

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

(21) **PI0610958-6 A2**

(22) Data de Depósito: 31/05/2006
(43) Data da Publicação: 03/08/2010
(RPI 2065)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 9/72
C12N 15/67
A61K 38/00

(54) Título: **MÉTODO PARA PRODUZIR UMA FORMA
OBTIDA POR BIOENGENHARIA DO ATIVADOR DE
PLASMINOGÊNIO TECIDUAL**

(30) Prioridade Unionista: 02/06/2005 IN 673/CHE/2005

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

(72) Inventor(es): VILLOO MORAWALA PATELL

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

(86) Pedido Internacional: PCT IB2006001481 de 31/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/129191 de 07/12/2006

(57) Resumo: A presente invenção refere-se ao método recombinante usado para a produção de uma forma solúvel de uma variante do ativador de plasminogênio tecidual. Nesta variante, a treonina na posição 103 do ativador de plasminogênio tecidual endógeno é substituída por uma asparagina, levando a um novo sítio de glicosilação. Na posição 117 do ativador de plasminogênio tecidual, a asparagina foi substituída por glutamina, levando à remoção de um sítio de glicosilação ligado a N. Na posição 296-299, os aminoácidos usina, histidina, arginina, e arginina foram substituídos por quatro aminoácidos alanina. A Invenção refere-se ainda à síntese inusitada da sequência de ácidos nucleicos que codifica o ativador do plasminogênio tecidual, transformação das sequências de ácidos nucleicos construídas em bactérias competentes e subclonagem das mesmas em vetores de expressão em mamíferos para a expressão da proteína desejada. As construções de DNA que compreendem os elementos de controle associados com o gene de interesse foram descritas. O ativador do plasminogênio tecidual humano recombinante, de acordo com a invenção, e os seus sais e derivados funcionais, podem compreender o ingrediente ativo de composições farmacêuticas para o tratamento de infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral em pacientes. Estas composições são ainda outro aspecto da presente invenção.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO PARA PRODUZIR UMA FORMA OBTIDA POR BIOENGENHARIA DO ATIVADOR DE PLASMINOGÊNIO TECIDUAL".

Campo Técnico da Invenção

5 A presente invenção refere-se ao método recombinante usado para produzir uma forma solúvel de uma variante do ativador de plasminogênio tecidual humano. Nesta variante, a treonina na posição 103 do ativador de plasminogênio tecidual endógeno é substituída por uma asparagina, levando a um novo sítio de glicosilação. Na posição 117 do ativador de plasminogênio tecidual, a asparagina foi substituída por glutamina, levando à
10 remoção de um sítio de glicosilação ligado a N. Na posição 296-299, os aminoácidos lisina, histidina, arginina, e arginina foram substituídos por quatro aminoácidos alanina.

A invenção refere-se ainda à síntese inusitada da seqüência de
15 ácidos nucléicos que codifica o ativador do plasminogênio tecidual, transformação das seqüências de ácidos nucléicos construídas em bactérias competentes e subclonagem das mesmas em vetores de expressão em mamíferos para a expressão da proteína desejada.

As construções de DNA que compreendem os elementos de
20 controle associados com o gene de interesse foram descritas.

O ativador do plasminogênio tecidual humano recombinante, de acordo com a invenção, e os seus sais e derivados funcionais, podem compreender o ingrediente ativo de composições farmacêuticas para o tratamento de infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral em pacientes. Estas
25 composições são ainda outro aspecto da presente invenção.

Antecedentes da Invenção

Os ativadores de plasminogênio são enzimas que ativam o plasminogênio zimógeno para gerar a serina proteinase plasmina, que degrada a fibrina. Dentre os ativadores de plasminogênio estudados estão a
30 estreptocinase, urocinase e o ativador de plasminogênio tecidual (t-PA). O mecanismo de ação de cada um desses ativadores de plasminogênio difere. A estreptocinase forma um complexo com plasminogênio, gerando

atividade de plasmina, a urocinase cliva o plasminogênio diretamente, e t-PA forma um complexo ternário com fibrina e plasminogênio, levando à ativação de plasminogênio no local do coágulo.

O ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA), uma serina protease glicosilada com múltiplos domínios, é um ativador de plasminogênio específico de fibrina e um agente trombolítico muito eficaz. t-PA é uma proteína recombinante cuja aplicação principal é no tratamento de pacientes com infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. Ele foi caracterizado pela primeira vez em 1979, como um agente farmacêutico biológico importante e potente no tratamento de várias doenças vasculares devido à sua alta especificidade por fibrina e capacidade potente de dissolver coágulos sangüíneos *in vivo*.

O t-PA natural tem uma meia-vida plasmática de cerca de seus minutos ou menos. Devido à sua rápida depuração da circulação, t-PA tem de ser infundido para conseguir a trombólise. A administração de dosagens com carga precoce e concentrações aumentadas de t-PA demonstrou lise mais rápida e completa em comparação com o protocolo de infusão usual e a potência precoce está correlacionada com melhor taxa de sobrevida. A administração maciça poderia melhorar ainda mais a velocidade da lise expondo rapidamente o coágulo-alvo a uma concentração mais alta da enzima, mas uma única administração maciça de t-PA natural ou do tipo selvagem não pode ser geralmente usada devido à sua taxa de depuração.

Muitos pesquisadores produziram versões com meia-vida mais longa de t-PA que poderiam ser administradas maciçamente, mas quase todas as variantes vieram a ter atividades fibrinolíticas significativamente diminuídas.

Assim sendo, é um objeto da presente invenção fornecer um método recombinante usado para a produção de uma molécula com taxa de depuração reduzida, e ao mesmo tempo, retendo a atividade fibrinolítica completa, e estudos sistemáticos de mutagênese foram aplicados a t-PA em seus vários domínios. Tal fármaco teria também uma alta especificidade com maior afinidade por um trombo recente e produziria menos plasmina circu-

lante. Conseqüentemente, a incidência de hemorragia intracerebral (ICH) e outros episódios de sangramento não-cerebrais seria mais baixa. O fármaco teria resistência a PAI-1 e seria também produtivo.

Sumário da Invenção

5 A presente invenção refere-se ao método recombinante usado para produzir uma forma solúvel de uma variante do ativador de plasminogênio tecidual humano. Nesta variante, a treonina na posição 103 do ativador de plasminogênio tecidual endógeno é substituída por uma asparagina, levando a um novo sítio de glicosilação. Na posição 117 do ativador de plasminogênio tecidual, a asparagina foi substituída por glutamina, levando à
10 remoção de um sítio de glicosilação ligado a N. Na posição 296-299, os aminoácidos lisina, histidina, arginina, e arginina foram substituídos por quatro aminoácidos alanina.

 Um aspecto específico da invenção refere-se à síntese inusitada da seqüência de ácidos nucléicos que codifica o ativador do plasminogênio
15 tecidual, transformação das seqüências de ácidos nucléicos construídas em bactérias competentes e subclonagem das mesmas em vetores de expressão em mamíferos para a expressão da proteína desejada.

 Ainda outro aspecto da invenção fornece vetores de DNA plasmídicos vitais e circulares biologicamente funcionais que incorporam as seqüências de DNA da invenção e organismos hospedeiros transformados de
20 forma estável ou transfectados com os ditos vetores.

 A invenção fornece correspondentemente métodos inovadores para a produção de polipeptídeos úteis, compreendendo o desenvolvimento
25 cultivado dessas células hospedeiras transformadas, particularmente células de mamíferos, sob condições que facilitam a expressão em larga escala das seqüências de DNA exógenas veiculadas por vetores e o isolamento dos polipeptídeos desejados a partir do meio de crescimento, lisados celulares ou frações de membranas celulares.

30 Descrição Detalhada das Figuras e Seqüências

 A Figura 1 ilustra o alinhamento emparelhado de seqüências das versões não-otimizadas e otimizadas com códons da seqüência de nucleotí-

deos do DNA que codifica o ativador de plasminogênio tecidual;

A Figura 2 ilustra o alinhamento de seqüências do DNAC TE-NECT sintetizado de forma inusitada (TNK-tPA_sintético) com a seqüência estabelecida do gene TNK-tPA;

5 A Figura 3 ilustra o alinhamento de seqüências do DNAC TE-NECT-Opt sintetizado de forma inusitada (TNK-tPA-Opt_sintético) com a seqüência estabelecida do gene TNK-tPA-Opt;

A Figura 4 ilustra os fragmentos de TENECT, TEECT-Opt e pcDNA3.1D/V5-His digeridos por restrição e purificados em gel;

10 A Figura 5 ilustra a análise da digestão por restrição de clones putativos de pcDNA3.1-TENECT D/V5-His/TNK-tPA e pcDN3.1-TENECT-Opt/V5-His/TNK-tPA-Opt;

A Figura 6 ilustra a análise da digestão por restrição dos clones PcDNA3.1-TENECT/V5-His/TNK-tPA e PcDNA3.1-TENECT-Opt/V5-His/TNK-tPA-Opt, usando enzimas que clivam os DNAC's de TENECT e TE-NECT-Opt internamente;

15 A Figura 7 ilustra o Mapa de Construções: PcDNA3.1-TENECT/V5-His/TNA-tPA;

A Figura 8 ilustra o Mapa de Construções: PcDNA3.1-TENECT-Opt/V5-His/TNK-tPA-Opt;

20 SEQ ID Nº: 1 é a seqüência de nucleotídeos que codifica o ativador de plasminogênio tecidual recombinante;

SEQ ID Nº: 2 é a versão otimizada com códons da seqüência de nucleotídeos que codifica o ativador de plasminogênio tecidual recombinante.

Descrição Detalhada da Invenção

Vários métodos foram descritos para a expressão de proteínas recombinantes em sistemas eucarióticos superiores. Os sistemas de expressão com células CHO-K1, HEK-293 (e variantes) se estabeleceram agora como os sistemas predominantes de escolha para a expressão de proteínas de mamíferos. Os aprimoramentos da construção de vetores, escolha de marcadores selecionáveis e os avanços no assesto de genes e nas estraté-

gias de triagem com alta produção, tornaram relativamente comum o estabelecimento de linhagens de células recombinantes com altas produtividades específicas e reduziram o tempo necessário para o desenvolvimento de linhagens de células. Os avanços recentes nas tecnologias de expressão, usando vetores de expressão tradicionais baseados em promotores virais, incluem o desenvolvimento e aprimoramento de estratégias de expressão bis-cistrônica usando seqüências de sítios de entrada com ribossomas internos (IRES) ou junções alternativas.

Exemplo 1

As seqüências de DNA que codificam o ativador de plasminogênio tecidual foram sintetizadas por uma abordagem inovadora. Esta abordagem permite melhor otimização de códons com relação à linhagem de células específica de mamíferos a ser usada. Além disso, o DNA sintético tornou-se o tema da expressão eucariótica/procariótica que disponibiliza quantidades isoláveis de polipeptídeos que apresentam propriedades biológicas do t-PA de ocorrência natural, bem como atividades biológicas *in vivo* e *in vitro* de t-PA.

A seqüência de nucleotídeos que codifica o ativador de plasminogênio tecidual recombinante (TENECT 1) foi representada em SEQ ID N^o: 1. Os códons na seqüência de DNA codificadora do ativador de plasminogênio tecidual, que foram alterados como parte do processo de otimização de códons para assegurar a expressão ideal de proteínas recombinantes em linhagens de células de mamíferos tais como CHO K1 e HEK 293, foram ressaltados em letras maiúsculas. SEQ ID N^o: 2 representa a seqüência de nucleotídeos otimizada com códons, que codifica o ativador de plasminogênio tecidual (TENECT 2).

O alinhamento emparelhado de seqüências da seqüência de nucleotídeos não-otimizada e otimizada com códons, que codificam o ativador de plasminogênio tecidual, foi representado na Figura 1.

Exemplo 2Verificação da autenticidade do DNAC sintetizado inusitadamente que codifica o ativador de plasminogênio tecidual

5. A verificação da autenticidade das moléculas do DNAC sintetizado inusitadamente, como supridas pelo fornecedor, foi feita por seqüenciamento de DNA automatizado, e os resultados obtidos estão representados nas Figuras 2 e 3.

Exemplo 3

- 10 Subclonagem dos DNAC's de TENECT e TENECT-Opt no vetor de expressão específico de células de mamíferos pcDNA3.1D/V5-His

- 15 Depois da verificação da autenticidade das moléculas do DNAC sintetizadas de forma inovadora (TENECT e TENECT-Opt) por seqüenciamento de DNA automatizado, como indicado acima, TENECT e TENECT-Opt foram subclonados individualmente no vetor de expressão específico de células de mamíferos pcDNA3.1D/V5-His, para gerar as construções prontas para transfecção. Os detalhes dos procedimentos são os seguintes:

A. Reagentes e Enzimas:

1. Kit de extração em gel QIAGEN e kit de purificação por PCR;
20 2. DNA do vetor pcDNA3.1D/V5-His (Invitrogen)

Enzima	Fornecedor	U/ μ L	Tampão (10x)
1. BamHI	Bangalore Genei	10	Tampão E
2. Xho I	Bangalore Genei	10	Tampão E
3. HindIII	Bangalore Genei	20	Tampão E
4. XhoI	Bangalore Genei	10	Tampão E
5. T4 DNA ligase	Bangalore Genei	40	Tampão de Ligase

Todas as reações foram conduzidas como recomendado pelo fabricante. Para cada reação, o tampão de reação 10x foi diluído até uma concentração final de 1x.

B. Digestão com restrição do vetor e do inserto

- 25 - Procedimento:

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

Amostras de DNA	Enzima de Restrição
Vetor Rxn nº 1 (para clonagem de TNK-tPA)	BamHI/XhoI
Vetor Rxn nº 2 (para clonagem de TNK-tPA-Opt)	HindIII/XhoI
Rxn nº 3 pBSK/TNK-tPA (nº 5)	BamHI/XhoI
Rxn nº 4 pBSK/TNK-tPA-Opt (nº 18)	HindIII/XhoI

- Reações de digestão com enzimas de restrição:

Componentes	Concentração Final	Rxn nº 1	Rxn nº 2	Rxn nº 3	Rxn nº 4
Água	-	2 µL	2 µL	2 µL	9 µL
Tampão 10x	1x	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
DNA	-	12 µL	12 µL	12 µL	5 µL
BamHI	0,5 U	1 µL	-	1 µL	-
XhoI	0,5 U	1 µL	-	1 µL	-
HindIII	1,0 U	-	1 µL	-	1 µL
XhoI	0,5 U	-	1 µL	-	1 µL
BSA 10x	1x	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Volume final	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

A reação foi misturada, centrifugada e incubada por duas horas a 37°C. A digestão com restrição foi analisada por eletroforese em gel de agarose. Foi observado o padrão de digestão esperado com características de um corte de fragmento gênico de ~1.700 pares de base (para Rxn nº^{os} 3 e 4) e um fragmento da ceia principal do vetor com ~5,5 kb para o vetor (Rxn nº^{os} 1 e 2) foi observado. Os fragmentos de DNA com ~1.700 pares de bases, representando os DNac's de TENECT e TENECT-Opt, foram purificados separadamente pelo método de extração em gel, usando o kit de extração em gel QIAGEN. A cadeia principal do vetor de ~5,5 kb digerido do vetor de expressão em mamíferos, pcDNA3.1D/V5-His, também foi purificada usando mesmo kit. Depois da digestão com restrição e extração em gel do do DMAc e dos fragmentos do DNA do vetor, uma alíquota (1-2 microlitros) de cada amostra de DNA purificada foi analisada usando eletroforese em gel de agarose para verificar a pureza e a integridade, como ilustrado na Figura 4 abaixo:

C. Ligação da cadeia principal de pcDNA3.1D/V5-His com os DNac's de TENECT e TENECT-Opt

A concentração do DNA do vetor digerido e purificado e dos fragmentos do inserto foi estimada (vide Figura 4 acima) e a ligação foi estabelecida da seguinte maneira:

Componentes	Concentração Final	Rxn nº 1 (T-V)	Rxn nº 2 (T-V+I)	Rxn nº 3 (T-Opt-V)	Rxn nº 4 (T-Opt-V+I)
Água	-	15 µL	10 µL	15 µL	9 µL
Tampão Rxn 10x	1x	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Vetor	50 ng	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Inserto	10 ng/8 ng	-	5 µL	-	6 µL
T4 DNA Ligase	15 U	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Volume final	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

5 As reações foram misturadas suavemente, centrifugadas e incubadas à temperatura ambiente por 2-3 h. As células DH10 competentes foram transformadas com o conteúdo das misturas da reação de ligação.

D. Análise da digestão com restrição de clones putativos de pcDNA3.1-TENECT/V5-His/TNK-tPA e pcDNA3.1D-TENECT-Opt/V5-His/TNK-tPA-Opt

10 O DNA plasmídico foi purificado individualmente a partir das colônias obtidas em placas de ágar L.B, contendo ampicilina, e a presença do inserto de DNAC desejado foi confirmada por análise da digestão com restrição do DNA plasmídico isolado, como ilustrado na Figura 5.

15 De acordo com os resultados obtidos depois da digestão com restrição de vários clones putativos que contêm pcDNA3.1-TENECT/V5-His/TNK-tPA e pcDNA3.1-TENECT-Opt/V5-His/TNK-tPA-Opt, alguns dos clones que apresentavam o padrão de restrição desejado foram selecionados para análise adicional da digestão por restrição, usando enzimas de restrição que clivam os DNAC's de TENECT e TENECT-Opt internamente para
20 gerar fragmentos com tamanhos variáveis, como ilustrado na Figura 6.

A maioria dos clones de pcDNA3.1-TENECT/V5-His/TNK-tPA e pcDNA3.1-TENECT-Opt/V5-His/TNK-tPA-Opt selecionados para análise do mapeamento de restrição produziu os tamanhos esperados dos fragmentos, baseado na ocorrência de sítios de restrição internos conhecidos, e assim

sendo, estes clones serão verificados adicionalmente por análise de sequenciamento de DNA.

Os mapas das construções de expressão recombinante feitos usando os DNAC's de TENECT e TENECT-Opt sintetizados de forma inusitada estão representados de forma pictórica nas Figuras 7 e 8.

Exemplo 4

Manutenção e Propagação da Construção de t-PA Humano

A manutenção e propagação da construção do DNAC que codifica t-PA humano serão feitas em culturas bacterianas usuais. Os estoques em glicerina de todos os clones seriam mantidos e estocados a -70°C.

Exemplo 5

Expressão Transiente e Estável de Proteínas Recombinantes em Células CHO-K1

A expressão transiente e estável do t-PA humano foi feita usando células do ovário do *hamster* chinês (CHO), uma linhagem de células de mamífero que tem aprovação da FDA para produzir proteínas terapêuticas. A expressão transiente é útil para verificar a expressão de uma construção e para obter rapidamente pequenas quantidades de uma proteína recombinante.

A expressão das proteínas seria analisada adicionalmente usando ferramentas analíticas, tais como *Western blot*, e ensaios funcionais.

Exemplo 6

Purificação do Ativador de Plasminogênio Tecidual Recombinante

Depois do estabelecimento de uma linhagem de células isentas de contaminantes, conforme as orientações das agências reguladoras, que superexpressam a proteína recombinante desejada, as estratégias de purificação almejarão a economia do processo, rapidez para lançar no mercado, capacidade de alta produção, reprodutibilidade, e pureza máxima do produto com estabilidade funcional e integridade estrutural, como os objetivos mais importantes. Para esta finalidade, deveria ser explorada uma abordagem combinatória com filtração (filtração com fluxo normal e tangencial) e cromatografia. Os requisitos para qualificação do processo e os estudos dos critérios de aceitação serão conduzidos em 3 lotes.

Conseqüentemente, a presente invenção considera as seguintes etapas no processo de purificação e/ou métodos usuais conhecidos por si próprios:

- a. Clarificação e concentração inicial do caldo de cultura bruto, usando procedimentos de filtração com fluxo normal e tangencial;
- 5 b. Ultrafiltração/Filtração por Diálise (baseadas em filtração sob fluxo tangencial);
- c. Etapa Cromatográfica I: cromatografia por afinidade usando heparina, lisina, quelato metálico (zinco) em Sepharose, e Mabs imobilizado sobre Sepharose. Mais preferivelmente, será usada lisina em Sepharose nas
- 10 operações unitárias a jusante;
- e. Etapa Cromatográfica II: cromatografia de troca aniônica, usando DEAE-celulose;
- f. Remoção dos vírus e filtração estéril;
- 15 g. Remoção de endotoxinas.

Nota: Adicionalmente, será usado um fluxo para atravessar baseado em trocadores de ânions tais como sulfato de celulose, para a ligação seletiva de contaminantes do processo, vírus endógenos/adventícios e frações extraíveis da coluna.

20 Exemplo 7

Estabelecimento da Identidade da Proteína-alvo Usando Métodos Bioquímicos, Imunológicos e Físico-químicos

A recuperação percentual da proteína total em cada estágio será quantificada usando o procedimento com ácido bicinonínico (BCA) e o método de ligação com corante de Bradford. A concentração da proteína-alvo

25 será determinada rotineiramente em cada estágio da purificação, usando ensaios baseados em enzimas altamente específicos e confiáveis, tal como captura por ELISA, usando anticorpos policlonais/monoclonais padronizados para t-PA com seqüência nativa. A análise *Western* qualitativa e específica

30 para o alvo será seguida em cada estágio. Serão empregadas cromatografia em fase reversa, focalização isoeletrica e eletroforese bidimensional em gel para avaliar o produto purificado. A análise estrutural secundária seria exa-

minada usando dicroísmo circular de UV extremo. A massa molecular e o estado oligomérico serão investigados usando exclusão por tamanho e MALDI-TOF. As investigações focarão também sobre a estabilidade da proteína em relação ao pH e temperatura.

<110> Avestha Gengraine Technologies Pvt Ltd.
Morawala Patell, Villoo

<120> Método para produzir uma forma obtida por bioengenharia
do ativador de plasminogênio tecidual

<130> 1

<150> 673/CHE/2005

<151> 2005-06-02

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1687

<212> DNA

<213> Humano

<220>

<221> exon

<222> (1)..(1687)

<400> 1

atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt gga

48

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

1

5

10

15

gca gtc ttc gtt tgc ccc agc cag gaa atc cat gcc cga ttc aga aga

96

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser Gln Glu Ile His Ala Arg Phe Arg Arg

20

25

30

gga gcc aga tct tac caa gtg atc tgc aga gat gaa aaa acg cag atg

144

Gly Ala Arg Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met

35

40

45

ata tac cag caa cat cag tca tgg ctg cgc cct gtg ctc aga agc aac
192

Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn

50

55

60

cgg gtg gaa tat tgc tgg tgc aac agt ggc agg gca cag tgc cac tca
240

Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly Arg Ala Gln Cys His Ser

65

70

75

80

gtg cct gtc aaa agt tgc agc gag cca agg tgt ttc aac ggg ggc acc
288

Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn Gly Gly Thr

85

90

95

tgc cag cag gcc ctg tac ttc tca gat ttc gtg tgc cag tgc ccc gaa
336

Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu

100

105

110

gga ttt gct ggg aag tgc tgt gaa ata gat acc agg gcc acg tgc tac
384

Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr

115

120

125

gag gac cag gcc atc agc tac agg ggc aat tgg agc aca gcg gag agt
432

Glu Asp Gln Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Asn Trp Ser Thr Ala Glu Ser

130

135

140

ggc gcc gag tgc acc aac tgg caa agc agc gcg ttg gcc cag aag ccc
480

Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp Gln Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro

145

150

155

160

tac agc ggg cgg agg cca gat gcc atc agg ctg ggc ctg ggg aac cac
528
Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg Leu Gly Leu Gly Asn His

165

170

175

aac tac tgc aga aac cca gat cga gac tca aag ccc tgg tgc tac gtc
576
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp Cys Tyr Val

180

185

190

ttt aag gcg ggg aag tac agc tca gag ttc tgc agc acc cct gcc tgc
624
Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro Ala Cys

195

200

205

tct gag gga aac agt gac tgc tac ttt ggg aat ggg tca gcc tac cgt
672
Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg

210

215

220

ggc acg cac agc ctc acc gag tcg ggt gcc tcc tgc ctc ccg tgg aat
720
Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn

225

230

235

240

tcc atg atc ctg ata ggc aat gtt tac aca gca cag aac ccc agt gcc
768
Ser Met Ile Leu Ile Gly Asn Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala

245

250

255

cag gca ctg ggc ctg ggc aaa cat aat tac tgc cgg aat cct gat ggg
816
Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly

260

265

270

gat gcc aag ccc tgg tgc cac gtg ctg aag aac cgc agg ctg acg tgg
864
Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr Trp

275

280

285

gag tac tgt gat gtg ccc tcc tgc tcc acc tgc ggc ctg aga cag tac
912
Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr

290

295

300

agc cag cct cag ttt cgc atc aaa gga ggg ctc ttc gcc gac atc gcc
960
Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala

305

310

315

320

tcc cac ccc tgg cag gct gcc atc ttt gcc gcg gcc gcg gcg tcg ccc
1008
Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ser Pro

325

330

335

gga gag cgg ttc ctg tgc ggg ggc ata ctc atc agc tcc tgc tgg att
1056
Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile

340

345

350

ctc tct gcc gcc cac tgc ttc cag gag agg ttt ccg ccc cac cac ctg
1104
Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu

355

360

365

acg gtg atc ttg ggc aga aca tac cgg gtg gtc cct gcc gag gag gag
1152
Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu

370

375

380

cag aaa ttt gaa gtc gaa aaa tac att gtc cat aag gaa ttc gat gat
1200

Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp

385

390

395

400

gac act tac gac aat gac att gog ctg ctg cag ctg aaa tcg gat tcg
1248

Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser

405

410

415

tcc cgc tgt gcc cag gag agc agc gtg gtc cgc act gtg tgc ctt ccc
1296

Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro

420

425

430

ccg gcg gac ctg cag ctg ccg gac tgg acg gag tgt gag ctc tcc gcc
1344

Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly

435

440

445

tac gcc aag cat gag gcc ttg tct cct ttc tat tcg gag cgg ctg aag
1392

Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys

450

455

460

gag gct cat gtc aga ctg tac oca tcc agc cgc tgc aca tca caa cat
1440

Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His

465

470

475

480

tta ctt aac aga aca gtc acc gac aac atg ctg tgt got gga gac act
1488

Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr
 485 490 495

cgg agc ggc ggg ccc cag gca aac ttg cac gac gcc tgc cag ggc gat
 1536
 Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp
 500 505 510

tgc gga ggc ccc ctg gtg tgt ctg aac gat ggc cgc atg act ttg gtg
 1584
 Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val
 515 520 525

ggc atc atc agc tgg ggc ctg ggc tgt gga cag aag gat gtc ccg ggt
 1632
 Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly
 530 535 540

gtg tac acc aag gtt acc aac tac cta gac tgg att cgt gac aac atg
 1680
 Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met
 545 550 555 560

cga ccg t
 1687
 Arg Pro

- <210> 2
 <211> 1689
 <212> DNA
 5 <213> Humano
 <220>

<221> exon

<222> (1)..(1689)

<400> 2

atg gat gcc atg aag aga ggt ctg tgc tgc gtc ttg ctg ctg tgc gga

48

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

1

5

10

15

gcg gtc ttc gtg tcc ccc tcc cag gaa atc cac gca agg ttc agg cgg

96

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser Gln Glu Ile His Ala Arg Phe Arg Arg

20

25

30

ggc gcc cgg tog tat cag gtc atc tgc cgt gat gag aag acc cag atg

144

Gly Ala Arg Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met

35

40

45

atc tac cag cag cac caa tcc tgg ctg aga ccc gtc ctg agg tcc aac

192

Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn

50

55

60

cgg gtg gag tac tgt tgg tgt aac agt ggt cga gcc caa tgc cat tcc

240

Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly Arg Ala Gln Cys His Ser

65

70

75

80

gtt ccc gtg aag agc tgt tcc gag ccc cgc tgc ttc aac ggc ggc aca

288

Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn Gly Gly Thr

85

90

95

tgt cag cag gct ctt tac ttt tca gat ttc gtg tgc caa tgt cct gaa

336

Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu
 100 105 110

ggc ttc gcc ggc aag tgc tgt gag atc gac aca cgc ggc aca tgt tac
 384
 Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr
 115 120 125

gag gat cag ggg ata tcc tac cgc ggt aac tgg tgc acg gca gag tcc
 432
 Glu Asp Gln Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Asn Trp Ser Thr Ala Glu Ser
 130 135 140

gga gcc gaa tgt acc aac tgg cag agt tcc gcc ctg ggc cag aag cca
 480
 Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp Gln Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro
 145 150 155 160

tac tcc ggg cgc cgg cca gac gcc atc cgc ctg ggc cta ggc aac cac
 528
 Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg Leu Gly Leu Gly Asn His
 165 170 175

aac tac tgt cga aac ccc gac agg gac tcc aag ccc tgg tgt tac gtc
 576
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp Cys Tyr Val
 180 185 190

ttc aag gca ggt aag tac tcc tcc gag ttc tgc tct acc cca gcc tgc
 624
 Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro Ala Cys
 195 200 205

tgc gaa ggt aat tct gac tgc tat ttt ggt aac ggc agt gcc tac cgc
 672

Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg

210

215

220

ggc acg cac tcc ctg aca gag tcc gga gcc tca tgc ctg cca tgg aac

720

Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn

225

230

235

240

tcc atg ata tta atc ggc aac gtc tac acc gcc cag aac ccg agc gcg

768

Ser Met Ile Leu Ile Gly Asn Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala

245

250

255

cag gcc ctg ggc ctc ggc aag cac aac tac tgt cgg aat cct gac ggg

816

Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly

260

265

270

gac gca aaa cca tgg tgc cac gtc ttg aag aac cgc cgc ctc aca tgg

864

Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr Trp

275

280

285

gag tac tgc gac gtg ccc tcg tgt tcg acc tgc gga ctc aga cag tac

912

Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr

290

295

300

tcg cag ccc cag ttc cgg atc aaa gga ggc tta ttc gcc gat atc gct

960

Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala

305

310

315

320

tgg cac ccc tgg caa gcc gcc atc ttc gca gcc gcg gcc gcg tcc ccc
1008

Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ser Pro

325

330

335

ggg gaa cgc ttc ctg tgc ggt ggc atc ctg atc agt agt tgc tgg atc
1056

Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile

340

345

350

ctg tca gcg gcc cac tgc ttc cag gag agg ttt ccc cca cac cac ctg
1104

Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu

355

360

365

act gtc atc ctg gga aga acc tac cgc gtg gtg cca ggg gaa gag gag
1152

Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu

370

375

380

cag aaa ttc gaa gtg gag aag tac att gtg cat aag gaa ttc gac gac
1200

Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp

385

390

395

400

gac acg tac gac aac gac atc gcc ttg ctg cag ctg aag tgg gac agc
1248

Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser

405

410

415

tcc cgc tgc gcc caa gaa tog tcc gtg gtt agg acg gtg tgc etc ccc
1296

Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro

420

425

430

cct gct gac ctg cag ctg ccg gac tgg acg gag tgt gaa ctg tcg ggg
 1344
 Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly
 435 440 445

tac ggc aag cac gag gcg ctc tcc cca ttc tac agc gag cgc ctc aag
 1392
 Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys
 450 455 460

gaa gcc cac gtg cgc ctg tac ccc agt tcc agg tgc acc tct cag cac
 1440
 Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His
 465 470 475 480

ttg ctg aac cgc act gtt acc gac aat atg ctg tgt gcc ggt gat acc
 1488
 Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr
 485 490 495

agg tcc ggg ggc cct cag gcc aat ctg cat gac gcg tgc cag ggg gac
 1536
 Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp
 500 505 510

tcc ggc ggg ccc ctg gtg tgt ttg aac gat gga agg atg acc ctg gtc
 1584
 Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val
 515 520 525

ggg atc atc tct tgg ggc ctg ggc tgc ggc cag aag gat gtg cca ggc
 1632
 Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly
 530 535 540

gtc tac acc aag gtg acg aac tac ctg gac tgg att cgc gac aac atg
 1680
 Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met
 545 550 555 560

agg ccc tga
 1689
 Arg Pro

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de um Ativador de Plasminogênio Tecidual biologicamente ativo *in vivo*, compreendendo as etapas de:

5 (a) desenvolver, sob condições nutrientes apropriadas, células hospedeiras transformadas ou transfectadas com uma seqüência de DNA isolada selecionada no grupo que consiste em (i) as seqüências de DNA enunciadas em SEQ ID Nº: 1 e SEQ ID Nº: 2, ou (ii) seqüências de DNA que hibridizam sob condições severas para as seqüências de DNA definidas em (i) e (ii) ou seus filamentos complementares; e

10 (b) isolar o dito produto do Ativador de Plasminogênio Tecidual recombinante a partir delas.

2. Processo para a preparação de um produto do Ativador de Plasminogênio Tecidual biologicamente ativo *in vivo*, compreendendo as etapas de transformar uma célula hospedeira com uma seqüência de DNA sintetizada representada em SEQ ID Nº: 1 ou 2, codificar o Ativador de Plasminogênio Tecidual e isolar o dito produto da dita célula hospedeira ou do meio do seu crescimento.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, onde as ditas células hospedeiras são células de mamífero.

20 4. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, onde as ditas células hospedeiras são, de preferência, células CHO K1.

5. Processo para a produção de uma forma solúvel de Ativador de Plasminogênio Tecidual, que tem a propriedade biológica *in vivo* de tratar infarto de miocárdio e acidente vascular cerebral, compreendendo as etapas de:

25 (a) desenvolver, sob condições nutrientes apropriadas, células de mamífero que compreendem DNA promotor que não o DNA promotor de ativador de plasminogênio tecidual, ligado operacionalmente ao DNA que codifica a seqüência de aminoácidos de eritropoietina madura de SEQ ID Nº: 3; e

30 (b) isolar o dito polipeptídeo eritropoietina glicosilado expressado pelas ditas células.

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

7. Processo para a preparação de um produto de Ativador de Plasminogênio Tecidual biologicamente ativo *in vivo*, compreendendo as etapas de transformar ma célula hospedeira com uma construção de vetor da Figura 7 ou 8 e isolar o dito produto de Ativador de Plasminogênio Tecidual da dita célula hospedeira ou do meio de seu crescimento.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 7, onde o dito vetor é um vetor de expressão específico de células de mamífero e mais preferivelmente o vetor representado nas Figuras 7 e 8.

9. Composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz de Ativador de Plasminogênio Tecidual e um diluente, adjuvante ou carreador farmacêuticamente aceitável, onde o dito Ativador de Plasminogênio Tecidual é purificado a partir de células de mamífero desenvolvidas em cultura.

FIG. 1
 Alinhamento emparelhado de seqüências das versões não-otimizadas e otimizadas com códons da seqüência de nucleotídeos do DNA que codifica o ativador de plasminogênio tecidual

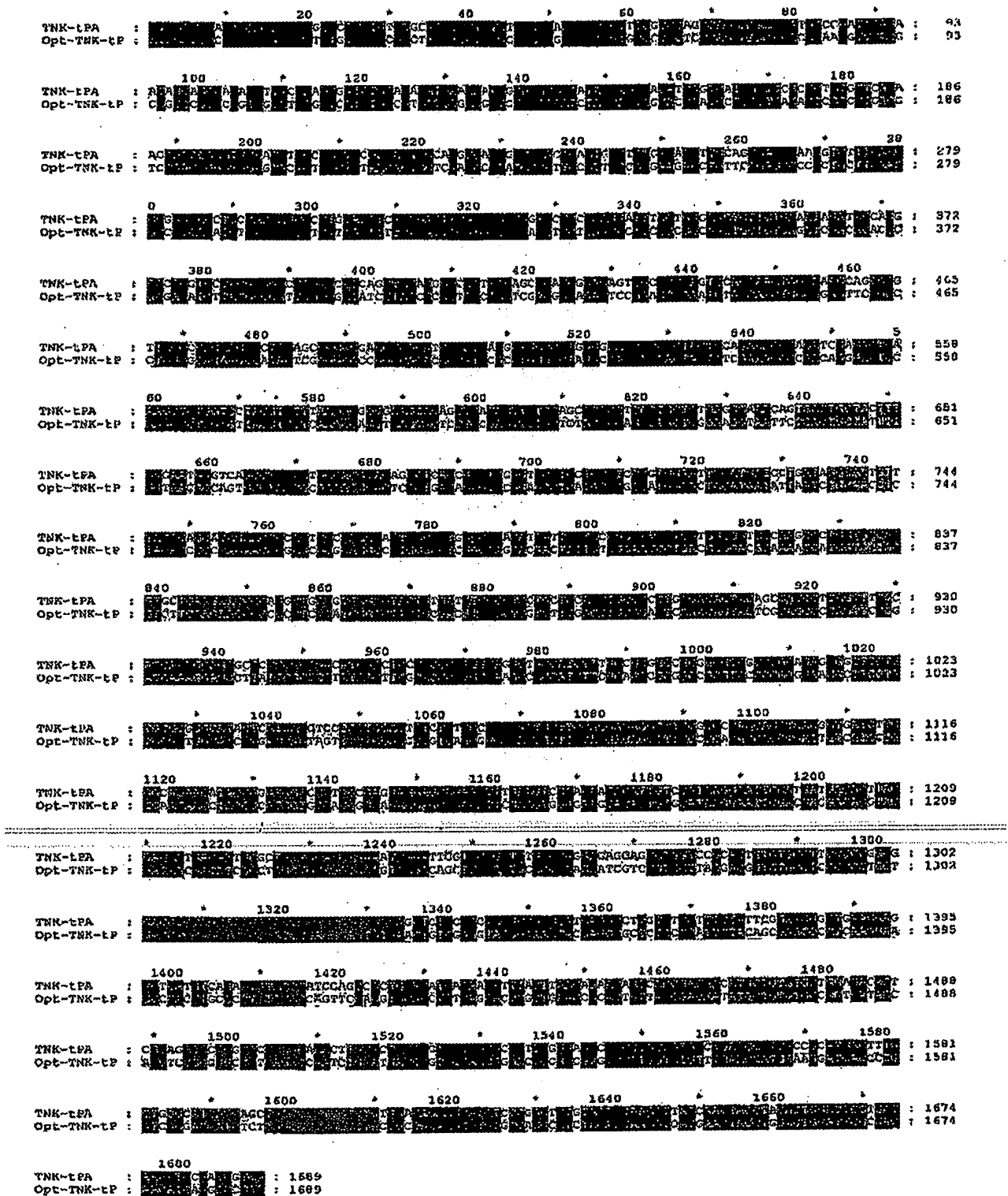


FIG. 2
 Alinhamento de seqüências do DNAC TENECT sintetizado de forma inusitada (TNK-IPA_sintético) com a seqüência estabelecida do gene TNK-tPA

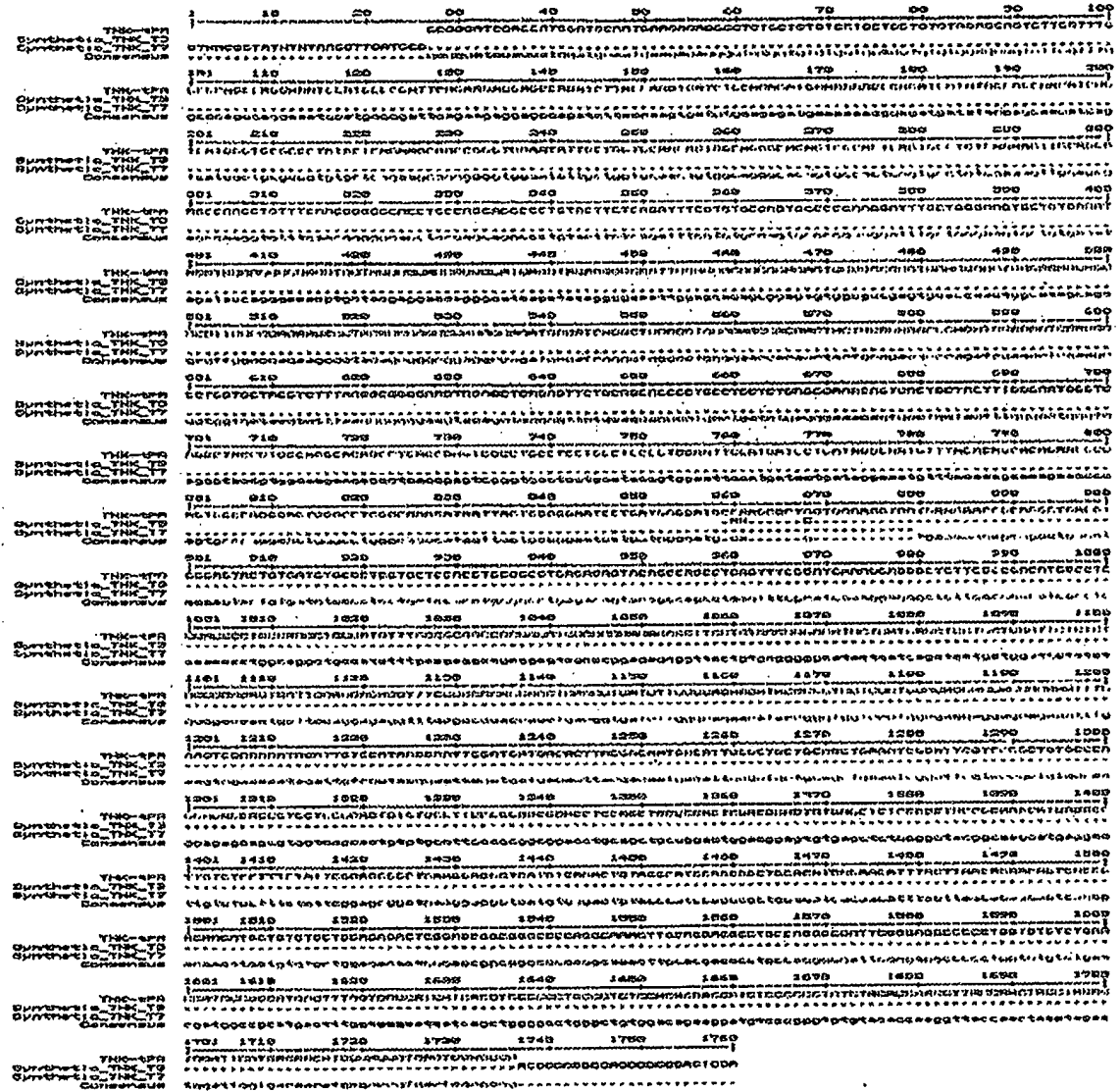


FIG. 3
Alinhamento de seqüências do DNac TENECT-Opt sintetizado de forma inusitada (TNK-tPA-Opt_sintético) com a seqüência estabelecida do gene TNK-tPA-Opt;

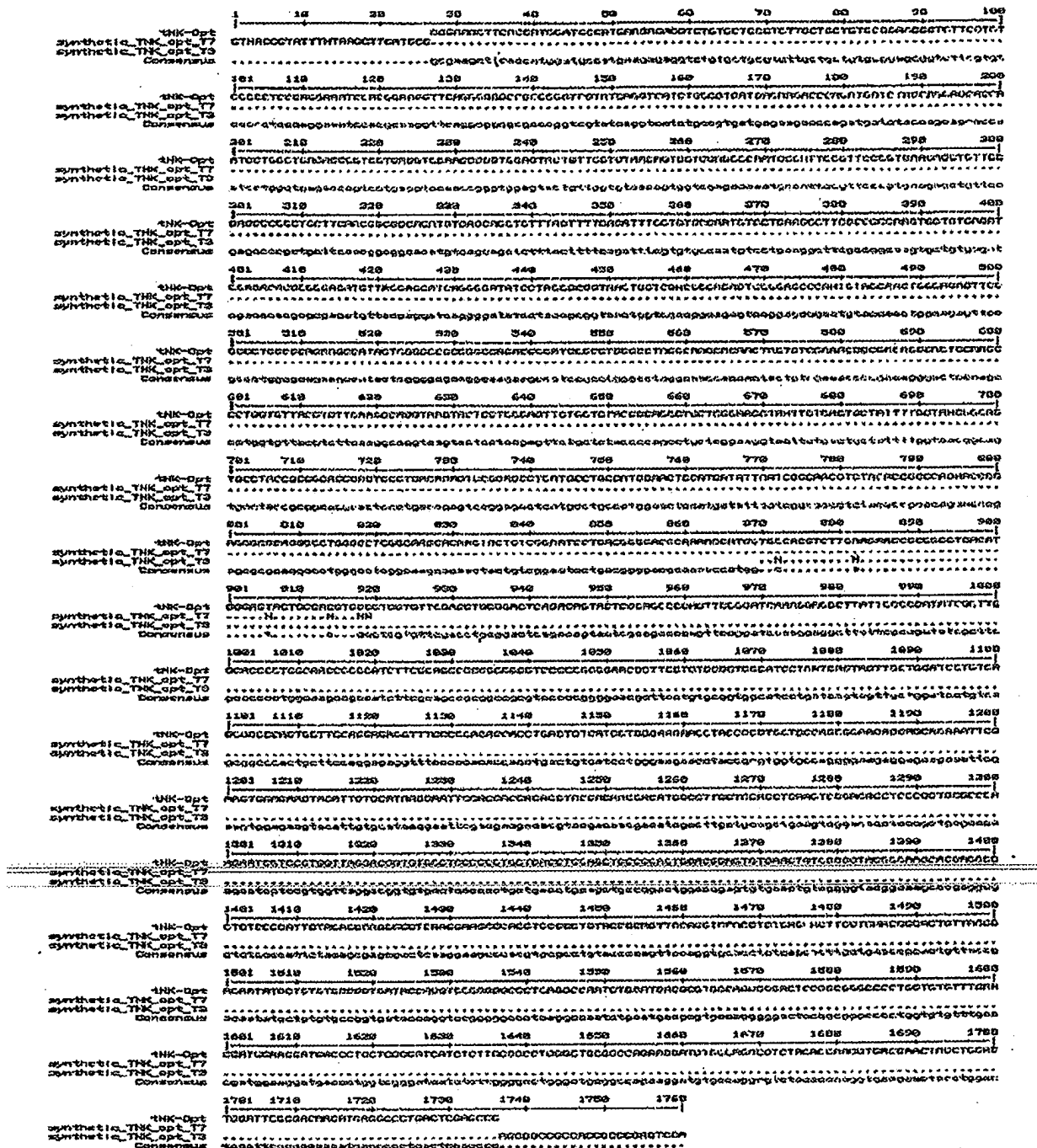
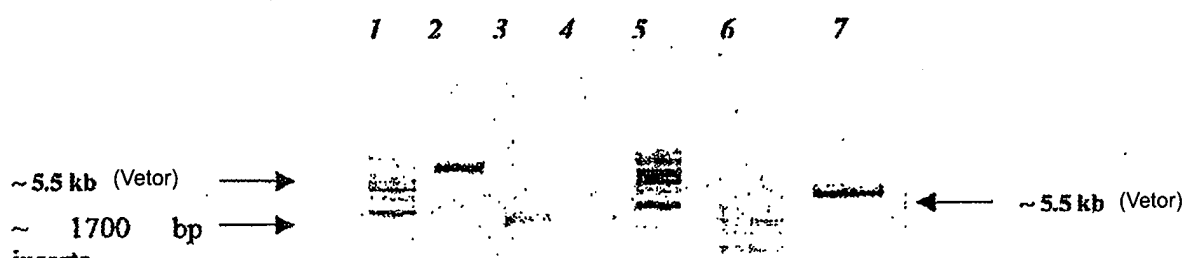


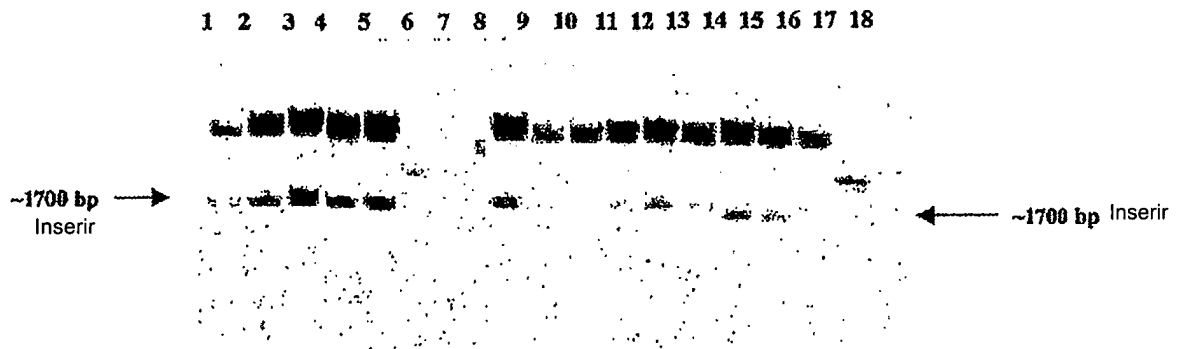
FIG. 4
Fragmentos de TENECT, TEECT-Opt e pcDNA3.1D/V5-His digeridos por restrição e purificados em gel



Fileiras 1, 5 e 6, escada de 1 kb (marcador de DNA)
Fileira 2, pcDNA3.1D/V5-His/BamHI/XhoI – purificado em gel
Fileira 3, TENECT-Opt/HindIII/XhoI – purificado em gel
Fileira 4, TENECT/BamHI/XhoI – purificado em gel
Fileira 5, pcDNA3.1D/V5-His/HindIII/XhoI – purificado em gel

FIG. 5

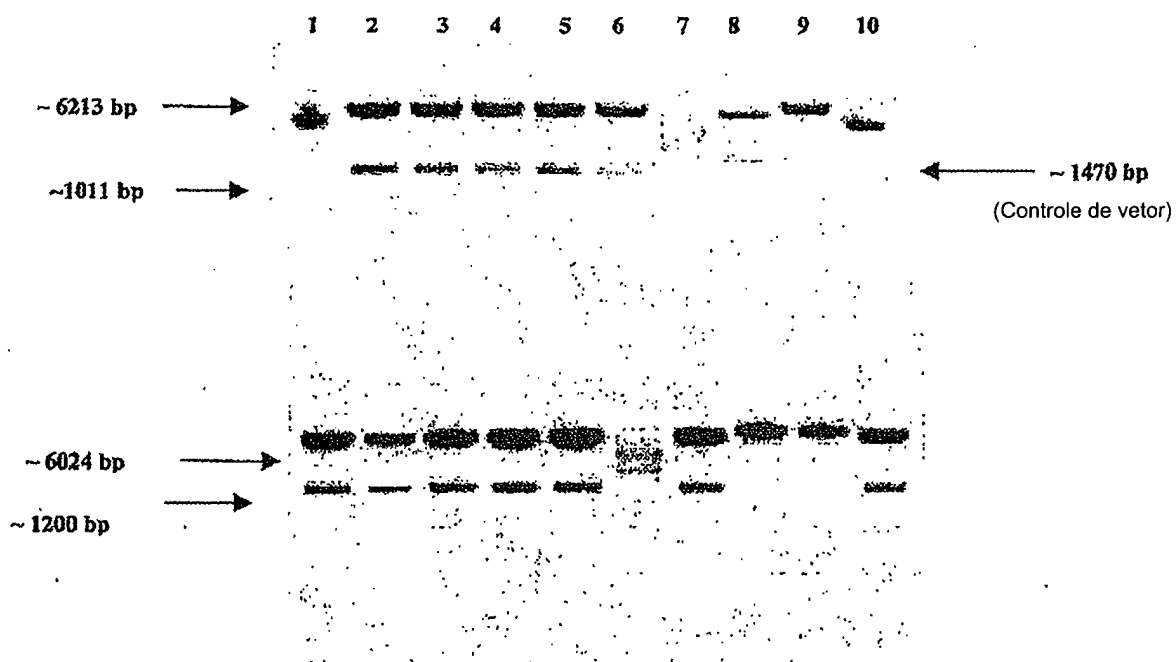
Análise da digestão por restrição de clones putativos de pcDNA3.1-TENECT D/V5-His/TNK-tPA e pcDN3.1-TENECT-Opt/V5-His/TNK-tPA-Opt



Fileira 1 a Fileira 5, Clones pcDNA3.1-TENECT/V5-His/TNK-tPA – digeridos com BamHI/XhoI
 Fileira 6, pBSK/TENECT – digerido com BamHI/XhoI
 Fileira 7, escada de 1 kb (marcador de DNA)
 Fileiras 8 a 16, Clones pcDNA3.1-TENECT-Opt/V5-His/TNK—tPA-Opt – digeridos com HindIII/XhoI
 Fileira 17, pBSK/TENECT-Opt – digerido com HindIII/XhoI
 Fileira 18, escada de 1 kb (marcador de DNA)

FIG. 6

Análise da digestão por restrição dos clones PcDNA3.1-TENECT/V5-His/TNK-tPA e PcDNA3.1-TENECT-Opt/V5-His/TNK-tPA-Opt, usando enzimas que clivam os DNAC's de TENECT e TENECT-Opt internamente



Quadro Superior

- Fileira 1, pcDNA3.1-TENECT/V5-His/TNK-tPA – não-cortado
- Fileiras 2 a 6, Clones pcDNA3.1-TENECT/V5-His/TNK-tPA – digestão com BglII
- Fileira 7, escada de 1 kb (marcador de DNA)
- Fileira 8, Vetor – digestão com BglII
- Fileira 9, Vetor – digestão com HindIII/EcoRI
- Fileira 10, pcDNA3.1-TENECT-Opt/V5-His/TNK-tPA – não-cortado

Quadro Inferior

- Fileiras 1 a 5, Clones pcDNA3.1-TENECT-Opt/V5-His/TNK-tPA-Opt – digestão com HindIII/EcoRI
- Fileira 6, escada de 1 kb (marcador de DNA)
- Fileiras 7 a 10, Clones pcDNA3.1-TENECT-Opt/V5-His/TNK-tPA-Opt – digestão com HindIII/EcoRI

FIG. 7
Mapa de Construções: PcDNA3.1-TENECT/V5-His/TNA-tPA

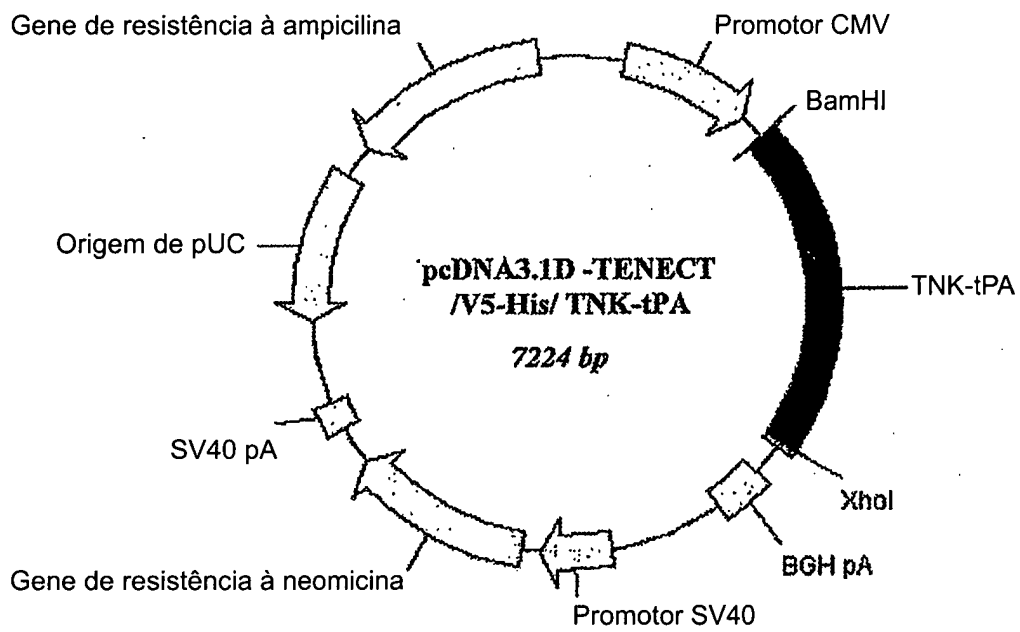
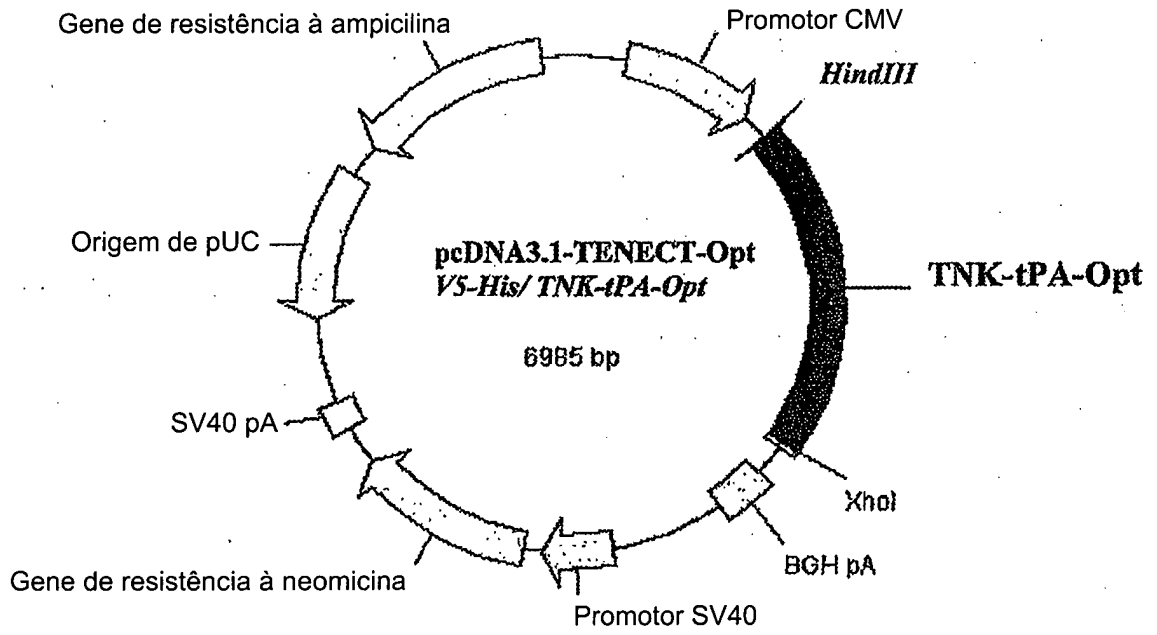


FIG. 8
Mapa de Construções: PcDNA3.1-TENECT-Opt/V5-His/TNK-tPA-Opt



RESUMO

Patente de Invenção: "**MÉTODO PARA PRODUZIR UMA FORMA OBTIDA POR BIOENGENHARIA DO ATIVADOR DE PLASMINOGÊNIO TECIDUAL**".

5 A presente invenção refere-se ao método recombinante usado para a produção de uma forma solúvel de uma variante do ativador de plasminogênio tecidual. Nesta variante, a treonina na posição 103 do ativador de plasminogênio tecidual endógeno é substituída por uma asparagina, levando a um novo sítio de glicosilação. Na posição 117 do ativador de plasminogênio tecidual, a asparagina foi substituída por glutamina, levando à remoção de um sítio de glicosilação ligado a N. Na posição 296-299, os aminoácidos lisina, histidina, arginina, e arginina foram substituídos por quatro aminoácidos alanina. A invenção refere-se ainda à síntese inusitada da seqüência de ácidos nucleicos que codifica o ativador do plasminogênio tecidual, transformação das seqüências de ácidos nucleicos construídas em bactérias competentes e subclonagem das mesmas em vetores de expressão em mamíferos para a expressão da proteína desejada. As construções de DNA que compreendem os elementos de controle associados com o gene de interesse foram descritas. O ativador do plasminogênio tecidual humano recombinante, de acordo com a invenção, e os seus sais e derivados funcionais, podem compreender o ingrediente ativo de composições farmacêuticas para o tratamento de infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral em pacientes. Estas composições são ainda outro aspecto da presente invenção.

10

15

20