

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2003.08.18**

(30) Prioridade(s): **2002.08.19 US 404591 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.06.15**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.10.14**
013/2010

(73) Titular(es):

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY**

**1705 EL CAMINO REAL PALO ALTO, CA 94306-
1106** **US**

(72) Inventor(es):

JAMES ROBERT SWARTZ **US**

MICHAEL CHRISTOPHER JEWETT **US**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODOS MELHORADOS PARA A SÍNTESE DE PROTEÍNAS IN VITRO**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO**"Métodos melhorados para a síntese de proteínas *in vitro*"****ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

A síntese de proteínas é um processo biológico fundamental que está na base do desenvolvimento de métodos terapêuticos, de diagnóstico com polipéptidos e enzimas industriais. Com o surgimento da tecnologia de ADN recombinante (ADNr) tornou-se possível orientar a maquinaria catalítica da célula para produzir uma proteína desejada. Isto pode ser conseguido no ambiente celular ou *in vitro*, utilizando extractos derivados de células.

Na última década, a produtividade dos sistemas isentos de células melhorou 2 ordens de grandeza, de cerca de 5 µg/ml-h para cerca de 500 µg/ml-h. Este feito tornou a síntese de proteínas *in vitro* uma técnica prática para pesquisa à escala laboratorial e proporciona uma tecnologia de base para a expressão de proteínas com elevado rendimento. Também começa a sugerir a possibilidade de utilizar tecnologias isentas de células como um meio alternativo para a produção de medicamentos à base de proteínas em grande escala, *in vivo*.

A síntese de proteínas isenta de células oferece várias vantagens em relação aos métodos de expressão de proteínas convencionais, *in vivo*. Os sistemas isentos de células podem dirigir a maioria, senão todos os recursos metabólicos da célula para a produção exclusiva de uma proteína. Além disso, a ausência de uma parede celular e componentes membranares *in vitro* é uma vantagem, uma vez que permite o controlo do meio ambiente da síntese. Por exemplo, os níveis de ARNt podem ser alterados para reflectir a utilização de códons dos genes expressos. O potencial redox, pH, ou força iónica podem também ser alterados com maior flexibilidade do que *in vivo*, uma vez que não há a preocupação em relação ao crescimento ou à viabilidade celulares. Além disso, a recuperação directa de produtos proteicos enrolados correctamente, purificados, pode ser facilmente conseguida.

A tradução *in vitro* também é reconhecida pela sua capacidade para incorporar aminoácidos não naturais e marcados com isótopos, bem como pela sua capacidade para produzir proteínas que são instáveis, insolúveis ou citotóxicas *in vivo*. Além disso, a síntese de proteínas isenta de células poderá ter um papel para revolucionar a manipulação de proteínas e tecnologias de pesquisa proteómicas. O método isento de células contorna os processos laboriosos necessários para clonar e transformar células para a expressão de novos produtos de genes *in vivo*, e está a tornar-se uma tecnologia de base para este campo.

Apesar de todas as características promissoras da síntese de proteínas isenta de células, a sua utilização prática e implementação em grande escala têm sido limitadas por vários obstáculos. De entre estes são importantes os tempos de reacção curtos e as baixas taxas de produção de proteínas, que levam a baixos rendimentos de síntese de proteínas e custos excessivos com reagentes. O trabalho pioneiro de Spirin *et al.* (1988) *Science* 242:1162-1164 inicialmente ultrapassou o problema dos curtos tempos de reacção com o desenvolvimento de um sistema de fluxo contínuo. Muitos laboratórios duplicaram e melhoraram este trabalho, mas todos utilizaram, essencialmente, métodos em que constantemente se fornecem substratos à câmara de reacção. Esta abordagem aumenta a duração da reacção de tradução e o rendimento de proteínas em comparação com o sistema descontínuo. No entanto, é ineficiente por utilizar reagentes dispendiosos, geralmente produz um produto diluído e não proporcionou melhorias significativas nas taxas de produção.

O sistema descontínuo convencional oferece várias vantagens em relação a estes esquemas contínuos e semi-contínuos, que incluem facilidade de escalamento, reprodutibilidade, maiores taxas de produção de proteínas, conveniência, aplicabilidade em formatos de múltiplos componentes, para uma expressão de rendimento elevado e uma utilização do substrato mais eficiente. Estas vantagens tornam a melhoria da produtividade dos sistemas descontínuos crucial para uma utilização industrial da síntese de proteínas isenta de células. Recentemente, foram observados diversos factos que têm vindo a elucidar o motivo pelo qual a síntese de proteínas

termina precocemente em reacções descontínuas. Além disso, Kim e Swartz (2001) *Biotechnol Bioeng.* 74:309-316; Kim e Swartz (1999) *Biotechnol Bioeng.* 66:180-188 mostraram que a duração da reacção descontínua convencional pode ser aumentada de 20 minutos até 2 horas, com a utilização de novos sistemas de regeneração de energia. Apesar destas abordagens serem promissoras, há ainda uma grande necessidade de desenvolver um processo comercial economicamente viável. Aumentar o rendimento de produto melhorando a taxa de produção de proteína e aumentando o tempo de reacção é uma parte essencial para preencher este requisito. Reduzir o custo do reagente de síntese de proteínas, em especial a fonte de energia química, é outra parte importante.

Literatura relevante

Patente US 6337191 B1, Swartz et al. Kim e Swartz (2000) *Biotechnol Prog.* 16:385-390; Kim e Swartz (2000) *Biotechnol Lett.* 22:1537-1542; Kim e Choi (2000) *J Biotechnol.* 84:27-32; Kim et al. (1996) *Eur J Biochem.* 239: 881-886.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

São proporcionados composições e métodos para a síntese *in vitro* de moléculas biológicas. Em particular, a presente invenção proporciona uma mistura reaccional para a transcrição *in vitro* de ARNm e/ou a tradução de polipéptidos, em que a mistura compreende:

um extracto de células bacterianas crescidas num meio contendo glucose e compreendendo vesículas de membrana invertidas que contêm componentes da cadeia respiratória e a F_1F_0 ATPase; componentes da maquinaria de síntese de polipéptidos e/ou ARNm; um molde para a transcrição do referido ARNm e/ou a tradução do referido polipéptido; nucleótidos e/ou aminoácidos para a síntese do referido ARNm e/ou polipéptidos; e cofactores, enzimas e outros reagentes necessários para a referida transcrição e/ou tradução;

em que a referida mistura reaccional é substancialmente isenta de polietilenoglicol; compreende magnésio numa concentração

desde cerca de 5 mM a cerca de 20 mM e compreende um ou mais de entre espermina, espermidina e putrescina;

em que a mistura reaccional proporciona condições que permitem a transcrição *in vitro* de ARNm e/ou a tradução de polipéptidos; e a activação da fosforilação oxidativa, que é sensível a inibidores da cadeia de transporte de electrões.

As condições optimizadas para a síntese permitem a activação *in vitro* da fosforilação oxidativa na mistura reaccional, que proporciona um maior rendimento do produto de síntese. As condições também proporcionam um maior rendimento de polipéptidos biologicamente activos, ao melhorar as condições para o enrolamento. A activação da fosforilação oxidativa pode ser evidenciada pela capacidade da mistura reaccional gerar a síntese de um polímero na ausência de fontes de energia secundárias actualmente utilizadas, ou intermediários glicolíticos. A activação da fosforilação oxidativa também pode ser demonstrada pela sensibilidade da mistura reaccional a inibidores específicos desta via.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é um gráfico que mostra a síntese de proteínas *in vitro* com o sistema de componentes da presente invenção, na ausência e na presença de piruvato adicionado. Mesmo na ausência de piruvato adicionado, ocorre síntese de proteínas significativa.

A Figura 2 é um gráfico de barras que mostra o nível de síntese de proteínas, comparando extractos de bactérias crescidas sob diferentes condições. Pode ver-se que o extracto celular produzido a partir de bactérias crescidas num meio contendo glucose proporciona resultados significativamente melhores, como também a ausência de PEG na mistura reaccional.

Figura 3. Dependência de magnésio do sistema. Incubaram-se misturas reaccionais de 15 μ l durante 6 horas com quantidades crescentes de Mg. A concentração de Mg apresentada inclui o Mg presente no extracto celular. A expressão de CAT foi determinada a partir da incorporação de ^{14}C -leucina. As barras

de erro representam o desvio padrão de três a oito experiências em separado.

A Figura 4 é um gráfico que compara os níveis de fosfato em reacções de síntese *in vitro*.

A Figura 5 é um gráfico que mostra a capacidade dos métodos presentes manterem os níveis de pH.

A Figura 6 é um gráfico de barras que mostra o efeito do oxigénio e HQNO, um inibidor da fosforilação oxidativa, na síntese *in vitro* utilizando a presente invenção.

Figura 7. Experiências de alimentação descontínua numa escala de 5 ml com o novo sistema de síntese de proteínas *in vitro*.

Figura 8. Expressão de CAT, comparando o sistema PANox com piruvato e o sistema Cytomim com piruvato.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS CONCRETIZAÇÕES

Proporcionam-se composições e métodos para uma melhor transcrição *in vitro* de ARNm e/ou tradução de polipéptidos, em que é activada a fosforilação oxidativa, proporcionando maiores rendimentos e uma melhor utilização de fontes de energia. O sistema é aqui designado por sistema Cytomim. Obtém-se um rendimento melhorado através de uma combinação de condições reaccionais, as quais podem incluir, sem limitação, a utilização de extractos biológicos derivados de bactérias crescidas num meio contendo glucose; uma ausência de polietilenoglicol; e uma concentração de magnésio optimizada.

A síntese de proteínas isenta de células explora o poder catalítico da maquinaria celular. A obtenção de rendimentos máximos de proteína *in vitro* requer um fornecimento de substrato adequado, e.g. nucleósido-trifosfatos e aminoácidos; um meio homeostático, estabilidade do catalisador e a remoção ou impedimento de produtos secundários inibitórios. A optimização de reacções sintéticas *in vitro* beneficia da recriação do estado *in vivo* de um organismo de crescimento rápido.

Os métodos e composições da presente invenção reflectem o meio ambiente citoplasmático de uma célula bacteriana e resultam em melhorias significativas na produção de proteínas e enrolamento de proteínas em relação aos métodos do estado da técnica. Adicionalmente, foi activada a via de fosforilação oxidativa. As condições reaccionais que originam este meio ambiente mais natural resultam de se proporcionar uma combinação de factores, como descrito acima. Este sistema é capaz de uma produção de proteínas significativa durante até 6 horas, numa reacção descontínua *in vitro*. De salientar que o sistema não requer a adição de fontes de energia secundárias normalmente utilizadas, tais como fosfoenolpiruvato, fosfato de creatina, fosfato de acetilo, glucose-6-fosfato, piruvato ou intermediários glicolíticos. Ao mimetizar o meio ambiente celular, obtém-se uma capacidade de síntese melhorada.

Em concretizações preferidas da invenção, utiliza-se uma mistura reaccional como aqui descrito para a síntese, em que a reacção proporciona a activação de fosforilação oxidativa. No entanto, alguns benefícios da invenção, incluindo síntese melhorada de polipéptidos activos através de condições melhoradas para o enrolamento de proteínas, não requer a activação da fosforilação oxidativa. Realizar a síntese na ausência substancial de polietilenoglicol proporciona um enrolamento melhorado; e pode também combinar-se com, por exemplo, os métodos descritos na patente U.S. 6548276.

O enrolamento, tal como aqui utilizado, refere-se à estrutura tridimensional dos polipéptidos e proteínas ou ao processo para obter esta estrutura, actuando as interacções entre resíduos de aminoácido para estabilizar a estrutura. Apesar das interacções não covalentes serem importantes para determinar a estrutura, normalmente os péptidos e proteínas de interesse terão ligações intra- ou intermoleculares formadas por dois resíduos de cisteína. Para proteínas e polipéptidos que ocorrem naturalmente ou seus derivados e variantes, o enrolamento adequado é tipicamente o arranjo que resulta numa actividade biológica óptima e pode ser convenientemente monitorizado por ensaios para actividade, e.g. ligação do ligando, actividade enzimática, etc.

Nalguns casos, por exemplo quando o produto desejado é de origem sintética, os ensaios baseados na actividade biológica terão menos significado. O enrolamento adequado destas moléculas pode ser determinado com base nas propriedades físicas, considerações energéticas, estudos de modelação e semelhantes.

O sistema Cytomim é homeostático em relação às concentrações de fosfato e pH, a duração da síntese de proteínas é significativamente prolongada e a síntese biológica pode ocorrer mesmo na ausência de fontes de energia secundárias, óbvias. Uma vantagem dos métodos é a capacidade para utilizar fontes de energia baratas para a síntese. Outra vantagem é a capacidade para produzir rendimentos mais elevados. Numa reacção comparável, o sistema Cytomim pode proporcionar rendimentos melhorados desde cerca de 2 vezes mais; de cerca de 3 vezes mais e pode ser de cerca de 8 vezes mais, ou superior, sendo a comparação baseada no sistema PANox, como descrito por Kim e Swartz (2000), *supra*.

Síntese *in vitro*, tal como aqui utilizada, refere-se à síntese isenta de células de macromoléculas biológicas numa mistura reaccional que compreende extractos biológicos e/ou reagentes definidos. A mistura reaccional irá compreender um molde para a produção da macromolécula, e.g. ADN, ARNm, etc.; monómeros para a macromolécula a sintetizar, e.g. aminoácidos, nucleótidos, etc., e os cofactores, enzimas e outros reagentes que são necessários para a síntese, e.g. ribossomas, ARNt, polimerases, factores transcripcionais, etc. Estes sistemas de reacção sintética são bem conhecidos na especialidade, e foram descritos na literatura. A reacção de síntese isenta de células pode ser realizada na forma descontínua, contínua ou semi-contínua, como é conhecido na especialidade.

O meio ambiente mais natural para a síntese utiliza extractos celulares derivados de células bacterianas crescidas em meio contendo glucose e fosfato, estando a glucose presente a uma concentração de pelo menos cerca de 0,25% (peso/volume), mais usualmente pelo menos cerca de 1%; e normalmente não mais de cerca de 4%, mais usualmente, não mais de cerca de 2%. Um exemplo deste meio é o meio 2YTPG, no entanto, um perito na especialidade deverá ter em conta que muitos meios de cultura

podem ser adaptados para este fim, uma vez que existem muitos meios publicados adequados para o crescimento de bactérias, tais como *E. coli*, utilizando quer fontes de nutrientes definidas, quer não definidas (ver Sambrook, J., E.F. Fritsch, e T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edição. Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor, NI para exemplos de meios contendo glucose).

Outra alteração importante na mistura reaccional é a ausência substancial de polietilenoglicol (PEG). Uma mistura reaccional convencional (por exemplo, ver Kim e Swartz, 2001) contém cerca de 2% de polietilenoglicol 8000. No entanto, verifica-se que este diminui o rendimento. Nos presentes métodos, as moléculas espermidina e putrescina são utilizadas no lugar de PEG. A espermina ou espermidina está presente a uma concentração de pelo menos cerca de 0,5 mM, normalmente pelo menos cerca de 1 mM, de preferência cerca de 1,5 mM, e não mais de cerca de 2,5 mM. A putrescina está presente a uma concentração de pelo menos cerca de 0,5 mM, de preferência pelo menos cerca de 1 mM, de preferência cerca de 1,5 mM, e não mais de cerca de 2,5 mM.

A concentração de magnésio na mistura reaccional afecta a síntese global. Muitas vezes há magnésio nos extractos celulares, que podem então ser ajustados com magnésio adicional para otimizar a concentração. As fontes de sais de magnésio úteis nestes métodos são conhecidas na especialidade. Numa concretização da invenção, a fonte de magnésio é glutamato de magnésio. Uma concentração preferida de magnésio é pelo menos cerca de 5 mM, normalmente pelo menos cerca de 10 mM, e de preferência pelo menos cerca de 12 mM; e a uma concentração não superior a cerca de 20 mM, normalmente não mais de cerca de 15 mM. Outras alterações que podem aumentar a síntese incluem a remoção do tampão HEPES e fosfoenolpiruvato da mistura reaccional.

O presente sistema é o primeiro a demonstrar a síntese de proteínas sem uma fonte de energia secundária, tal como PEP, fosfato de creatina e fosfato de acetilo, ou intermediário glicolítico, tal como glucose, glucose-6-fosfato e piruvato. Além disso, não requer a adição de enzimas exógenas. O piruvato pode ser utilizado para aumentar a síntese de

proteínas, embora não seja necessário, como referido na Figura 1. Reproduzindo mais eficazmente as condições citoplasmáticas e utilizando condições que são mais relevantes fisiologicamente, o novo sistema mantém uma melhor homeostase do que os sistemas isentos de células convencionalmente utilizados. O presente sistema não acumula fosfato, que se sabe que inibe a síntese de proteínas. As fontes de energia secundárias convencionais resultam na acumulação de fosfato. Para além de evitar a acumulação de um inibidor da síntese de proteínas, o presente sistema é capaz de manter um pH estável ao longo da reacção.

Como referido anteriormente, as composições e métodos da presente invenção permitem a produção de proteínas sem uma fonte de energia secundária; no entanto, pode-se adicionar uma fonte de energia secundária para suplementar a síntese. Em particular, podem-se utilizar os intermediários glicolíticos, tais como glucose, glucose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, frutose-1,6-difosfato, triosefosfato, 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato (PEP) e piruvato.

Outros compostos úteis como fonte de energia são compostos que produzem equivalentes de redução, ou activam uma via que produz equivalentes de redução. Estes compostos incluem aminoácidos, e.g. glutamato, compostos no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), citrato, cis-aconitato, isocitrato, α -cetoglutarato, succinil-CoA, succinato, fumarato, malato, oxaloacetato e glioxilato, ou compostos que podem ser dirigidos para o metabolismo central (glicólise e ciclo do TCA). É preferível que as fontes de energia secundária, se adicionadas, sejam homeostáticas em relação à acumulação de fosfato, tal como glucose ou glutamato. A fonte de energia pode ser fornecida em concentrações de pelo menos cerca de 10 mM, de pelo menos cerca de 20 mM, mais usualmente pelo menos cerca de 30 mM. Estes compostos não são normalmente utilizados em concentrações superiores a cerca de 250 mM, mais usualmente não mais de cerca de 150 mM. Podem-se adicionar quantidades adicionais da fonte de energia à mistura reaccional durante a expressão de proteína, de modo a aumentar os tempos de reacção.

O sistema pode ser utilizado sob condições aeróbias e anaeróbias. Pode-se fornecer oxigénio, em particular para reacções superiores a 15 μ l, de modo a aumentar os rendimentos de síntese. O espaço livre acima do líquido da câmara de reacção pode ser cheio com oxigénio; o oxigénio pode ser infundido na mistura reaccional; etc. O oxigénio pode ser fornecido continuamente, ou o espaço livre acima do líquido da câmara de reacção pode ser cheio de novo no decorrer da expressão de proteína para tempos de reacção mais longos. Também se podem fornecer outros aceitadores de electrões, tais como nitrato, sulfato, ou fumarato, em conjunção com a preparação de extractos celulares, de modo a que as enzimas necessárias estejam activas no extracto celular.

Não é necessário adicionar cofactores externos para activação da fosforilação oxidativa. Os compostos, tais como nicotinamida-adenina-dinucleótido (NADH), NAD^+ , ou acetil-coenzima A podem ser utilizados para suplementar os rendimentos de síntese de proteínas, mas não são necessários. A adição de ácido oxálico, um inibidor metabólico da fosfoenolpiruvato-sintetase (Pps), pode ser benéfica para aumentar os rendimentos de proteína, mas não é necessária.

O molde para a síntese de proteínas isenta de células pode ser ARNm ou ADN. A tradução de ARNm estabilizado ou a transcrição e tradução acopladas convertem a informação armazenada em proteína. O sistema acoplado, em geral utilizado em sistemas de *E. coli*, produz continuamente ARNm com um promotor reconhecível. Quer a polimerase de ARN endógena, ou uma polimerase de ARN de fago, exógena, tipicamente T7 ou SP6, é adicionada directamente à mistura reaccional. Alternativamente, o ARNm pode ser continuamente amplificado inserindo a mensagem num molde para replicase QB, uma polimerase de ARN dependente de ARN. O ARNm purificado é geralmente estabilizado por modificação química antes de ser adicionado à mistura reaccional. As nucleases podem ser removidas dos extractos, para ajudar a estabilizar os níveis de ARNm. O molde pode codificar para qualquer gene de interesse particular.

Outros sais, em particular os que são biologicamente relevantes, tais como manganésio, também podem ser

adicionados. O potássio está geralmente presente a uma concentração de pelo menos cerca de 50 mM, e não mais de cerca de 250 mM. O amónio pode estar presente, normalmente a uma concentração de não mais de 200 mM, mais usualmente a uma concentração de não mais de cerca de 100 mM. Normalmente, a reacção é mantida na gama de cerca de pH 5-10 e uma temperatura de cerca de 20°-50°C; mais usualmente, na gama de cerca de pH 6-9 e a uma temperatura de cerca de 25°-40°C. Estas gamas podem ser alargadas a condições de interesse específicas.

Podem-se adicionar à mistura reaccional inibidores metabólicos de actividade enzimática indesejável. Alternativamente, as enzimas ou factores que são responsáveis por uma actividade indesejável podem ser removidos directamente do extracto, ou o gene que codifica para a enzima indesejável pode ser inactivado ou eliminado do cromossoma.

Também se podem adicionar ao sistema vesículas, quer purificadas a partir do organismo hospedeiro (ver Muller e Blobel (1984) "In vitro translocation of bacterial proteins across the plasma membrane of Escherichia coli", PNAS 81:7421-7425), quer sintéticas. Estas podem ser utilizadas para aumentar a síntese de proteínas e o enrolamento. Verificou-se que a tecnologia aqui descrita activa o processo de fosforilação oxidativa que utiliza componentes da membrana citoplasmática. As vesículas de membrana invertidas que contêm componentes da cadeia respiratória e a F_1F_0 ATPase podem estar presentes para a activação da fosforilação oxidativa. Os presentes métodos também podem ser utilizados para reacções isentas de células, para activar outros conjuntos de proteínas de membrana; por exemplo, para inserir ou translocar proteínas, ou para translocar outros compostos.

MÉTODOS PARA UMA SÍNTESE *IN VITRO* MELHORADA

Os sistemas sintéticos de interesse incluem sistemas para a replicação de biopolímeros, que podem incluir a amplificação de ADN, transcrição de ARN a partir de ADN ou moldes de ARN, tradução de ARN em polipéptidos e a síntese de hidratos de carbono complexos, a partir de açúcares simples. Uma síntese melhorada pode incluir aumento na quantidade total ou relativa

de polipéptido sintetizado no sistema; aumentos na quantidade total ou relativa de polipéptido sintetizado por unidade de tempo; aumentos na quantidade total ou relativa de polipéptido biologicamente activo sintetizado no sistema; aumentos na quantidade total ou relativa de polipéptido solúvel sintetizado no sistema e semelhantes.

As reacções podem utilizar um reactor em grande escala, pequena escala, ou podem ser de múltiplos componentes para realizar uma pluralidade de sínteses em simultâneo. As reacções contínuas irão utilizar um mecanismo de alimentação para introduzir um fluxo de reagentes e podem isolar o produto final como parte do processo. Os sistemas descontínuos também são de interesse, podendo introduzir-se reagentes adicionais para prolongar o período de tempo para uma síntese activa. Um reactor pode ser utilizado em qualquer modo, tal como operação descontínua, descontínua prolongada, semi-descontínua, semi-contínuo, descontínua com alimentação e contínua e será seleccionado de acordo com o objectivo da aplicação.

As reacções podem ser em qualquer volume, quer em pequena escala, normalmente pelo menos cerca de 1 μ l e não mais de cerca de 15 μ l, quer numa reacção escalada, sendo o volume de reacção de pelo menos cerca de 15 μ l, normalmente pelo menos cerca de 50 μ l, mais usualmente pelo menos cerca de 100 μ l, e pode ser de 500 μ l, 1000 μ l, ou superior. Na maioria dos casos, as reacções individuais não serão mais de cerca de 10 ml, embora se possam correr em paralelo reacções múltiplas. No entanto, em princípio, as reacções podem ser realizadas em qualquer escala, desde que seja fornecido oxigénio suficiente (ou outro aceitador de electrões).

Tem interesse particular a tradução do ARNm para produzir proteínas cuja tradução pode ser acoplada à síntese de ARNm *in vitro* a partir de um molde de ADN. Este sistema isento de células irá conter todos os factores necessários para a tradução de ARNm, por exemplo ribossomas, aminoácidos, ARNt, aminoacil-sintetases, factores de alongamento, factores de iniciação e factores de reciclagem de ribossomas. Os sistemas isentos de células conhecidos na especialidade incluem extractos de *E. coli*, etc., que podem ser tratados com uma nuclease adequada para eliminar o ARNm endógeno, activo.

Além dos componentes acima referidos, tais como extractos isentos de células, molde genético e aminoácidos, podem ser adicionados à reacção materiais especificamente necessários para a síntese de proteínas. Estes materiais incluem sal, ácido folínico, AMP cíclico, inibidores para enzimas que degradam proteínas ou ácidos nucleicos, inibidores ou reguladores da síntese de proteínas, agentes de ajuste do potencial de oxidação/redução, tensioactivos não desnaturantes, componentes tampão, espermina, espermidina, putrescina, etc.

Os sais de preferência incluem sais de potássio, magnésio e amónio (e.g. de ácido acético ou ácido sulfúrico). Um ou mais destes sais podem ter aminoácidos como contra-anião. Há uma interdependência entre as espécies iónicas para uma concentração óptima. Estas espécies iónicas são tipicamente optimizadas em relação à produção de proteína. Quando se muda a concentração de um componente particular do meio de reacção, o de outro componente pode ser mudado em concordância. Por exemplo, as concentrações de vários componentes, tais como nucleótidos e compostos fonte de energia podem ser controladas em simultâneo de acordo com a alteração nas dos outros componentes. Além disso, os níveis de concentração dos componentes no reactor podem variar ao longo do tempo. O agente de ajuste do potencial de oxidação/redução pode ser o ditiotreitól, ácido ascórbico, glutathiona e/ou suas formas oxidadas. Adicionalmente, um tensioactivo, tal como o Triton X-100 é opcionalmente incluído, a uma concentração de não mais de cerca de 500 mM, mais usualmente não mais de cerca de 250 mM.

Quando se utiliza um meio para isolar uma proteína num modo de operação contínua, o produto que sai do reactor flui através de uma membrana e para o meio de isolamento da proteína. Numa operação semi-contínua, o exterior ou superfície exterior da membrana é posta em contacto com soluções predeterminadas que são ciclicamente alteradas por uma ordem predeterminada. Estas soluções contêm substratos, tais como aminoácidos e nucleótidos. Nesta altura, o reactor é operado em diálise, diafiltração em modo descontínuo ou descontínuo com alimentação. Pode-se fornecer ao reactor uma

solução de alimentação através da mesma membrana, ou de uma unidade de injeção separada. A proteína sintetizada é acumulada no reactor e em seguida é isolada e purificada de acordo com o método usual para a purificação de proteínas, após se completar a operação do sistema.

Quando há um fluxo de reagentes, a direcção do fluxo de líquido pode ser perpendicular e/ou tangencial em relação a uma membrana. O fluxo tangencial é eficaz para reciclar o ATP e para prevenir o entupimento da membrana e pode ser sobreposto a um fluxo perpendicular. Um fluxo perpendicular à membrana pode ser provocado ou realizado por uma bomba de pressão positiva ou uma bomba de sucção por vácuo. A solução em contacto com a superfície externa da membrana pode ser ciclicamente alterada, e pode estar num fluxo tangencial estacionário em relação à membrana. O reactor pode ser agitado interna ou externamente através de um meio de agitação adequado.

Durante a síntese de proteínas no reactor, o meio de isolamento de proteínas para isolar de forma selectiva a proteína desejada, pode incluir uma unidade empacotada com partículas revestidas com moléculas de anticorpo ou outras moléculas imobilizadas com um componente para adsorver a proteína desejada, sintetizada e uma membrana com poros de tamanho adequado. De preferência, os meios para isolar a proteína compreendem duas colunas para uso alternado.

A quantidade de proteína produzida numa reacção de tradução pode ser medida de vários modos. Um método baseia-se na disponibilidade de um ensaio que mede a actividade da proteína particular a ser traduzida. Um exemplo de um ensaio para medir a actividade de proteína é um sistema de ensaio de luciferase, ou sistema de ensaio de cloranfenicol-acetil-transferase. Estes ensaios medem a quantidade de proteína funcionalmente activa produzida a partir da reacção de tradução. Os ensaios de actividade não irão medir uma proteína de comprimento total que é inactiva devido a um enrolamento inadequado da proteína, ou ausência de outras modificações na tradução necessárias para a actividade da proteína.

Outro método para medir a quantidade de proteína produzida em reacções de transcrição e tradução *in vitro* acopladas é realizar as reacções utilizando uma quantidade conhecida de aminoácido radiomarcado, tal como ³⁵S-metionina, ³H-leucina ou ¹⁴C-leucina e subsequentemente medir a quantidade de aminoácido radiomarcado incorporado na proteína traduzida de novo. Os ensaios de incorporação irão medir a quantidade de aminoácidos radiomarcados em todas as proteínas produzidas numa reacção de tradução *in vitro*, incluindo produtos de proteína truncados. A proteína radiomarcada pode ser também separada num gel de proteína e por autorradiografia pode confirmar-se que o produto tem o tamanho adequado e que não se produziram produtos de proteína secundários.

Deve entender-se que a presente invenção não se limita à metodologia, protocolos, linhas celulares, espécies ou géneros animais, construções e reagentes particulares descritos, pois estes poderão, obviamente, variar. Deve também entender-se que a terminologia aqui utilizada é apenas para descrever concretizações particulares e não pretende limitar o âmbito da presente invenção, que será limitada apenas pelas reivindicações anexas.

Salvo indicação em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que é normalmente entendido por um perito na especialidade em que se insere a presente invenção. Embora quaisquer métodos, dispositivos e materiais semelhantes ou equivalentes aos aqui descritos possam ser utilizados na prática ou teste da invenção, descrevem-se em seguida os métodos, dispositivos e materiais preferidos.

Todas as publicações aqui mencionadas são para descrever e divulgar, por exemplo, as linhas celulares, construções e metodologias que são descritas nas publicações que podem ser utilizadas em conjunto com a presente invenção. As publicações discutidas acima e ao longo do texto são proporcionadas apenas para sua divulgação antes da data de apresentação do presente pedido. Nada aqui descrito deve ser entendido como uma admissão de que os inventores não têm permissão para antecipar esta divulgação em virtude de uma invenção anterior.

Os exemplos seguintes são apresentados para proporcionar aos peritos na especialidade uma revelação e descrição completas da forma de utilizar a presente invenção e não pretendem limitar o âmbito do que se entende com sendo a invenção. Foram feitos esforços para assegurar o rigor em relação aos números utilizados (e.g. quantidades, temperatura, concentrações, etc.) mas deverá haver espaço para alguns erros e desvios experimentais. Salvo indicação em contrário, as partes são partes em peso, o peso molecular é peso molecular médio, a temperatura é em graus centígrados; e a pressão é, ou está próxima da atmosférica.

PARTE EXPERIMENTAL

Exemplo 1

Uma mistura reaccional convencional para uma reacção de transcrição-tradução acoplada, aqui designada por sistema PANox (Kim e Swartz (2001), *supra.*) contém os seguintes componentes: HEPES-KOH 57 mM (pH 7,5), ATP 1,2 mM, GTP, UTP e CTP cada um 0,85 mM, DTT 1 mM, glutamato de potássio 200 mM, acetato de amónio 80 mM, acetato de magnésio 16 mM, ácido folínico 34µg/ml, 170,6 µg/ml de mistura de ARNt de *E. coli*, 13,3 µg/ml de plasmídeo, 100 µg/ml de ARN-polimerase de T7, os 20 aminoácidos não marcados cada um 2 mM, [¹⁴C]leucina 11 µM, Poli(etilenoglicol) 8000 a 2%, PEP 33 mM, nicotinamida-adenina-dinucleótido 0,33 mM, coenzima A 0,26 mM, oxalato de sódio 2,7 mM e 0,24 volumes de extracto de S30. A síntese de proteínas isenta de células procarióticas é realizada utilizando um extracto de S30 bruto, derivado de *Escherichia coli* K12 (estirpe A19 ΔtonA ΔtnaA ΔspeA ΔendA met+), com ligeiras modificações ao protocolo de Pratt, J.M. 1984. (Coupled transcription-translation in prokaryotic cell-free systems. Em Transcription and translation: a practical approach. Hanes, B.D., e S.J. Higgins. (Eds.). p. 179-209. IRL Press, Nova Iorque). A ARN-polimerase de T7 foi preparada a partir de *E. coli* estirpe BL21 (pAR1219), de acordo com os procedimentos de Davanloo et al. 1984. (Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci EUA 81:2035-2039.)

O meio ambiente de Cytomim para a síntese, de acordo com os métodos da presente invenção é como se segue: as células para o extracto são crescidas em meio 2YTPG (Kim e Choi) contendo glucose e fosfato. Em relação ao sistema PAN0x descrito acima, o tampão HEPES é removido, a concentração de glutamato de potássio é reduzida para 130 mM, utiliza-se glutamato de amónio 10 mM em vez de acetato de amónio 80 mM, utiliza-se glutamato de magnésio 8 mM em vez de acetato de magnésio 16 mM, poli(etilenoglicol) 8000 a 2% é substituído por espermidina 1,5 mM e putrescina 1 mM, a concentração de ARN-polimerase de T7 é aumentada para 100 µg/ml, a concentração de plasmídeo é aumentada para 13,3 µg/ml, e o fosfoenolpiruvato é removido da mistura reaccional. O sistema pode ser melhorado com a adição de piruvato de sódio 33 mM, embora isso não seja necessário. Havia aproximadamente, um adicional de magnésio 3,3 mM, potássio 14,4 mM, TRIS 2,4 mM e acetato 23,5 mM em cada reacção proveniente do extracto celular.

As reacções foram incubadas a 37°C durante 5-6 horas. A quantidade de proteína sintetizada é estimada a partir das radioactividades insolúveis em TCA, utilizando um contador de cintilação líquida (Beckman LS3801). (Kim *et al.* 1996). Os rendimentos de proteína solúvel foram determinados como anteriormente descrito. (Kim e Swartz 2000).

A Figura 1 mostra a produção de proteína de cloranfenicol-acetiltransferase (CAT) com as composições e métodos concretizados na presente invenção. As barras de erro representam o desvio padrão para 4 experiências separadas. A nova mistura reaccional, como especificado acima, foi suplementada com piruvato de sódio 33 mM, quadrados, ou não, círculos.

A Figura 2 indica que é necessária uma combinação de alterações no sistema PAN0x para a criação desta nova entidade sintética. Nestes dados, a concentração de magnésio está na gama preferida, a aproximadamente 11,3 mM. Salvo se indicado na figura que a reacção contém polietilenoglicol (PEG) 8000, as reacções contêm espermidina 1,5 mM e putrescina 1 mM e utiliza-se a mistura reaccional descrita acima para o novo sistema. Os dados são apresentados em dois conjuntos de três.

Os primeiros três resultados são potenciados por piruvato de sódio 33 mM. O segundo conjunto de dados é sem a adição de piruvato de sódio. Em ambos os conjuntos de dados, o extracto que cresceu em 2YTPG produz significativamente mais proteína do que o extracto crescido em 2YT. Além disso, estes dados mostram que é necessária a remoção de PEG 8000 para obter os rendimentos aumentados proporcionados pela presente invenção.

A Figura 3 mostra a dependência da concentração de magnésio associada com o novo meio ambiente para a expressão de proteína. A concentração óptima é de aproximadamente 11 mM. As composições para a mistura reaccional são como descrito acima para o presente sistema. Em todos os casos, a síntese é melhorada por piruvato de sódio 33 mM. Foi medido um perfil semelhante para o novo meio ambiente sem piruvato. A concentração de magnésio foi reduzida mais de 2 vezes a partir da mistura reaccional convencional. Quando se utiliza glutamato de magnésio, na mistura reaccional convencional o seu valor óptimo é de 23,3 mM e com acetato de magnésio é de 19,3 mM. Reduzir a concentração de magnésio é o terceiro requisito para o novo meio ambiente.

Além dos solutos que são adicionados à mistura reaccional isenta de células, podem também ser incorporados sais na reacção por diálise para o extracto. Especificamente, no método tradicional para a preparação de extractos celulares, o último passo é a diálise repetida para ajustar a composição iónica final no extracto a 10 mM de tris-(hidroximetil)aminometano (TRIS, pH 8,2 com ácido acético glacial), acetato de potássio 60 mM, e acetato de magnésio 14 mM. Este procedimento foi utilizado para as experiências descritas. Deste modo, na ausência de sais exógenos, a reacção tem uma concentração de partida de aproximadamente 3,3 mM de magnésio, 14,4 mM de potássio, 2,4 mM de TRIS e 23,5 mM de acetato, proveniente do extracto celular. Todas as concentrações referidas incluem a contribuição para os componentes do extracto celular.

Os outros componentes da mistura reaccional foram otimizados para várias gamas de concentração de modo a criar um balanço geral dos reagentes nesta nova entidade, para a expressão de proteínas. O resultado é uma nova composição de

reacção que aumenta a duração da síntese de proteínas para até seis horas (Figura 1) e estabiliza a concentração de fosfato (Figura 4) e o pH da reacção (Figura 5) durante a reacção de síntese. Estas condições estabilizadas podem contribuir para melhorar o enrolamento da proteína, bem como melhorar a síntese.

Este novo sistema também demonstrou a primeira evidência de activação da fosforilação oxidativa no sistema isento de células. A fosforilação oxidativa produz energia por acoplamento da transferência de electrões para o oxigénio, um aceitador de electrões final, para a produção de ATP. Este processo é utilizado para fornecer energia de forma eficaz às células que crescem aerobicamente. A captura deste processo através da presente invenção é substancialmente vantajosa para o sistema isento de células, uma vez que oferece um meio muito eficaz para regenerar a energia *in vitro*. A activação desta via de produção de energia foi verificada após se constatar que o rendimento efectivo, com base nos requisitos de energia para a produção de proteína, era de aproximadamente 175% do rendimento teórico máximo esperado, utilizando piruvato como fonte de energia anaeróbia. Para referência, a eficiência do ATP para os sistemas convencionais PAN0x e PEP é de aproximadamente 50% e 20% do máximo teórico, respectivamente.

Para tentar compreender o modo como este rendimento foi obtido, testaram-se inibidores da fosforilação oxidativa para estabelecer que este processo era parcialmente responsável pela capacidade de produção de proteínas desta nova tecnologia. A Figura 6 mostra os resultados da síntese de proteínas de CAT utilizando o novo sistema sob três condições separadas, com ou sem 2-heptil-4-hidroxiquinolino-N-óxido (HQNO). O HQNO inibe a parte da fosforilação oxidativa correspondente à cadeia de transporte de electrões. Todos os casos correspondem a reacções descontínuas de 20 μ l e foram incubadas a 37°C durante 5 horas. Os espaços livres acima do líquido dos reactores descontínuos foram cheios ou com oxigénio, ou árgon, um gás inerte. Se a fosforilação oxidativa estiver activa, é de esperar que o rendimento da síntese de proteínas diminua por adição do inibidor da fosforilação oxidativa, HQNO, nos casos em que está presente oxigénio. Além disso, a síntese de proteínas não deverá ser afectada por

adição de HQNO nos casos em que está presente árgon e o oxigénio não está disponível.

Os dados da Figura 6 suportam a conclusão de que a fosforilação oxidativa foi activada pelo novo meio ambiente. Na presença de oxigénio, a síntese que utiliza o novo sistema, com ou sem piruvato, diminui substancialmente após adição de HQNO e não é afectada pelo HQNO nos casos do árgon. Realizaram-se estudos semelhantes com os seguintes inibidores da fosforilação oxidativa: 2,4-dinitrofenol, cianeto, azida, tenoíltrifluoroacetona e carbonil-cianeto-m-clorofenil-hidrazona. Em todos os casos, os resultados suportam a conclusão de que o novo sistema tem a fosforilação oxidativa activada. É importante notar que os rendimentos de síntese de proteínas no sistema PANox não são afectados por estes mesmos inibidores.

EXEMPLO 2

EFEITO DE UM VOLUME DE REACÇÃO EM MAIOR ESCALA

A síntese de proteínas utilizando os métodos da invenção foi realizada a uma escala de 5 ml para síntese de cloranfenicol-acetil-transferase (CAT). As reacções foram realizadas a 37°C num copo de vidro de 10 ml, com agitação. A expressão de CAT foi determinada a partir da incorporação de ¹⁴C-leucina. Fez-se passar um pequeno pedaço de arame de aço inoxidável por um tubo de silicone com 30 cm de comprimento. Cerca de 15 centímetros do tubo (1,47 mm DI, 1,96 mm DE) foram imersos na mistura reaccional isenta de células, enrolando no seio do reactor. Este tubo foi pressurizado com O₂ puro para fornecer o oxigénio necessário para a regeneração do ATP na reacção de síntese de proteínas isenta de células. Os substratos consumidos/degradados foram adicionados nas seguintes concentrações: CTP 0,5 mM, UTP 0,5 mM, hidróxido de potássio 1,8 mM, asparagina 0,5 mM, glutamina 0,5 mM, cisteína 2 mM, serina 1 mM, glutamato de potássio 10 mM, polimerase de ARN de T7 0,05 mg/mL, e plasmídeo pK7CAT 0,007 mg/mL. A mistura de aminoácidos continha asparagina, glutamina, treonina, cisteína, serina, e glutamato. Foi adicionada a cada trinta minutos na reacção alimentada. Adicionou-se UTP, CTP, hidróxido de potássio, ARN-polimerase de T7 e mais glutamato

de potássio 30 mM a 1,2, 2,7, 4,2 e 6 horas. Adicionou-se pK7CAT a 1,2 e 6 horas. Adicionou-se piruvato 33 mM a 2,7 horas. As barras de erro representam o máximo e mínimo de duas experiências em separado. O rendimento total de CAT expresso foi monitorizado por incorporação de ^{14}C -leucina. O rendimento solúvel de CAT expresso foi monitorizado por incorporação de ^{14}C -leucina. O rendimento activo de CAT foi determinado por um ensaio enzimático de acordo com o protocolo de Shaw (1975) Meth Enzymol 43:737-755 (ver também pedido de patente co-pendente 60/488,264)

Os dados são apresentados na Figura 7. Este gráfico demonstra a síntese de aproximadamente 100 nanomoles de proteína activa numa única reacção com os métodos da invenção, utilizados na operação de alimentação descontínua. Verificase, portanto, que estes métodos são úteis para a produção conveniente e económica de grandes quantidades de proteína, e.g. em quantidades suficientes para análise de estrutura de RMN, para testes pré-clínicos e clínicos e semelhantes.

EXEMPLO 3

EFEITO DOS COFACTORES

As reacções de síntese de proteínas foram preparadas como descrito no Exemplo 1 para o sistema Cytomim. Realizaram-se reacções de 15 μl durante 6 horas, que expressam CAT. O erro representa o desvio padrão de 4 experiências em separado. Um "x" indica a presença desse componente. A produção de proteínas é dada em relação a um controlo com NAD e CoA. As reacções de controlo (com NAD e CoA) produziram 727 μg de CAT/ml.

As concentrações dos cofactores CoA e NAD foram variadas como apresentado na Tabela 2. Como evidenciado pela produção de proteína relativa, a remoção de CoA não teve nenhum efeito significativo. A remoção de NAD reduz a síntese em cerca de 10%.

Tabela 2

Proteína expressa	NAD 0,33mM	COA 0,26mM	Produção de proteína relativa
CAT	x	x	1 0,03
CAT		x	0,91 0,05
CAT	x		1,02 0,1
CAT			0,86 0,03

EXEMPLO 4**SÍNTESE DE ACTIVADOR DE PLASMINOGÉNIO TECIDULAR**

O estabelecimento das condições adequadas para o enrolamento adequado de proteínas complexas é um problema central na expressão isenta de células. Embora os sistemas *in vitro* tenham sido bem sucedidos no enrolamento eficaz de várias proteínas modelo específicas que não requerem, ou requerem poucas ligações dissulfureto, tal como CAT, a obtenção de um enrolamento adequado em proteínas complexas tem sido um desafio. Esta invenção proporciona um meio ambiente que é melhor adequado para a produção de proteínas complexas no seu estado activo, enroladas de forma adequada. O activador de plasminogénio tecidular (tPA) é uma proteína de mamífero complexa. O domínio activo desta proteína, designado por v-tPA, contém o domínio de protease e um domínio krinkle. O v-tPA contém 9 ligações dissulfureto.

As reacções para a síntese de v-tPA foram preparadas tanto em sistemas PANOX como Cytomim, como descrito no exemplo 1. Uma vez que o vtPA requer um meio oxidante, o extracto celular foi primeiro tratado com iodoacetamida 1 mM (IAM) e incubado à temperatura ambiente durante 30 minutos, antes de ser adicionado à mistura reaccional isenta de células. Adicionalmente, estas reacções incluíam DsbC 75 µg/ml, glutationa oxidada 4 mM (GSSG) e glutationa reduzida 1 mM (GSH). O tratamento com IAM foi primeiro descrito por Swartz and Kim, Patente U.S. 6548276.

O protocolo do ensaio de actividade para vtPA é descrito a seguir. Os ensaios de actividade foram realizados directamente após uma reacção PANOX de 3 horas ou uma reacção de 6 horas com o novo meio ambiente. Após centrifugação das

amostras a 4°C, 15 000 RCF durante 15 minutos, recolheram-se 10 µl de sobrenadante e adicionaram-se a um poço, numa microplaca. Em seguida, adicionaram-se 100 µl de tampão de mistura de reagente de ensaio (9 partes de tampão Tris e 1 parte de solução Chromozym t-PA; tampão Tris: Tampão Tris-Cl 100 mM pH 8,5 e Tween 80 0,15% (p/v); solução de Chromazym t-PA: Chromazym t-PA 4 mM em água destilada, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) e misturou-se com a amostra. A mistura foi incubada a 37 °C durante 10 minutos. A velocidade de alteração de absorvância a 405 nm foi registada num leitor de microplacas (SpectralMax 190, Molecular Devices, CA) por ensaio cinético. A concentração da amostra foi calculada por comparação com um padrão de vtPA.

Apesar de se ter produzido aproximadamente a mesma quantidade de proteína total por ambos os sistemas, PAN0x e Cytomim, a quantidade de v-tPA activo duplicou utilizando o novo sistema, quando comparado com a mistura reaccional convencional. (Tabela 1)

Tabela 1

	v-tPA Total (µg/mL)	v-tPA Activo (µg/mL)
Sistema Cytomim	232	44,8
Sistema PAN0x	211	22,7

EXEMPLO 5

CONCENTRAÇÕES DE ESPERMIDINA E PUTRESCINA

As reacções de síntese de proteínas foram preparadas como descrito no Exemplo 1 para o sistema Cytomim. Fizeram-se reacções de 15 µl durante 6 horas, que expressam CAT. As concentrações de espermidina e putrescina foram variadas, como apresentado na tabela 3. A espermidina foi otimizada em relação à produção de proteína na presença de putrescina 1 mM e putrescina na presença de espermidina 1,5 mM.

Tabela 3

Soluto iónico	Perfil de optimização (mM/fracção de rendimento máximo)*					
Sistema novo						
Espermidina	0/0,53	0,5/0,90	1/0,97	1,5/1,00	5/0,48	10/0,15
Putrescina	0/0,95	1/1,00	3/0,80	7/0,58	11/0,43	15/0,23

* Os valores dados como '1/0.97' indicam que se adicionou uma concentração de 1 mM desse soluto iónico à reacção e se obteve 97% da expressão máxima de CAT a essa concentração particular. Apenas um soluto foi variado de cada vez. Todos os outros solutos estavam nas concentrações descritas no Exemplo 1 para o novo sistema.

EXEMPLO 6

COMPARAÇÃO DA SÍNTESE DE PROTEÍNAS

A quantidade de proteína produzida no meio Cytomim é substancialmente melhorada em comparação com os sistemas anteriores. Como se mostra na Figure 8, o sistema Cytomim produz um rendimento total mais elevado, bem como um maior rendimento de proteína solúvel e activa.

As reacções foram realizadas durante 6 horas e a expressão de CAT foi determinada a partir da incorporação de ^{14}C -leucina e ensaio de actividade enzimática. Prepararam-se misturas reaccionais de 15 μl num tubo diferente para cada ponto de tempo. Em cada ponto de tempo, um tubo foi sacrificado de modo a determinar a quantidade de proteína expressa. As barras de erro representam o desvio padrão para três experiências em separado para o sistema PANox com piruvato e seis experiências individuais para o sistema Cytomim. Quadrados: sistema Cytomim; abertos, rendimento total de CAT expresso como monitorizado por incorporação de ^{14}C -leucina; cinzento, rendimento solúvel de CAT expresso com monitorizado por incorporação de ^{14}C -leucina; Fechados, rendimento activo de CAT, como determinado por ensaio enzimático. Triângulos cinzentos, sistema PANox utilizando piruvato como fonte de energia, rendimento total de CAT expresso, como monitorizado por incorporação de ^{14}C -leucina.

Além dos rendimentos significativos, esta nova tecnologia oferece uma vantagem económica em relação aos sistemas isentos de células. Os compostos de fosfato de energia elevada que são convencionalmente utilizados para regenerar ATP são geralmente o custo mais elevado associado com a expressão isenta de

células. O sistema Cytomim pode, quase na totalidade, eliminar este custo. Rendimentos de proteína equivalentes ou mais elevados a uma fracção do custo, tornam o sistema Cytomim um método muito atractivo para a síntese de proteínas isenta de células.

Lisboa, 2010-01-14

REIVINDICAÇÕES

1. Mistura reaccional para a transcrição *in vitro* de ARNm e/ou tradução de polipéptidos, em que a mistura compreende:

um extracto de células bacterianas crescidas em meio contendo glucose e compreendendo vesículas de membrana invertidas que contêm componentes da cadeia respiratória e a F_1F_0 ATPase; componentes da maquinaria de síntese de polipéptido e/ou de ARNm; um molde para a transcrição do referido ARNm e/ou tradução do referido polipéptido; nucleótidos e/ou aminoácidos para a síntese do referido ARNm e/ou polipéptidos; e cofactores, enzimas e outros reagentes necessários para a referida transcrição e/ou tradução;

em que a referida mistura reaccional é substancialmente isenta de polietilenoglicol; compreende magnésio numa concentração desde cerca de 5 mM a cerca de 20 mM e compreende um ou mais de entre espermina, espermidina e putrescina;

em que a referida mistura reaccional proporciona condições que permitem a transcrição *in vitro* de ARNm e/ou a tradução de polipéptidos; e activação da fosforilação oxidativa que é sensível a inibidores da cadeia de transporte de electrões.

2. Mistura reaccional de acordo com a reivindicação 1, em que os referidos componentes são capazes de utilizar o molde de ARNm para sintetizar um polipéptido.

3. Mistura reaccional de acordo com a reivindicação 1, em que os referidos componentes são capazes de utilizar um molde de ADN para sintetizar ARNm.

4. Mistura reaccional de acordo com a reivindicação 1, em que o referido extracto biológico isento de células compreende um extracto de *E. coli* crescido num meio contendo glucose.

5. Mistura reaccional de acordo com a reivindicação 4, em que a referida *E. coli* é crescida num meio contendo glucose e fosfato.

6. Método para a transcrição *in vitro* de ARNm e/ou tradução de polipéptidos, em que o método compreende:

sintetizar o referido ARNm e/ou polipéptidos numa mistura reaccional de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, em que a referida transcrição de ARNm e/ou tradução de polipéptidos é pelo menos três vezes superior à síntese na ausência da referida fosforilação oxidativa.

8. Método de acordo com a reivindicação 6, em que a referida síntese de macromoléculas biológicas é realizada na forma de uma reacção descontínua ou de uma reacção contínua.

9. Método de acordo com a reivindicação 6, em que o referido polipéptido compreende pelo menos uma ligação dissulfureto.

Lisboa, 2010-01-14

RESUMO

"Métodos melhorados para a síntese de proteínas *in vitro*"

São sintetizadas macromoléculas biológicas *in vitro* sob condições e numa composição reaccional em que a fosforilação oxidativa é activada e o enrolamento de proteínas é melhorado.

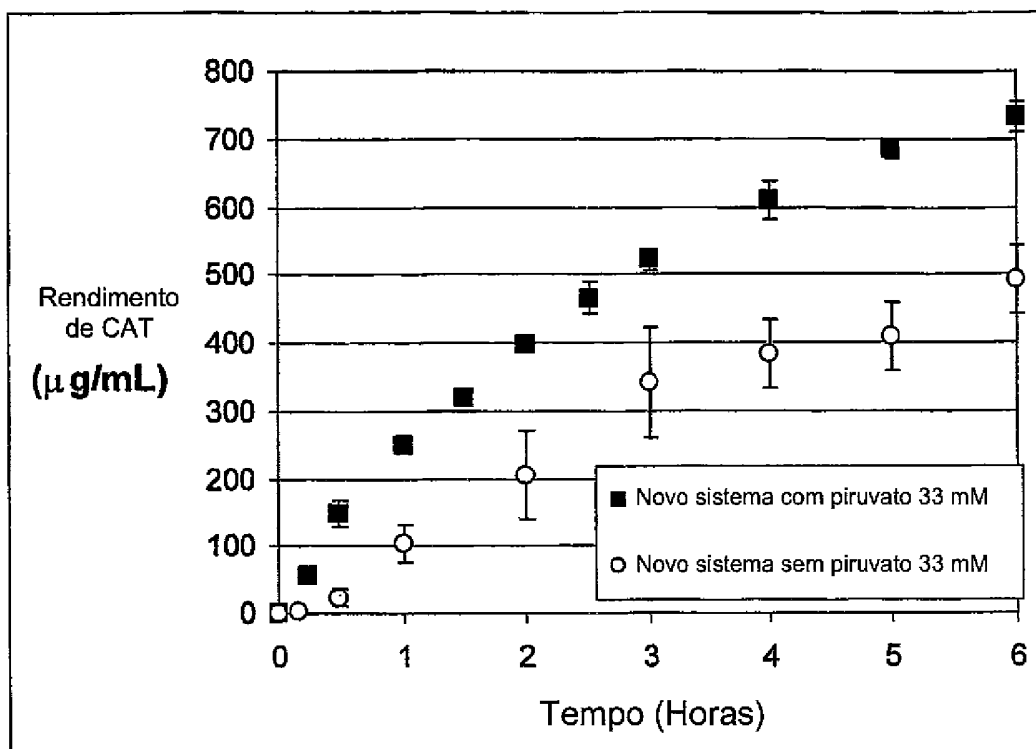
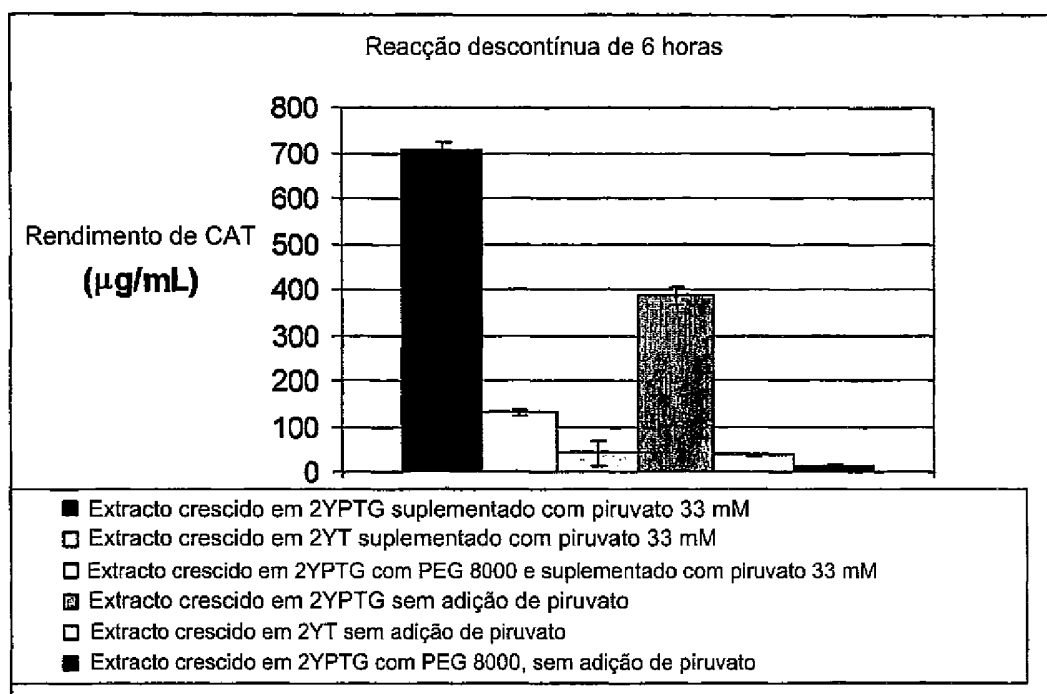


FIGURA 1

FIGURA 2



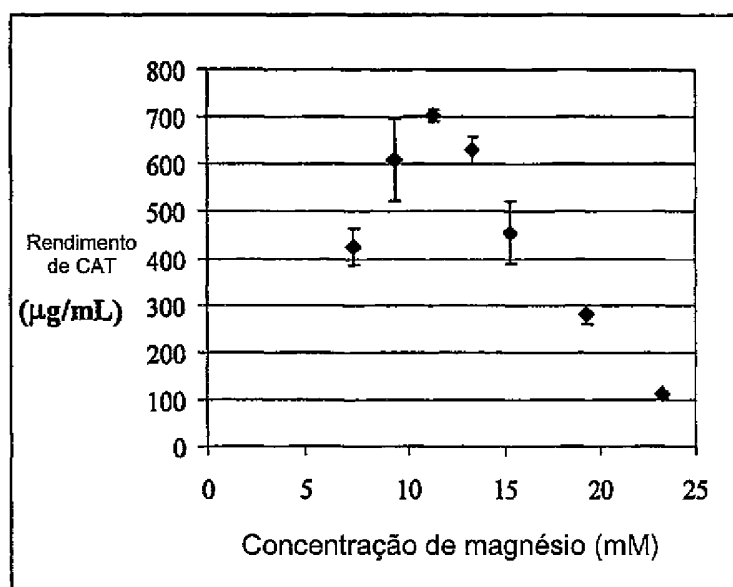
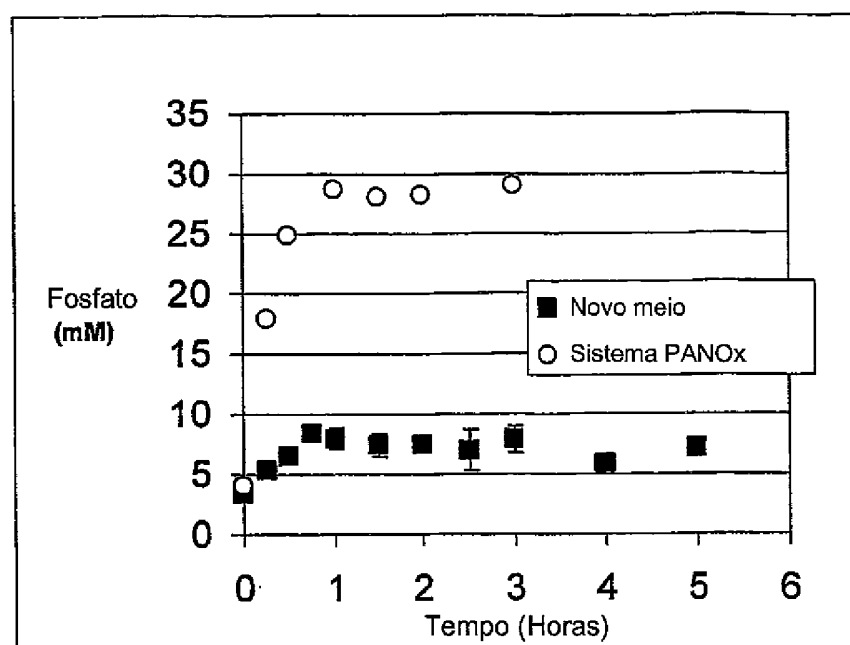


FIGURA 3

FIGURA 4



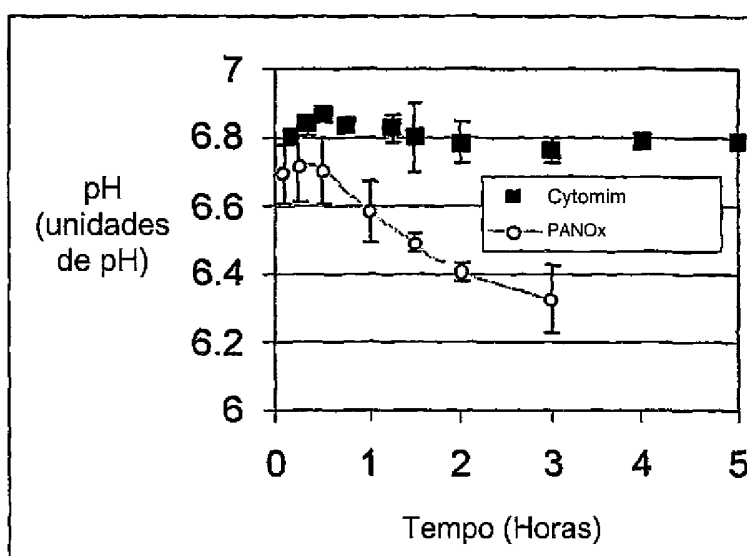
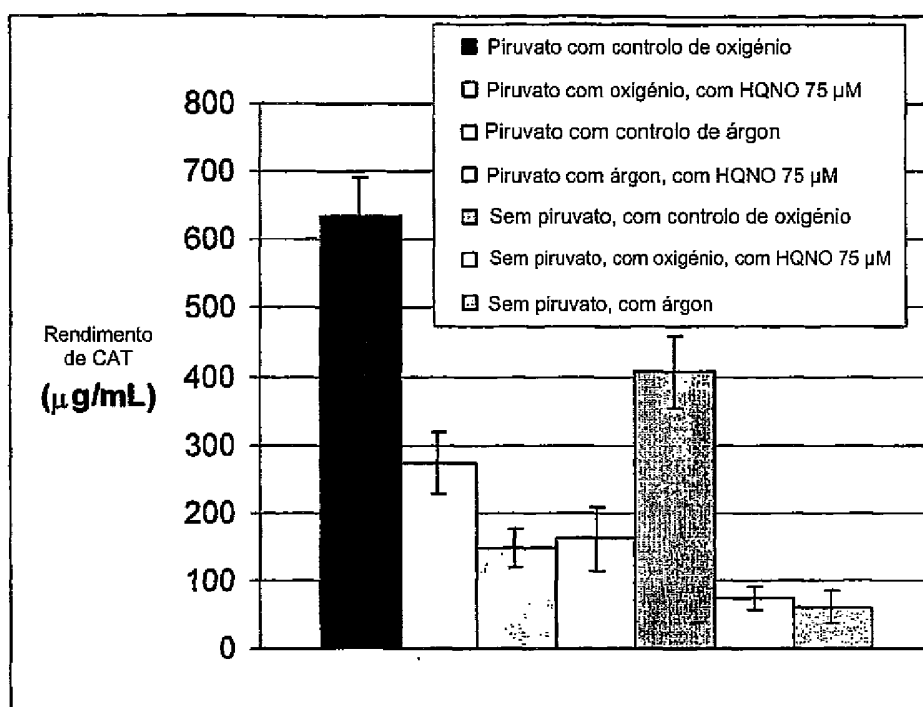


FIGURA 5

FIGURA 6



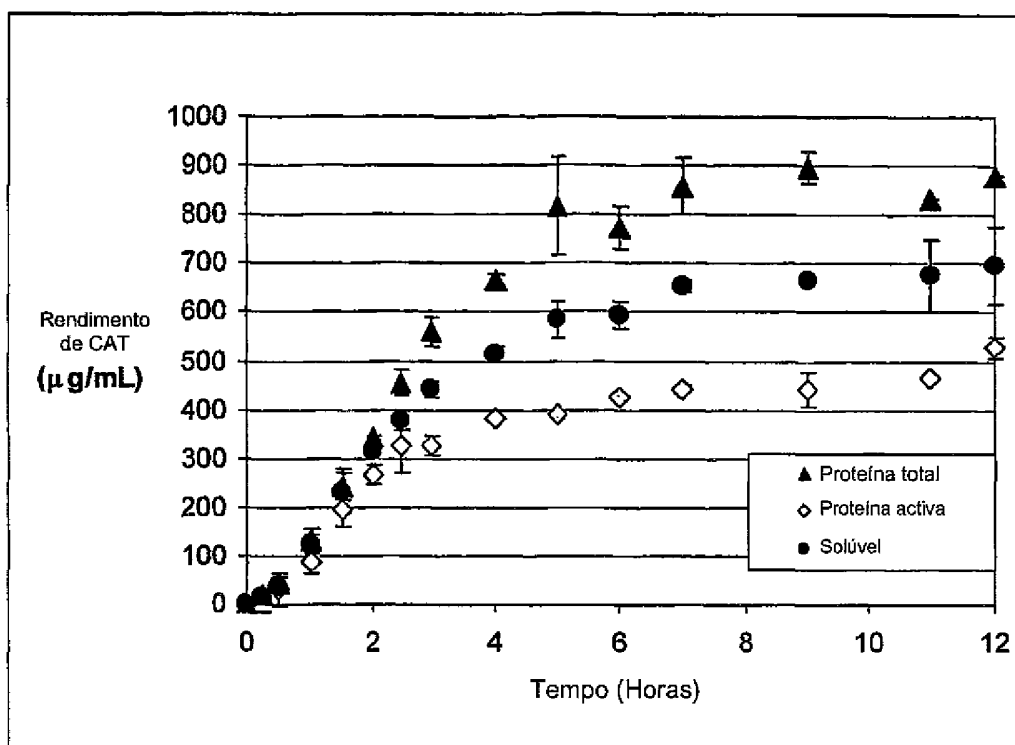
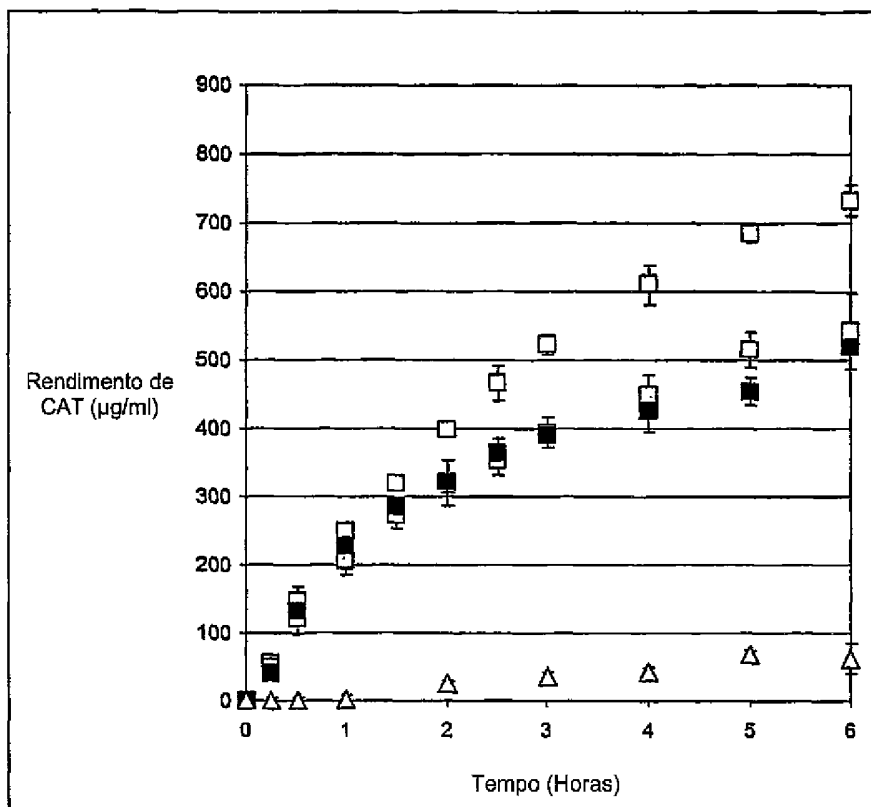


FIGURA 7



- Sistema Cytomin, rendimento total
- Sistema Cytomin, rendimento solúvel
- Sistema Cytomin, rendimento de proteína activa
- △ Sistema PANOX, fonte de energia de piruvato, rendimento total

FIGURA 8