análise.

Cultivaram-se células transformadas utilizando técnicas convencionais e recolheu-se o uTPA continuamente do meio de cultura utilizando técnicas convencionais.

Células C127 de rato transformadas contendo pCL28-uTPA-BPV ou pBMTH-uTPA podem existir durante até 60 dias numa cultura celular confluente se os meios forem mudados todas as 24-28 horas. As células duplicam-se continuamente, no balão ou no frasco, com características de crescimento das células transformadas. As células C127 transformadas contendo pCAT existem na cultura celular durante menos tempo mas produzem uTPA a uma velocidade superior.

A combinação de um promotor de metalotioneina forte controlando a produção de uTPA no vector BPV (o que permite a amplificação do número de cópias do ADN) e as propriedades de crescimento contínuo das células transformadas de BPV proporcionam um sistema óptimo para aumentar o nível de produção do uTPA.

Transformação de Células de Fermento

Células de fermento hospedeiras (Saccharomyces cerevisiae) foram transformadas utilizando vectores de expressão de fermento de acordo com técnicas padrão, como se descreve, em geral, em Beggs (1978) Nature 275, 104-109. As células hospedeiras transportam uma mutação trp1 que provoca a auxotrofia de triptofano, enquanto que os plasmídeos transportam um gene funcional de TRP1. Os materiais transformantes são escolhidos, assim, como prototrofos triptofanos. Cultivaram-se células hospedeiras de fermento transformadas num meio de cultura de fermento padrão utilizando, de um modo geral, o método descrito em Botstein e Davis, "Principles and Practice of Recombinant DNA Research With Yeast"

na Biologia Molecular do Saccharomyces do Fermento: Metabolism and Gene Expression, pp. 607-636, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.

Em vez de utilizarem plasmídeos circulares pYBDT-6 e pYBDT-10 na transformação das células hospedeiras de fermento, estes vectores podem ser linearizados antes da transformação utilizando-se XhoI, que elimina a sequência de pBR322 e o vector linearizado utilizado para a transformação; a recirculariza̧ção ocorre dentro da célula hospedeira de fermento. Este procedimento possui a vantagem de eliminar todas as sequências bacterianas que potencialmente possam reduzir o número de cópias do vector ou, de outro modo, interferir com a expressão do uTPA.

Extracção e Purificação do uTPA a partir de Meios de Cultura

O TPA uterino activo produzido por fermento é recuperado de extractos preparados por disrupção mecânica das células utilizando contas de vidro de TPA uterino activo produzido por células de mamífero recombinantes e é recuperado a partir do meio de cultura de células hospedeiras. A purificação do uTPA activo a partir dos extractos ou meios de cultura celular envolve, geralmente, as seguintes etapas 1) extracção da fase líquida/líquida ou uma etapa de filtração inicial 2) cromatografia por afinidade hidrofóbica; 3) cromatografia por afinidade do anticorpo e 4) cromatografia por filtração em gel. Mais pormenorizadamente, estas etapas são efectuadas da seguinte maneira:

Extracção da Fase Líquida/Líquida

A primeira etapa pode ser a extracção da fase líquida/líquida ou, mais preferivelmente, uma etapa de filtração inicial. Em geral, a extracção da fase líquida/líquida é efectuada combinando o meio de cultura com dois com

postos poliméricos solúveis na água, e.g., Dextran e polietileno glicol, que dão origem à formação de duas camadas, uma das quais é desprezada. (a extracção da fase líquida/líquida é uma técnica de extracção de proteínas bem conhecida descrita e.g., em Johansson et al. (1973) Eur. J. Biochem. 33, 379-386).

A fase de extracção da fase líquida/líquida preferida envolve a diluição de um meio isento de soro ou com soro contendo uTPA até 0,1% v/v, com Tween 80 e, depois, a adição de Dextran em pó para uma concentração final de 4% (40 g/litro).

O Dextran é misturado até que em solução e, depois de se adicionar polietileno glicol (PEG) 6000 se atingir uma concentração final de 12% (120g/litro). A solução é bem misturada e, depois, é centrifugada em balões de 200 ml a 1200 RPM numa centrifugadora refrigerada International durante 10 minutos para efectuar a separação da fase. A fase superior é decantada e a fase do Dextran inferior reunida. Conseguiram-se recuperar 75% da actividade inicial do uTPA com aproximadamente 40% da proteína total. Conseguiu-se uma concentração de 6 vezes maior com uma redução do volume superior a 50%. Verificou-se que o processo de extracção líquido/líquido era eficaz, apesar da presença de resíduos celulares e de factores de crescimento complexos, e.g. Factor do Crescimento Epidérmico, transferina e insulina, usualmente encontrados em meios de crescimento contendo soro.

Verificou-se que, embora a etapa de extracção líquido/líquido atrás descrita possa ser utilizada, os meios condicionados podem ser inicialmente clarificados para a etapa seguinte de cromatografia por afinidade hidrofóbica, numa maneira mais simples, passando os meios condicionados através de um filtro de perfil de três microns. Os meios clarificados resultantes são, então, submetidos, sem a etapa de concentração, a uma cromatografia por afinidade

hidrofóbica, da seguinte maneira.

Cromatografia por Afinidade Hidrofóbica

Esta etapa envolve a ligação do uTPA no material obtido na etapa anterior, a um corante, e.g., Azul de Trisacrilo (LKB) Azul Macrosorb ou azul de CM Affi-Gel (Bio-Rad) capaz de ligar o uTPA mas não algumas das outras proteínas existentes no meio de cultura. O (Azul Affi-Gel tem sido utilizado num esquema diferente de purificação em relação a um activador plasminogénio isolado a partir de uma linha de neurablastoma humano, juntamente com uma precipitação de $(NH_4)_2$ SO_4 e cromatografia de p-aminobenzamidina-Sepharose; Biochim. Biophys. Acta (1980) 704, 450-460).

Esta etapa é efectuada, de preferência, da seguinte maneira. Se, na primeira etapa se efectuou a extracção líquido/líquido, o volume da fase Dextran da etapa anterior é duplicado mediante a adição de H_2O para reduzir a viscosidade. Caso contrário, são utilizados os meios filtrados sem diluição ou concentração. Adicionam-se, por litro, cinquenta ml de matriz de azul de Trisacrilo (LKB) equilibrada com uma solução salina tamponada de fosfato, Tween a 0,1% pH 7,2. Mistura-se a solução suavemente a 4° C durante 2 horas e, depois, lava-se, por porções, com uma solução salina tamponada de fosfato Tween, a 0,1%, pH 7,2 e NaCl 0,5M, Fosfato 0,02M, Tween a 0,01%, pH 7,2. O material contendo o TPA é, então, despejado numa coluna de filtração com gel com um factor de carga de 50% e tratado a uma velocidade linear de 85 cm/hora. O material é eluído a partir da matriz de azul de Trisacrilo com KSCN 3,0M Fosfato 0,02M, Tween 0,01% pH 7,2.

Alcançou-se, com esta etapa, uma concentração quatro vezes superior à das etapas anteriores. Esta ligação do uTPA a partir directamente da fase de Dextran permite também uma mudança rápida na concentração de sal e aumenta o grau de pureza do uTPA.

Em vez de se utilizar KSCN 3M para a etapa de eluição anterior, podem utilizar-se outros sais, e.g., NaCl. Por exemplo, um gradiente de NaCl de 0,15 a 3,0M proporciona um grau superior de purificação, mas à custa da concentração.

Tal como mencionado anteriormente, nesta etapa podem utilizar-se outras matrizes, além do azul de Trisacrilo. Um exemplo é o azul de CM Affi-Gel (Bio Rad) que liga igualmente bem o uTPA e elui o uTPA da mesma maneira que o azul de Trisacrilo.

As concentrações dos reagentes podem variar em cada estádio das duas etapas de purificação anteriores. Por exemplo, as concentrações de Dextran e de PEG utilizadas na etapa de extracção líquido/líquido podem mudar de modo a deslocar a actividade do uTPA para a fase PEG (superior), em vez da fase de Dextran (inferior); neste caso, o material decantado será poupado e a fase inferior desprezada.

Cromatografia por Afinidade

A etapa seguinte, na qual é alcançado o grosso da purificação, envolve uma cromatografia por afinidade utilizando anticorpos anti-TPA imobilizados numa coluna de suporte sólido. Podem utilizar-se anticorpos anti-TPA policlonais ou monoclonais obtidos de acordo com técnicas convencionais.

A etapa de cromatografia por afinidade, preferida, é efectuada da maneira que se segue. O material eluído a partir da matriz de Trisacrilo é dializado em função da NaCl 1,0M, Tween a 0,01%, fosfato 0,02M, pH 7,4, para se retirar o KSCN. O material é então filtrado isento de micróbios vivos através de um filtro de 0,22 microns. O eluente é, então, passado muito lentamente, a 4° C, numa matriz de Sepharose do anticorpo anti-TPA monoclonal (O anticorpo foi obtido do Dr. Keld Dano, Instituto de Anatomia Patalógica da Universidade de Copenhaga) susceptível de ligar toda a

actividade do uTPA contido no eluente. (Os anticorpos monoclonais de anti-TPA encontram-se à disposição no comércio em Bioscott, Lda, Scotland ou American Diagnostica). O anticorpo é acoplado a Sepharose CNBr activada, para 5 mg de anticorpo/ml de resina, numa coluna de 100 ml. A matriz do anticorpo é previamente equilibrada em Tris 0,1M, Triton X--100 a 0,1%, pH 8,0, lavada com NaCl 1,0M, Triton X-100 a 0,1%, Tris 0,05M, pH 8,0 e eluída com NH_4SCN 3,0M, Triton X-100 a 0,1%, Tris 0,05M, pH 8,0. (O Triton X-100 na etapa final pode ser substituído por Tween 80 obtendo-se resultados semelhantes). A eluição é efectuada a uma velocidade linear de 12 cm/hora, proporcionando uma recuperação superior a 90%. Recolhem-se fracções de um ml e a maior parte da actividade do uTPA é eluída nos primeiros 3 a 4 volumes da coluna.

O material contendo o uTPA pode ser aplicado à matriz Sepharose de anticorpos numa solução salina e numa concentração de até 1,5 M de NaCl, sem afectar a eficácia da ligação. O uTPA pode ser eluído fazendo baixar o pH para cerca de 2,5 com, e.g., glicina 0,1M , em vez de se utilizar NH_2SCN 3M, mas prefere-se NH_2SCN porque permite a recuperação do uTPA num volume mais pequeno, uma vez que não é necessária qualquer neutralização. O NH_2SCN mantém, também, a proteína num meio mais estabilizante.

Seguindo-se a etapa de afinidade do anticorpo, pode efectuar-se uma etapa hidrofóbica ou de dimensionamento de HPLC para se aumentar o grau de pureza para mais de 97%.

Cromatografia por Filtração com Gel

Esta etapa elimina alguns agentes de contaminação menores de elevado peso molecular presentes no eluato da coluna de afinidade imunológica. A coluna de afinidade com gel é comprimida com Toyopearl TSK e efectuada em fosfato 0,01M - NH_4 SCN 1,6M e verificada quanto ao A_{280} e quan-

to à actividade. As fracções ao longo dos pontos máximos são seguidamente analisadas por electroforese com gel, seguida por mancha de prata. Efectuam-se manchas "Western" em porções reunidas escolhidas.

Purificação Controlada

A purificação é controlada ao longo do processo atrás descrito, da seguinte maneira. Diluiram-se amostras de fracções de cada estádio com NaCl 0,5M, Tween a 0,01%, fosfato 0,02M, pH 7,4 e ensaiou-se a actividade amidolítica com um substracto cromogénico de S2251 acoplado a um activador de plasminogénio humano na presença de fibrinogénio (descrito em Campbel et al. (1982) Clin. Chem. 28, 1125-1128). Registou-se o grau de absorção a 280 nm das amostras diluídas com dH_2O. Controlou-se também a purificação mediante a não redução e a redução de electroforese em gel de poliacrilamida SDS.

O uTPA purificado recuperado da coluna de anticorpo/Sepharose apresentou um grau de contaminação inferior a 3% em electroforese SDS PAGE. Sob condições de redução, observou-se o mesmo TPA de 2 cadeias (a forma activada; a forma de cadeia única é a preferida). A forma de 2 cadeias pode ser evitada adicionando Aprotinina aos tampões utilizados nas fases de purificação.

Caracterização de TPA Uterino e cADN de TPA Uterino

Tal como mencionado anteriormente, a Fig. 1 apresenta uma sequência nucleótida de cADN de TPA uterino, juntamente com uma sequência aminoácida deduzida do TPA uterino codificado pelo cADN. A preprosequência experimental corresponde a aminoácidos -38 a -1. As linhas verticais na Fig. 1 precedendo os aminoácidos +1, -3 e -6 indicam locais de cisão. Os situs de glicosilação potencial são indicados por "CHO" nos resíduos de Asn. O local de cisão do plasma

(no qual o uTPA de cadeia única é convertido no uTPA de 2 cadeias) é indicado pela seta. A sequência conservada de proteases de serina no centro activo encontra-se sublinhada.

A Fig. 1 mostra a diferença, na sequência nucleótida, entre cADN de TPA uterino e o cADN de melanoma de Bowes descrito no Pedido de Patente Europeia Nº. 093.619 de Goeddel et al, descrita anteriormente. Nas posições em que falta o ADN de Bowes, um nucleótido presente no cADN uterino está marcado com "X". As posições em que falta o cADN uterino, os nucleótidos presentes no cADN de Bowes estão indicados por um "/", seguido pelos nucleótidos que faltam.

TPA's parcialmente Glicosilados e Não Glicosilados

Tal como descrito no Sumário do Presente Invento, apresentado atrás, o presente invento proporciona, além do TPA uterino humano produzido por ADN recombinante, TPA's codificados por vectores de expressão que não são totalmente glicosilados quando produzidos em células hospedeiras de mamíferos.

Um TPA humano de ocorrência natural, ao qual se refere a Fig. 8, é N-glicosilado em três resíduos de asparagina na molécula (posições 120, 187 e 451). O sinal para uma glicosilação N-ligada é Asn-X-(Ser ou Thr). A estratégia utilizada para evitar a glicosilação num ou mais destes locais envolvia a substituição, naqueles locais, na molécula ADN codificando o TPA, de um còdão CAA (glutamina de codificação) por AAC ou AAT (asparagina de codificação). Tal como a seguir será descrito mais pormenorizadamente, estes locais mutantes (A, B e C na Fig. 8) foram construídos por mutagénese in vitro utilizando os primários desemparelhados TCGGTGACTGTTCCTTTGAAGTAAATGTTGT, CAACGCGCTGCTTGCCAGTTGGTGCA e GTAGGCTGACCCTTGGCCCAAAGTAGCA, respectivamente.

Quando se utiliza, como padrão, o ADN de ca

deia simples do mutante A, constroem-se também os mutantes A + B, A + C, e A + B + C. Finalmente, os mutantes B e C recombinantes produziram os mutantes B + C. Assim, construiram-se as sete combinações possíveis de mutantes de TPA humano não glicosilado ou parcialmente glicosilado.

Mutagénese Específica no Local

Efectuou-se uma mutagénese no local *in vitro* utilizando-se uma alteração do método anteriormente descrito primeiramente em Smith et al. (1979) Gene 8, 81-87, 99-106, da seguinte maneira.

Os primários oligonucleótidos desemparelhados descritos anteriormente foram sintetisados num sintetisador automatizado de Biosistemas Aplicados utilizando técnicas convencionais.

O ADN codificando o TPA uterino humano (anteriormente descrito) foi clonado em M13mp18 (à disposição em Pharmacia ou New England Biolabs). O ADN de cadeia único contendo a cadeia sensorial do TPA foi utilizado como padrão para uma mutagénese dirigida do oligonucleótido. Cada primário oligo-nucleótido desemparelhado foi temperado para se converter no padrão a 65° C durante 10 minutos e, depois, à temperatura ambiente durante 10 minutos numa mistura de reacção contendo 20 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM de $MgCl_2$, 50 mM de NaCl, 1 mM de ditiotritol, 0,2 pmoles de ADN mp18-TPA de cadeia único, e 20 pmoles de oligonucleótido desemparelhado 5' fosforilado. Adicionou-se, então, à mistura de reacção a temperar um volume igual de um tampão PE contendo 30 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM de $MgCl_2$, 2 mM de mercaptoetanol, 1 mM cada de dATP, dCTP, dGTO, dTTP e 1 mM de ATP. Um aumento do primário foi efectuado pela adição de 5-10 unidades de um fragmento de polimerase Klenow de ADN e 3-5 unidades de ligase T4 com incubação a 16° C durante a noite.

A mistura de reacção foi diluída e utilizada para transformar células JM105 eficazes. As placas foram pe-

neiradas in situ por uma hibridização mutagénica de placas de oligonucleótidos, utilizando um primário desemparelhado rotulado ^{32}-P para triar os mutantes desejados; este método baseia-se no facto de um mutante desejado ser perfeitamente emparelhado com o primário, ao passo que o ADN de tipo selvagem contém um ou mais desemparelhamentos. Assim, em condições apropriadas de hibridização, o grau em que o primário desemparelhado hibridiza com o mutante é superior ao do tipo selvagem, e esta diferença torna possível a selecção dos mutantes desejados.

Os mutantes pretativos foram isolados e caracterizados por uma digestão restritiva de endonuclease e uma sequência de ADN. Os mutantes desejados foram, então, clonados e expressos no sistema de pCL28-BPV, atrás descrito em relação ao TPA uterino normal, por excisão da forma replicativa dos mutantes M13mp18-TPA apropriados, inserindo este ADN no vector de expressão pCL28-BPV e transformando células de rato C127 com o vector ADN.

Os agentes de transformação foram isolados e triados para a produção de TPA utilizando um ensaio ELISA. A maior parte do TPA produzido é segregado num meio de cultura, facilitando a purificação.

O efeito que a glicosilação parcial ou a não glicosilação tem sobre a vida média do TPA foi determinado mediante medição das vidas médias do TPA e sua comparação com a vida média do TPA completamente glicosilado.

As vidas médias foram medidas em coelhos mediante extracção de amostras de sangue em momentos diferentes após injecção e medição da actividade do TPA presente, utilizando o ensaio de placas de fibrina e um ensaio de ELISA, respectivamente. A libertação in vivo, através do fígado, de um TPA completamente glicosilado, a partir do sangue em circulação, é muito rápida com uma vida média biológica de cerca de 2 minutos. (Thromb. Haemostas. 46, 658, 1981). Assim, o TPA é normalmente administrado não por injecção,

mas por infusão de uma grande quantidade ao longo de um período de 3 horas. Uma vida média mais longa pode permitir um tratamento por injecção, em vez de infusão, visto que serão necessárias quantidades mais pequenas para se obter a lise dos coágulos.

Depósitos

Os seguintes materiais foram depositados na Agricultural Research Culture Collection (NRRL), Peoria, IL ou na American Type Culture Collection (ATCC) Rockville, MD;

pYBDT-6, mantido em E. coli, Nº. de Registo de NRRL B-15883;

pYBDT-10, mantido em E. coli, Nº. de Registo de NRRL B-15884;

células C127 de ratos transformadas com pCAT, Nº. de Registo de ATCC CRL8625.

A cessionária da requerente, Integrated Genetics, Inc., reconhece a sua responsabilidade em substituir estas culturas se elas vierem a morrer antes do termo do prazo de validade de uma patente concedida e a sua responsabilidade em notificar o NRRL e ATCC da concessão da mesma, altura em que os depósitos ficarão à disposição do público durante, pelo menos, 30 anos após a data do depósito. Até essa altura, os depósitos ficarão à disposição do Comissário de Patentes nos termos de 37 CFR §1.14 e 35 USC §112.

Utilização

O uTPA de acordo com o presente invento será misturado com uma substância veicular farmaceuticamente aceitável, e.g., solução salina, e administrado oralmente, intravenosamente ou por injecção em artérias ou no coração afectados. A administração será geralmente efectuada como para os dois enzimas correntemente utilizados na lise de coágulos

sanguíneos, estreptoquinase e uroquinase.

Outras formas de realização encontram-se nas reivindicações que se seguem.

O depósito do primeiro pedido para o invento acima descrito foi efectuado nos Estados Unidos da América, em 1 de Outubro de 1984, sob o nº. 656.770.

- R E I V I N D I C A Ç Õ E S -

1ª - Processo para a produção de um ATP uterino humano, caracterizado pelo facto de compreender a cultura de uma célula transformada com um vector de expressão replicável, susceptível de, numa célula hospedeira transformada, em expressar uma sequência ADN que codifica um ATP uterino humano activo e bem assim, para a recuperação do referido ATP uterino humano, a partir do extracto celular e/ /ou do meio de cultura.

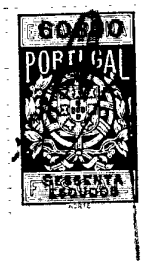
2ª - Processo para a produção de um ATP uterino humano de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a célula transformada ser uma célula de um fermento.

3ª - Processo para a produção de um ATP uterino humano, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a célula transformada ser uma célula de mamífero.

4ª - Processo para a produção de um ATP uterino humano caracterizado pelo facto de a célula de fermento ser uma célula Saccharomyces cerevisae.

5ª - Processo para a produção de um ATP uterino humano, caracterizado pelo facto de o mesmo ser, pelo menos, 97% isento de proteínas não ATP.

6ª - Processo para a produção de um ATP uterino humano, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o ATP ser isento de outras proteínas de ori-



gem humana.

7ª - Processo para a produção de um ATP uterino humano, caracterizado pelo facto de ser produzido pela célula transformada de acordo com a reivindicação 1.

8ª - Processo de acordo com a reivindicação 1, para a produção de uma composição terapêutica susceptível de causar a lise de coágulos sanguíneos, caracterizado pelo facto de compreender a incorporação de uma quantidade causadora da lise de coágulos sanguíneos do ATP uterino humano, de acordo com qualquer das reivindicações 5, 7 misturada com uma substância veícular farmaceuticamente aceitável.

9ª - Processo de acordo com a reivindicação 1, para a purificação do uATP a partir do meio de células cultivadas que produz o referido uATP, caracterizado pelo facto de compreender o efectuar-se uma primeira fase para extracção da fase líquida/líquida para se eliminar a porção de proteínas não uATP do referido extracto ou meio para produzir uma composição possuindo uma actividade específica aumentada de uATP.

10ª - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo facto de compreender ainda uma segunda fase compreendendo o efectuar-se uma cromatografia por afinidade da referida composição para ligar o referido uATP a um anticorpo anti-ATP.

11ª - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo facto da referida fase de extracção da fase líquida/líquida ser efectuada por incorporação do referido meio ou extracto de cultura com dois compostos poliméricos solúveis em água diferentes para formar uma mistura de duas fases em que, pelo menos, 65% em peso do referido uATP estão presentes numa das referidas fases e, pelo menos, 40% em volume, de água, no referido meio ou extracto, estão presentes na outra fase.

12ª - Processo de acordo com a reivindicação

10, caracterizado pelo facto de compreender ainda, entre as referidas primeira e segunda fases, uma fase em que se efectua uma cromatografia por afinidade de hidrofóbica na fase rica em uATP para purificar ainda mais o referido uATP.

13ª - Processo de acordo com as reivindicações anteriores para a purificação do ATP humano a partir do meio de células cultivadas que produz o referido ATP, caracterizado pelo facto de compreender o efectuar-se uma primeira fase de afinidade hidrofóbica, uma segunda fase de cromatografia por afinidade do anticorpo, e uma terceira fase de cromatografia por filtração em gel.

14ª - Processo para a produção de um ATP uterino humano, de acordo com as reivindicações anteriores, em que um vector de expressão replicável susceptível de, numa célula hospedeira de mamífero transformada, expressa uma sequência ADN que codifica um ATP humano activo, caracterizado pelo facto de, quando expresso o referido vector na referida célula hospedeira, produzir um ATP activo a que faltam uma ou mais das porções de hidratos de carbono N-ligadas fixas em ATP de um ATP humano de ocorrência natural.

15ª - Processo para a produção de um ATP uterino humano, caracterizado pelo facto de o vector de acordo com a reivindicação 14, o referido ATP codificado ter falta de todas as porções de hidrato de carbono N-ligadas.

16ª - Processo para a produção de um ATP uterino humano, mediante uma molécula ADN recombinante que codifica um ATP humano activo e que diverge de uma molécula ADN de ocorrência natural que codifica um ATP uterino humano de ocorrência natural. Processo esse caracterizado pelo facto de se substituir pelo menos, um dos codões na referida molécula ADN de ocorrência natural que codifica a asparagina amino-ácida à qual está ligada, por meio de uma ligação covalente, pelo menos, uma das porções de hidrato de carbono N-Ligadas do referido ATP uterino humano de ocorrência natural,

por um codão que codifica um amino-ácido ao qual não se liga a referida porção de hidrato de carbono.

17ª - Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo facto de na molécula ADN recombinante a referida porção de hidrato de carbono ser uma porção de hidrato de carbono que, entre as porções de hidrato de carbono ligadas ao referido ATP uterino humano de ocorrência natural, é a que está mais próxima do amino do referido ATP.

18ª - Processo de acordo com as reivindicações 16 ou 17, caracterizado pelo facto de na molécula ADN recombinante a referida porção de hidrato de carbono ser uma porção de hidrato de carbono que, entre as porções de hidrato de carbono N-ligadas ao referido ATP uterino humano de ocorrência natural, é a segunda mais próxima do terminus amino do referido ATP.

19ª - Processo de acordo com as reivindicações 16, 17 ou 18, caracterizado pelo facto de na molécula ADN recombinante a referida porção de hidrato de carbono ser uma porção de hidrato de carbono que, entre as porções de hidrato de carbono N-ligadas ao referido ATP uterino humano de ocorrência natural, é a que está mais próxima do terminus carboxi do referido ATP.

20ª - Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo facto de na molécula ADN recombinante se substituir um codão de glutamina por um dos referidos codões de asparagina.

21ª - Processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo facto de na molécula ADN recombinante se se substituirem os codões de glutamina por dois dos referidos codões de asparagina.

22ª - Processo de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo facto de na molécula ADN recombinante se substituírem codões de glicina por três dos referidos co-

dões de asparagina.

23ª - Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo facto de na molécula ADN recombinante as referidas substituições do codão se darem nas posições 120, 187 e 451 do resíduo amino ácido.

24ª - Processo de acordo com as reivindicações anteriores para a produção de um ATP humano activo com falta de uma ou mais porções de hidrato de carbono N-ligadas do ATP humano de ocorrência natural, caracterizado pelo facto de compreender:

a transformação de uma célula de mamífero com um vector de expressão susceptível de, na referida célula de mamífero, expressar uma sequência ADN que, quando expressa na referida célula, produz um ATP humano activo ao qual faltam uma ou mais das referidas porções de hidrato de carbono,

a cultura da referida célula de mamífero num meio de cultura sob condições em que a referida sequência ADN é expressa para produzir o referido ATP, e

o isolamento do referido ATP a partir da referida célula ou referido meio de cultura.

Lisboa, 1 de Outubro de 1985

Por INTEGRATED GENETICS, INC.,

O AGENTE OFICIAL



FIG 1A

```
ctgtgaagcaatc   ATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC TGC TGT GTG CTG CTG CTG TGT GGA GCA GTC TTC
                met asp ala met lys arg gly leu cys cys val leu leu leu cys gly ala val phe
                -38                                 -30                             -20

                                          100
GTT TCG CCC AGC CAG GAA ATC CAT GCC CGA TTC AGA AGA|GGA GCC AGA|TCT TAC CAA|GTG ATC TGC AGA
val ser pro ser gln glu ile his ala arg phe arg arg|gly ala arg|ser tyr gln|VAL Ile Cys Arg
                                          -10                                   1

                                                                          200
GAT GAA AAA ACG CAG ATG ATA TAC CAG CAA CAT CAG TCA TGG CTG CGC CCT GTG CTC AGA AGC AAC CGG
Asp Glu Lys Thr Gln Met Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn Arg
                    10                                      20

GTG GAA TAT TGC TGG TGC AAC AGT GGC AGG GCA CAG TGC CAC TCA GTG CCT GTC AAA AGT TGC AGC GAG
Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly Arg Ala Gln Cys His Ser Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu
        30                                  40                                          50

                              300
CCA AGG TGT TTC AAC GGG GGC ACC TGC CAG CAG GCC CTG TAC TTC TCA GAT TTC GTG TGC CAG TGC CCC
Pro Arg Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro
                                    60                                          70
                                                                    400
GAA GGA TTT GCT GGG AAG TGC TGT GAA ATA GAT ACC AGG GCC ACG TGC TAC GAG GAC CAG GGC ATC AGC
Glu Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr Glu Asp Gln Gly Ile Ser
                        80                                          90
                                                                CHO
TAC AGG GGC ACG TGG AGC ACA GCG GAG AGT GGC GCC GAG TGC ACC AAC TGG AAC AGC AGC GCG TTG GCC
Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala Glu Ser Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp Asn Ser Ser Ala Leu Ala
            100                                         110
                    500
CAG AAG CCC TAC AGC GGG CGG AGG CCA GAC GCC ATC AGG CTG GGC CTG GGG AAC CAC AAC TAC TGC AGA
Gln Lys Pro Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg Leu Gly Leu Gly Asn His Asn Tyr Cys Arg
120                                 130                                             140
                                                        600
AAC CCA GAT CGA GAC TCA AAG CCC TGG TGC TAC GTC TTT AAG GCG GGG AAG TAC AGC TCA GAG TTC TGC
Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp Cys Tyr Val Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys
                            150                                         160
                                                                CHO
AGC ACC CCT GCC TGC TCT GAG GGA AAC AGT GAC TGC TAC TTT GGG AAT GGG TCA GCC TAC CGT GGC ACG
Ser Thr Pro Ala Cys Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg Gly Thr
                170                                         180
        700
CAC AGC CTC ACC GAG TCG GGT GCC TCC TGC CTC CCG TGG AAT TCC ATG ATC CTG ATA GGC AAG GTT TAC
His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr
    190                                 200                                         210
```

56625



FIG 1B

```
                CHO                                                  800
ACA GCA CAG AAC CCC AGT GCC CAG GCA CTG GGC CTG GGC AAA CAT AAT TAC TGC CGG AAT CCT GAT GGG
Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly
                              220                                                 230

GAT GCC AAG CCC TGG TGC CAC GTG CTG AAG AAC CGC AGG CTG ACG TGG GAG TAC TGT GAT GTG CCC TCC
Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser
                    240                                                 250
900                                                                     ↓
TGC TCC ACC TGC GGC CTG AGA CAG TAC AGC CAG CCT CAG TTT CGC ATC AAA GGA GGG CTC TTC GCC GAC
Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp
        260                                 270                                         280
                                       1000
ATC GCC TCC CAC CCC TGG CAG GCT GCC ATC TTT GCC AAG CAC AGG AGG TCG CCC GGA GAG CGG TTC CTG
Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu
                              290                                             300
                                                                                    1100
TGC GGG GGC ATA CTC ATC AGC TCC TGC TGG ATT CTC TCT GCC GCC CAC TGC TTC CAG GAG AGG TTT CCG
Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro
                        310                                         320

CCC CAC CAC CTG ACG GTG ATC TTG GGC AGA ACA TAC CGG GTG GTC CCT GGC GAG GAG GAG CAG AAA TTT
Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu Gln Lys Phe
            330                                 340
                                  1200
GAA GTC GAA AAA TAC ATT GTC CAT AAG GAA TTC GAT GAT GAC ACT TAC GAC AAT GAC ATT GCG CTG CTG
Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu
350                                 360                                             370
                                                                          1300
CAG CTG AAA TCG GAT TCG TCC CGC TGT GCC CAG GAG AGC AGC GTG GTC CGC ACT GTG TGC CTT CCC CCG
Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro
                        380                                         390

GCG GAC CTG CAG CTG CCG GAC TGG ACG GAG TGT GAG CTC TCC GGC TAC GGC AAG CAT GAG GCC TTG TCT
Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser
                400                                         410
                      1400
CCT TTC TAT TCG GAG CGG CTG AAG GAG GCT CAT GTC AGA CTG TAC CCA TCC AGC CGC TGC ACA TCA CAA
Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln
    420                                 430                                         440
                CHO                                                 1500
CAT TTA CTT AAC AGA ACA GTC ACC GAC AAC ATG CTG TGT GCT GGA GAC ACT CGG AGC GGC GGG CCC CAG
His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln
                              450                                         460

GCA AAC TTG CAC GAC GCC TGC CAG GGC GAT TCG GGA GGC CCC CTG GTG TGT CTG AAC GAT GGC CGC ATG
Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met
                    470                                 480
                                                                            A
            1600                                                            ↓
ACT TTG GTG GGC ATC ATC AGC TGG GGC CTG GGC TGT GGA CAG AAG GAT GTC CCG GGT GTG TAC ACC AAG
Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys
        490                                 500                                         510
```



FIG 1C

```
                                                                1700
GTT ACC AAC TAC CTA GAC TGG ATT CGT GAC AAC ATG CGA CCG TGA       CCAGGAACAC CCGACTCCTC
Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro ***
                                      520
                                                                          1800
AAAAGCAAAT GAGATCCCGC CTCTTCTTCT TCAGAAAACA CTGCAAAGGC GCAGTGCTTC TCTACAGACT TCTCCAGACC
                                           G

CACCACACCG CAGAAGCGGG ACGAGACCCT ACAGGAGAGG GAAGAGTGCA TTTTCCCAGA TACTTCCCAT TTTGGAAGTT

               1900
TTCAGGACTT GGTCTGATTT CAGGATACTC TGTCAGATGG GAAGACATGA ATGCACACTA GCCTCTCCAG GAATGCCTCC

                                          2000
TCCCTGGGCA GAAATGGCCA TGCCACCCTG TTTTCAGCTA AAGCCCAACC TCCTGACCTG TCACCGTGAG CAGCTTTGGA
             G                            X
                                                          2100
AACAGGACCA CAAAAATGAA AGCATGTCTC AATAGTAAAA GATAACAAGA TCTTTCAGGA AAGACGGATT GCATTAGAAA
                                          X      /GA
                                                                          2200
TAGACAGTAT ATTTATAGTC ACAAGAGCCC AGCAGGGCTC AAAGTTGGGG CAGGCTGGCT GGCCCGTCAT GTTCCTCAAA
                                 G

AGCACCCTTG ACGTCAAGTC TCCTTCCCCT TTCCCCACTC CCTGGCTCTC AGAAGGTATT CCTTTTGTGT ACAGTGTGTA
  G                                                                        A
               2300
AAGTGTAAAT CCTTTTTCTT TATAAACTTT AGAGTAGCAT GAGAGAATTG TATCATTTGA ACAACTAGGC TTCAGCATAT

                                          2400
TTATAGCAAT CCATGTTAGT TTTTACTTTC TGTTGCCACA ACCCTGTTTT ATACTGTACT TAATAAATTC AGATATATTT
      G     /C                    C                        C                  G

TTCACAGTTT TTCCA
 /T
```

POSTUGAL

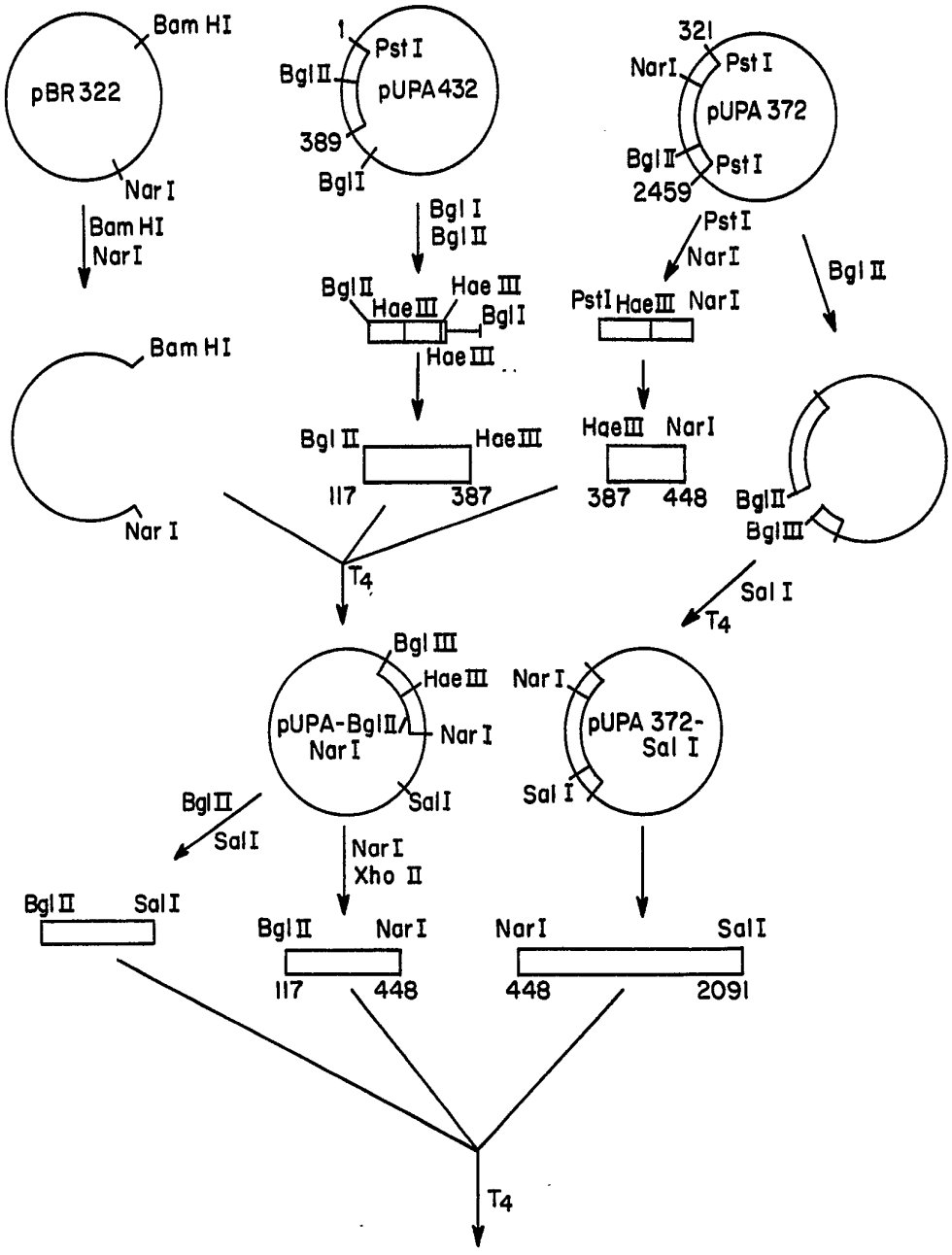
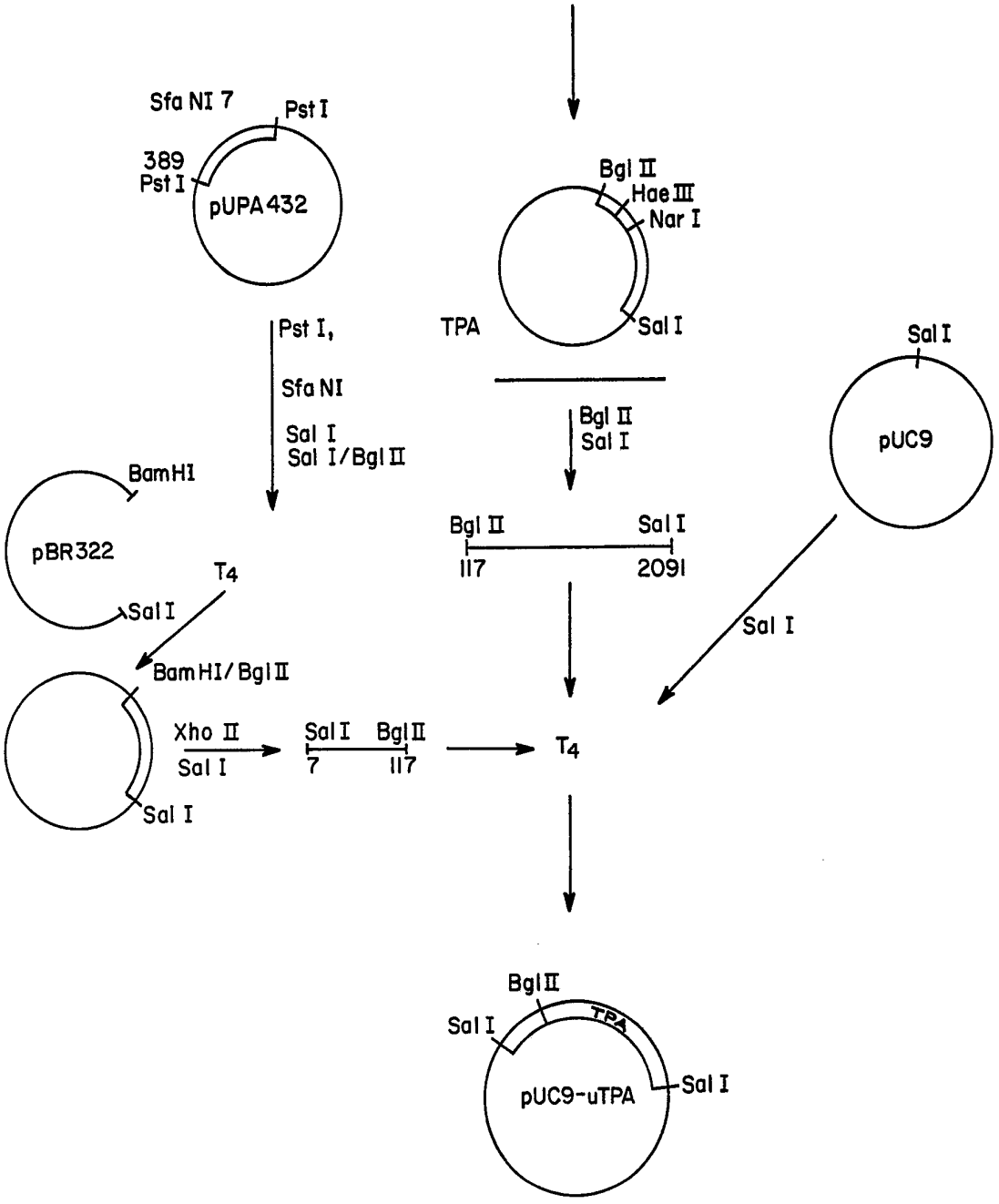


FIG 2A

FIG 2B


Sfa NI 7
Pst I
389
Pst I
pUPA432
Pst I,
Sfa NI
Sal I
Sal I/Bgl II
BamHI
pBR322
T4
Sal I
BamHI/Bgl II
Xho II
Sal I
Sal I
Bgl II
7
117
T4
Bgl II
Hae III
Nar I
TPA
Sal I
Bgl II
Sal I
Bgl II
Sal I
117
2091
Sal I
pUC9
Sal I
Bgl II
Sal I
TPA
pUC9-uTPA
Sal I


PORTUGAL
SESSENTA
CENTAVOS

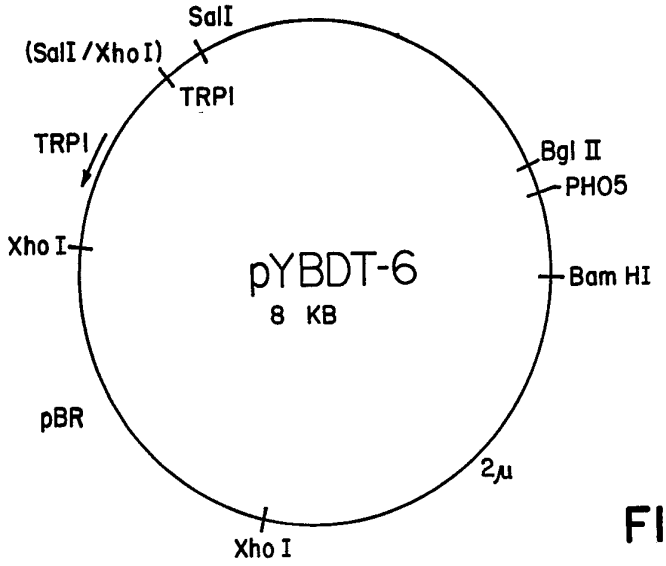

SalI
(SalI / Xho I)
TRPI
TRPI
Xho I
pBR
Xho I
2μ
Bam HI
PHO5
Bgl II
pYBDT-6
8 KB

FIG 3

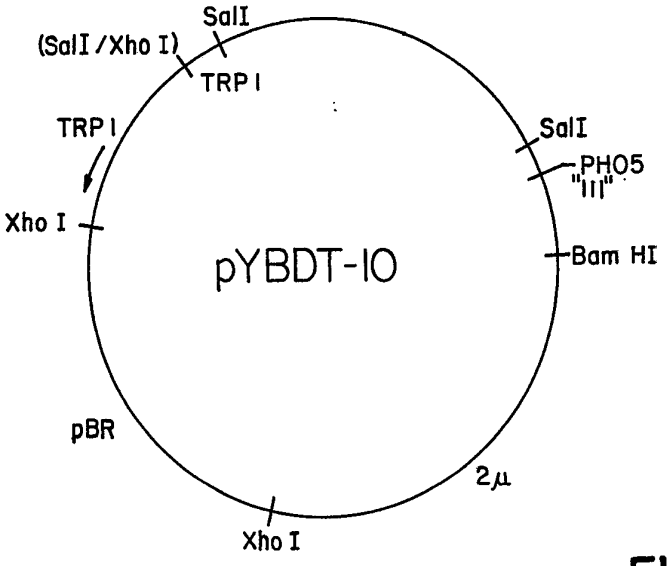

SalI
(SalI / Xho I)
TRP I
TRP I
Xho I
pBR
Xho I
2μ
Bam HI
SalI
PHO5
pYBDT-10

FIG 4

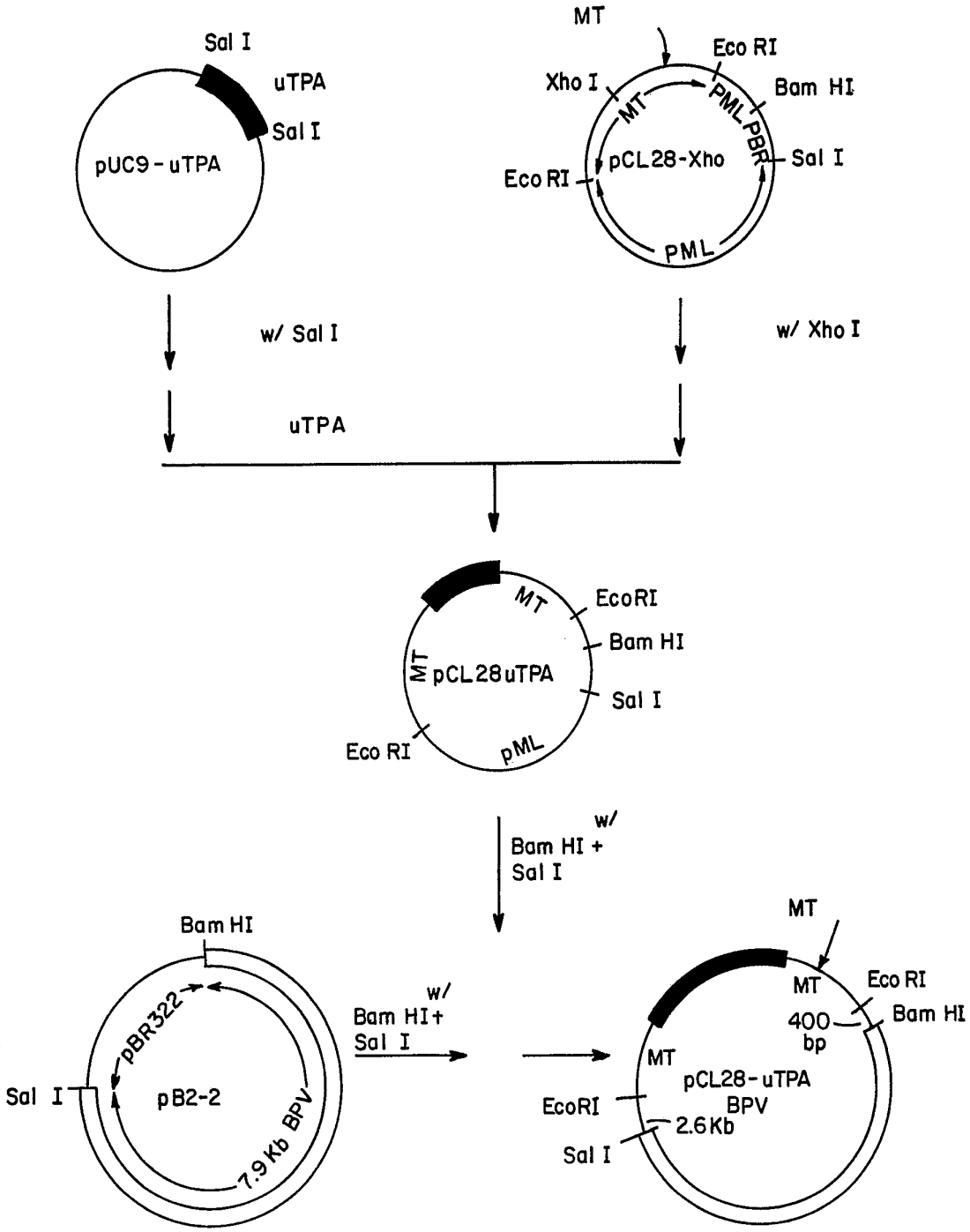

Sal I
uTPA
Sal I
pUC9 - uTPA
MT
Eco RI
Xho I
MT
PML
PBR
Bam HI
pCL28-Xho
Sal I
Eco RI
PML
w/ Sal I
w/ Xho I
uTPA
MT
EcoRI
Bam HI
MT
pCL28uTPA
Sal I
Eco RI
pML
w/
Bam HI +
Sal I
Bam HI
pBR322
Sal I
pB2-2
7.9 Kb BPV
w/
Bam HI+
Sal I
MT
MT
Eco RI
400
bp
Bam HI
MT
pCL28-uTPA
BPV
EcoRI
2.6Kb
Sal I

FIG 5

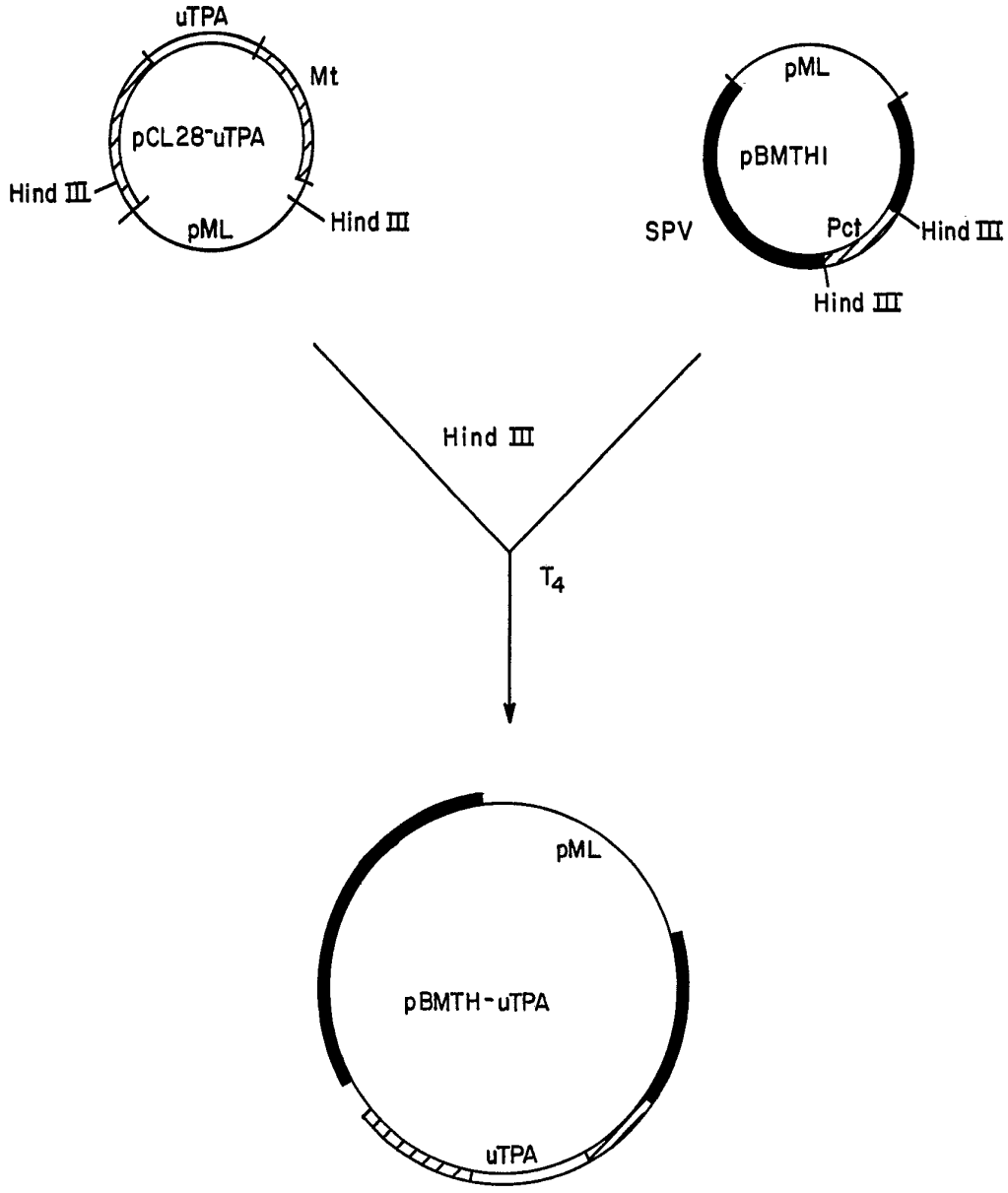

uTPA
Mt
pCL28-uTPA
Hind III
pML
Hind III
pML
pBMTHI
SPV
Pct
Hind III
Hind III
Hind III
T4
pML
pBMTH-uTPA
uTPA

FIG 6

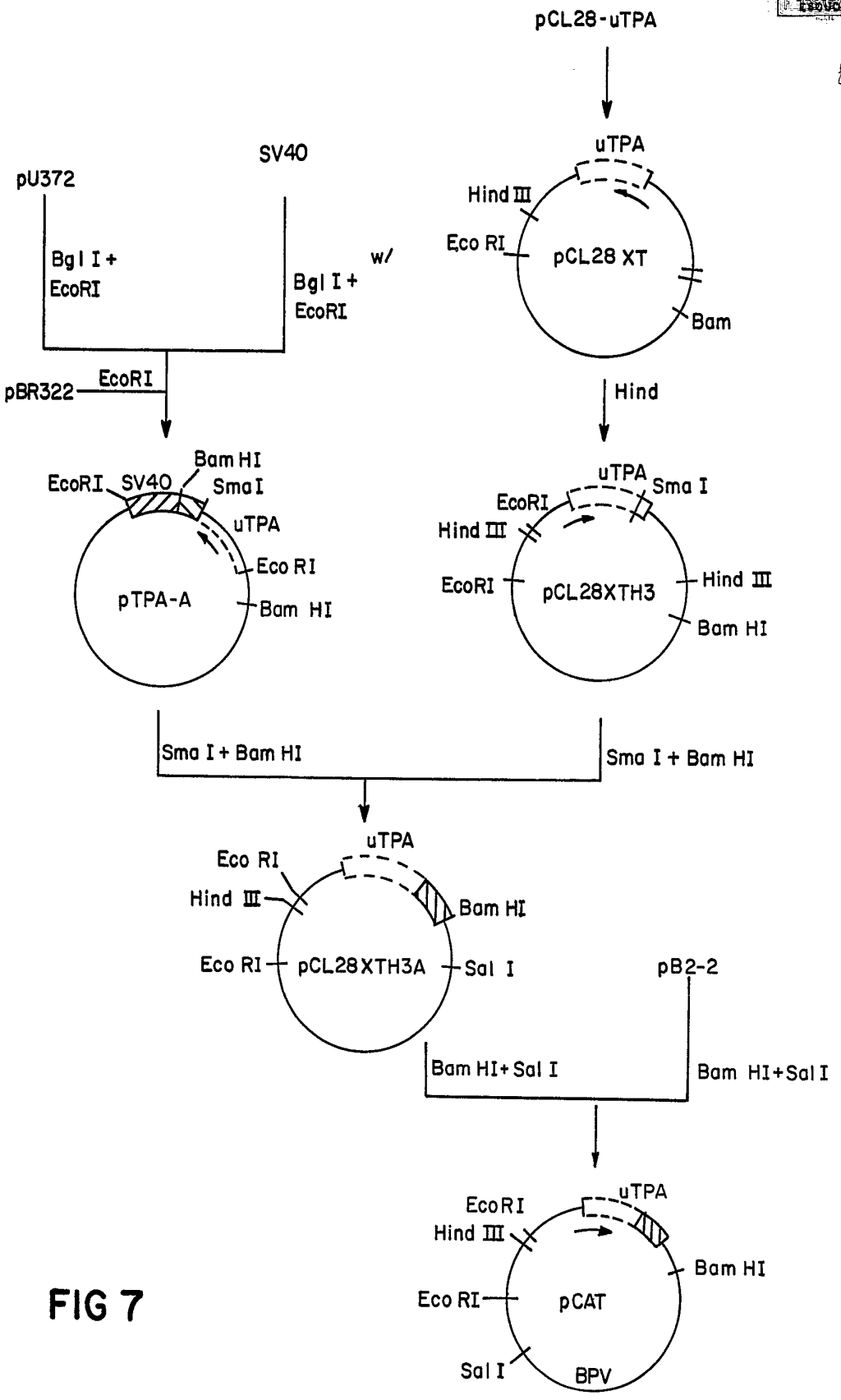

pCL28-uTPA
uTPA
Hind III
Eco RI
pCL28 XT
Bam
SV40
pU372
Bgl I +
EcoRI
w/
Bgl I +
EcoRI
pBR322
EcoRI
Hind
Bam HI
EcoRI
SV40
Sma I
uTPA
Eco RI
pTPA-A
Bam HI
uTPA
Sma I
EcoRI
Hind III
EcoRI
pCL28XTH3
Hind III
Bam HI
Sma I + Bam HI
Sma I + Bam HI
uTPA
Eco RI
Hind III
Bam HI
Eco RI
pCL28XTH3A
Sal I
pB2-2
Bam HI+Sal I
Bam HI+Sal I
EcoRI
uTPA
Hind III
Bam HI
Eco RI
pCAT
Sal I
BPV

FIG 7

"A" :
Asn → Gln
AAC → CAA

"B" :
Asn → Gln
AAC → CAA

"C" :
Asn → Gln
AAT → CAA

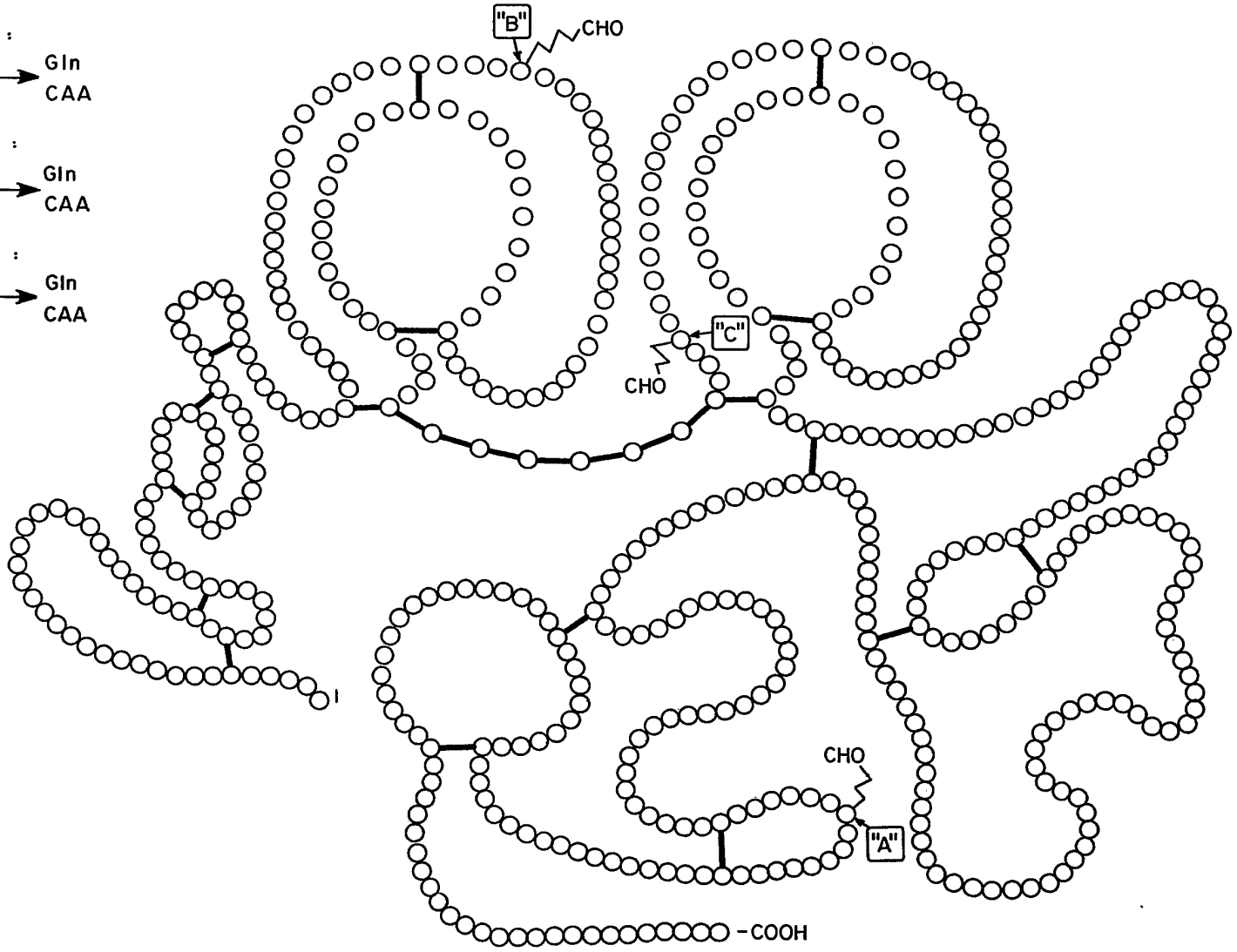


FIG 8